

**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](043.2)

CĂLUGĂRU-SPĂTARU TATIANA

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

163.02. Biochimie

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific



DASCALIUC Alexandru,
doctor habilitat în științe biologice,
profesor universitar

Autor:



CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana

CHIȘINĂU, 2019

©CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana, 2019

CUPRINS.....	3
ADNOTĂRI (română, engleză, rusă).....	6
LISTA TABELELOR.....	9
LISTA FIGURILOR.....	11
LISTA ABREVIERILOR.....	17
INTRODUCERE.....	18
1. METABOLISMUL SECUNDAR LA PLANTE.....	25
1.1. Caracteristica generală a metabolismului secundar la plante.....	25
1.2. Metode alternative de cultivare a plantelor pentru obținerea <i>metaboliților secundari</i>	37
1.3. Implicarea <i>speciilor reactive de oxigen</i> în biosinteza, degradarea și acumularea <i>metaboliților secundari</i> la plante	44
1.4. <i>Rhodiola rosea</i> L. – sursă de <i>metaboliți secundari</i> importantă pentru medicină.....	46
1.5. Concluzii la capitolul 1.....	55
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	57
2.1. Obiectele de studiu.....	57
2.2. Metodele și procedeele de cercetare.....	58
2.2.1. <i>Metode de multiplicare și cultivare a plantelor de R. rosea în condiții in vivo</i>	58
2.2.2. <i>Multiplicarea plantelor de R. rosea în condiții in vitro</i>	59
2.2.3. <i>Metode de determinare a parametrilor fiziologici și biochimici a culturii in vitro</i>	60
2.2.4. <i>Studiul influenței factorilor chimici și fizici asupra dinamicii de creștere a culturii in vitro de R. rosea</i>	60
2.2.5. <i>Metode fiziologice și biochimice de analiză a materialului vegetal</i>	61
2.2.6. <i>Metodele utilizate în separarea, purificarea și analiza metaboliților secundari</i>	65
2.3. Analiza statistică a datelor.....	70
2.4. Concluzii la capitolul 2.....	70
3. ANALIZA COMPOZIȚIEI METABOLIȚILOR SECUNDARI ÎN EXTRACTELE DIN RIZOMII PLANTELOR DE <i>R. rosea</i> COLECTATE ÎN MUNȚII CARPAȚI, ROMÂNIA, ȘI CELOR CULTIVATE ÎN CONDIȚIILE REPUBLICII MOLDOVA...	71
3.1. Analiza <i>metaboliților secundari</i> în extractele din rizomi de <i>R. rosea</i> colectați în Munții Carpați, România.....	71
3.1.1. <i>Analiza compoziției extractelor prin cromatografia în strat subțire</i>	71
3.1.2. <i>Analiza prin spectrofotometria UV-VIS a conținutului metaboliților secundari în extractele alcoolice din rizomi de R. rosea</i>	72

3.1.3. Analiza HPLC a componentelor metaboliților secundari în extractele din rizomi de <i>R. rosea</i>	74
3.1.4. Analiza RMN a <i>p</i> -tirosolei și diacetatului de <i>p</i> -tirosole.....	77
3.1.5. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomi de <i>R. rosea</i>	81
3.1.6. Caracteristica fizico-chimică a uleiului volatil din rizomi de <i>R. rosea</i>	83
3.2. Analiza metaboliților secundari în extractele din rizomi de <i>R. rosea</i> colectați în diferite masive ale Munților Carpați (România, Ucraina și Polonia)	84
3.3. Analiza compoziției metaboliților secundari în extractele din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> cultivate în condițiile Republicii Moldova.....	89
3.4. Concluzii la capitolul 3.....	90
4. INFLUENȚA FACTORILOR CHIMICI ȘI FIZICI ASUPRA CREȘTERII BIOMASEI ȘI ACUMULĂRII METABOLIȚILOR SECUNDARI ÎN CULTURA CELULARĂ DE <i>R. rosea</i>.....	92
4.1. Influența conținutului fitohormonilor în mediul de cultivare asupra acumulării biomasei calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i>	92
4.2. Spectrul polipeptidelor în extractele din celulele calusului de <i>R. rosea</i> la diferite faze de creștere.....	96
4.3. Influența radiației ultraviolete asupra acumulării biomasei, conținutului compușilor fenolici și activității antioxidante totale a extractelor din calusul de <i>R. rosea</i>	97
4.4. Influența temperaturilor joase pozitive asupra creșterii biomasei calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> , precum și a parametrilor biochimici ai extractelor din biomasa acestora.....	100
4.5. Influența temperaturilor negative asupra parametrilor fiziologici ai calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> , precum și a parametrilor biochimici ai extractelor din biomasa acestora.....	107
4.6. Influența regulatorului natural de creștere <i>RegIalG</i> asupra parametrilor fiziologici ai calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> , precum și a parametrilor biochimici ai extractelor din biomasa acestora.....	113
4.6.1. Influența regulatorului natural de creștere <i>RegIalG</i> asupra potențialului oxidoreducător al extractelor din celulele calusului de <i>R. rosea</i>	118
4.7. Testarea influenței combinate a factorilor fizici și chimici asupra acumulării metaboliților secundari în calusul de <i>R. rosea</i>	123

4.8. Testarea influenței combinate a factorilor fizici și chimici asupra acumulării <i>metaboliților secundari</i> în agregatele celulare de <i>R. rosea</i>	125
4.8.1. Analiza HPLC a <i>metaboliților secundari</i> din extractele agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> supuse expoziției radiației UV, temperaturilor joase pozitive și precursorului alcoolului cinamic.....	127
4.9. Concluzii la capitolul 4.....	131
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI	133
BIBLIOGRAFIE	135
ANEXE	169
Anexa 1. Structura chimică a celor mai importanți <i>MS</i> caracteristici pentru rizomii de <i>R. rosea</i>	170
Anexa 2. Structura chimică a celor mai importante flavonoide, monoterpene și compuși volatili caracteristici pentru rizomii de <i>R. rosea</i>	171
Anexa 3. Imaginea semințelor germinate și a plantulelor de <i>R. rosea</i> obținute în condiții <i>in vivo</i> și <i>in vitro</i>	172
Anexa 4. Curbe de calibrare.....	173
Anexa 5. Conținutul de salidrohid și rosavin în rizomii de <i>R. rosea</i> colectați în diferite regiuni geografice.....	174
Anexa 6. Testarea organoleptică a uleiului volatil din rizomii de <i>R. rosea</i>	175
Anexa 7. Plantele de <i>R. rosea</i> la al 3-a an de cultivare în condiții de câmp, Rezervația Științifică “ <i>Plaiul Fagului</i> ”.....	176
Anexa 8. Imaginile calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> cultivate pe mediul nutritiv Murashige-Skoog solid și lichid.....	177
Anexa 9. Imaginile calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> expuse diferitor factori.....	178
Anexa 10. Imaginile culturii agregatelor celulare de <i>R. rosea</i>	179
Anexa 11 și 12. Brevet de invenție MD №3375 și MD №894.....	180
Anexa 13 și 14. Acte de valorificare a rezultatelor tezei de doctor.....	182
Anexa 15 și 16. Diplomă pentru medalia de bronz – INFOINVENT 2009, CHIȘINĂU, diplomă pentru medalia de aur – „TRAIAN VUIA”2016, TIMIȘOARA.....	184
Anexa 17 și 18. Diplomă pentru medalia de aur – INVENTICA 2016, IAȘI, PROINVENT 2016, CLUJ-NAPOCA, EUROINVENT 2018, IAȘI.....	186
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	188
CV-ul AUTORULUI	189

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, terpeni, 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-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 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 IGFP 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: determination 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 of 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 of 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 determine both the composition and the accumulation of active principles in rhizomes, as well as the viability of the *R. rosea* plants. Cell culture of *R. rosea* represents an alternative method and a model for investigation of 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 of 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 of 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”.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1. <i>Metaboliți secundari</i> produși cu un conținut sporit în culturile celulare vegetale (adaptat după Ruffoni, 2010).....	38
Tabelul 2.1. Parametrii mediilor de testare a influenței diferitor fitohormoni, introduși în mediul nutritiv MS agarizat și lichid, asupra creșterii calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i>	60
Tabelul 3.1. Conținutul de acid galic, salidrohid și rosavin în extractele alcoolice din rizomi de <i>R. rosea</i>	73
Tabelul 3.2. Timpul de retenție, aria picului și intensitatea absorbției <i>metaboliților secundari</i> principali din rizomi de <i>R. rosea</i> identificați prin metoda HPLC la λ_{\max} 222 nm, Fig. 3.4A.....	77
Tabelul 3.3. Timpul de retenție, aria picului și intensitatea absorbției compușilor aromatici din rizomi de <i>R. rosea</i> identificați prin metoda HPLC la λ_{\max} 195 nm, Fig. 3.9.....	83
Tabelul 4.1. Influența compoziției fitohormonilor introduși în mediul nutritiv Murashige-Skoog asupra acumulării biomasei în cultura calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i>	93
Tabelul 4.2. Delimitarea fazelor de creștere a calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> în baza cineticii de acumulare a biomasei.....	96
Tabelul 4.3. Influența temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în celulele calusului de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	111
Tabelul 4.4. Influența acțiunii temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în agregatele celulare de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).....	112
Tabelul 4.5. Influența preparatului <i>Reglalg</i> în diferite concentrații, aplicat în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în celulele calusului de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	115
Tabelul 4.6. Influența preparatului <i>Reglalg</i> în diferite concentrații, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în celulele agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a de cultivare)..	117
Tabelul 4.7. Activitatea antioxidantă și conținutul compușilor fenolici în extractele din calusul de <i>R. rosea</i> supus tratării în ziua a 20-a cu radiație UV, temperaturi joase	

<i>pozitive</i> și după introducerea în mediul de cultivare a <i>alcoolului cinamic</i> , la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	124
Tabelul 4.8. Caracteristica parametrilor de extragere din biomasa calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> a substanțelor extractibile în hexan și metanol, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a și, respectiv, a 20-a).....	125

LISTA FIGURILOR

Figura 1.1. Prezentarea schematică a biosintezei <i>metaboliților primari</i> și <i>secundari</i> în plante.....	27
Figura 1.2. Schema simplificată a principalelor cicluri metabolice de biosinteză a <i>metaboliților secundari</i> și interconexiunea acestora cu metabolismul primar (adaptată după Dewick, 2009).....	28
Figura 1.3. Ciclul de biosinteză a acidului shikimic (adaptat după Borah, 2015).....	29
Figura 1.4. Biosinteza derivaților acidului p-cumaric în plante (adaptat după Dewick, 2009).....	31
Figura 1.5. Ciclurile de biosinteză a compușilor izoprenici în celula vegetală (adaptate după Pulido, 2012).....	33
Figura 1.6. Ilustrarea schematică a diferitor tipuri de calus (imaginile prezentate au fost obținute de noi la diverse culturi).....	40
Figura 1.7. Influența stresului biotic și/sau abiotic la redirecționarea metabolismului primar al plantelor către ciclurile de biosinteză ale metabolismului secundar (adaptă după Borges, 2017).....	46
Figura 1.8. Distribuția geografică a speciei <i>R. rosea</i> (GBIF, Portal data, 2017).....	47
Figura 1.9. Ciclul de biosinteză a salidrozidului în plantele genului <i>Rhodiola</i> . Ciclul propus anterior este reprezentat cu negru, în timp ce calea descrisă recent este evidențiată cu roșu (adaptată după Torrens-Spence, 2018).....	49
Figura 2.1. Plante (A, B), rizomi (C) și semințe (D) de <i>R. rosea</i> colectate din habitatele naturale ale munților Carpați (Masivul Ineu, România).....	57
Figura 3.1. Analiza cromatografică (CSS) a <i>metaboliților secundari</i> în extractele hidroalcoolice (de 40, 50, 60 și 70 %), obținute din rizomi de <i>R. rosea</i> . Sistemul eluant format din cloroform: metanol (3:1). Soluțiile standard conțin salidroxid (S), <i>p</i> -tirozol (T) și rosavin (R).....	72
Figura 3.2. Analiza HPLC a <i>metaboliților secundari</i> extrași din rizomi de <i>R. rosea</i> și detectați pe lungimile de undă: A – 222 nm; B – 254 nm; C – 280 nm. Separarea a fost efectuată pe coloana Zorbax XDB C-18 combinată cu coloana de protecție Extend C-18. 1 – metilgalat; 2 – <i>p</i> -tirozol; 3 - acid galic; 4 – salidroxid; 5 – rosavin; 6 – rosin; 7 – rosarin; 8 – acid cinamic.....	75
Figura 3.3. Spectrul protonic al <i>p</i> -tirozolului.....	78

Figura 3.4. Spectrul carbonic al <i>p</i> -tirosoolului.....	79
Figura 3.5. Schema transformării <i>p</i> -tirosoolului în diacetat de <i>p</i> -tirosool.....	80
Figura 3.6. Spectrul protonic al diacetatului de <i>p</i> -tirosool.....	80
Figura 3.7. Spectrul carbonic al diacetatului de <i>p</i> -tirosool.....	81
Figura 3.8. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomi de <i>R. rosea</i> , detecție la λ_{\max} 195 nm. Separarea a fost efectuată pe o coloană de tip Zorbax XDB C-18 cu o coloană de protecție Extend C-18. 1 – limonen, 2 – alcool feniletic, 3 – <i>p</i> -cimen, 4 – carvona, 5 – geraniol, 6 – linalool, 7 – carvacrol, 8 – timol, 9 – cariofilenă. Sunt indicate doar componentii, care au fost identificați prin comparare cu markerii autentici.....	82
Figura 3.9. Analiza HPLC a <i>metaboliților secundari</i> extrași din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> din flora spontană a Munților Carpați, România și detectați pentru lungimile de undă: A – 205 nm; B – 220 nm; C – 254 nm; D – 330 nm.....	85
Figura 3.10. Analiza HPLC a <i>metaboliților secundari</i> extrași din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> din flora spontană a Munților Carpați, Ucraina și detectați pentru lungimile de undă: A – 205 nm; B – 220 nm; C – 254 nm; D – 330 nm.....	86
Figura 3.11. Analiza HPLC a <i>metaboliților secundari</i> extrași din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> din flora spontană a Munților Carpați, Polonia și detectați pentru lungimile de undă: A – 205 nm; B – 220 nm; C – 254 nm; D – 330 nm.....	87
Figura 3.12. Aria picurilor diferitor componente ai <i>metaboliților secundari</i> extrași din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> colectați în Carpații din România, Ucraina și Polonia și analizați prin cromatografia HPLC.....	88
Figura 3.13. Analiza compoziției <i>metaboliților secundari</i> ale extractelor din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> cultivate în condiții <i>in vivo</i>	90
Figura 4.1. Dinamica creșterii biomasei proaspete a calusului (A) și agregatelor celulare (B) de <i>R. rosea</i> în dependență de durata de cultivare.....	94
Figura 4.2. Analiza SDS-PAAG. (A1): Markerii cu masă moleculară cunoscută (M) – α 2-macroglobulina (plasmă umană) – 180 kD, β -galactozidaza (<i>E.coli</i>) – 116kD, fosforilaza (mușchi de iepure) – 97,5 kD, catalaza (ficat de bovine) – 58,1, alcool dehidrogenaza (ficat de ecvină) – 39,8 kD, anhidraza carbonică (eritrocite de bovine) – 29 kD, lizocimul (ou de pui) – 14 kD, aprotinina (plămâni de bovine) – 6,5 kD; (A2) – 20, 30, 40, 50 și 90 - polipeptidele extrase din calusul de <i>R. rosea</i> în vârstă de 20, 30, 40, 50 și 90 zile (de la stânga la dreapta).....	97

Figura 4.3. Acumularea biomasei calusului de <i>R. rosea</i> tratat zilnic cu raze 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 a 30–a zi de cultivare.....	98
Figura 4.4. 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 conținutului compușilor fenolici (CCF) în extractele din calusul de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 30-a).....	99
Figura 4.5. Dependența dintre valorile activității antioxidante relative a extractelor și creșterea relativă a calusului de <i>R. rosea</i> tratat cu raze UV-B timp de 0 (martor-M), 5, 15, 30, 60, 120 și 180 min în ziua a 12-a de cultivare, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 30-a).....	99
Figura 4.6. 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 <i>R. rosea</i> determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a) A (vara, luna iunie) și B (toamna, luna octombrie).....	101
Figura 4.7. 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 H ₂ O ₂ în extractele din celulele calusului de <i>R. rosea</i> , determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	102
Figura 4.8. Dependența dintre valorile biomasei calusului și conținutului de H ₂ O ₂ în extractele din celulele calusului de <i>R. rosea</i> , tratat cu temperatura de +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore în ziua a 20-a de cultivare, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	102
Figura 4.9. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra activității CAT (A) și PO (B) în extractele din calusul de <i>R. rosea</i> determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	103
Figura 4.10. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra procentului de celule moarte (A) și acumularea biomasei (B) în calusul de <i>R. rosea</i> determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	105
Figura 4.11. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra cantității pigmentilor clorofilieni în calusul de <i>R. rosea</i> determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	105

Figura 4.12. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului compușilor fenolici (CCF) (A) și capacității antioxidante totale (Cat) (B) în extractele calusului de <i>R. rosea</i> determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	106
Figura 4.13. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului total de flavonoide (CTF) în extractele calusului de <i>R. rosea</i> determinat la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	107
Figura 4.14. Influența temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, asupra viabilității celulelor și acumulării biomasei calusului de <i>R. rosea</i> , la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	108
Figura 4.15. Dependența dintre valorile biomasei și cele ale viabilității celulelor calusului de <i>R. rosea</i> , tratat cu temperaturi negative pe parcursul a 8 ore în ziua a 20-a de cultivare, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	108
Figura 4.16. Influența temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 12-a de cultivare, asupra viabilității celulelor și acumulării biomasei agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> , la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).....	110
Figura 4.17. Dependența dintre valorile biomasei și cele ale viabilității celulelor agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> , tratate cu temperaturi negative pe parcursul a 8 ore în ziua a 12-a de cultivare, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).....	110
Figura 4.18. Influența preparatului <i>Reglalg</i> diluat cu mediul MS în raport de 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1800, aplicat în ziua a 20-a de cultivare, asupra indicelui de creștere a calusului de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	114
Figura 4.19. Influența preparatului <i>Reglalg</i> diluat cu mediul MS în raport de 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1400, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra indicelui de creștere a agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).....	114
Figura 4.20. Relația dintre valorile indicelui de creștere a biomasei și cele ale conținutului de clorofilă <i>a</i> în celulele calusului de <i>R. rosea</i> , tratat cu diferite concentrații ale preparatului <i>Reglalg</i> în ziua a 20-a de cultivare, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	116
Figura 4.21. Dependența dintre valorile indicelui de creștere a biomasei și cele ale conținutului de clorofilă <i>a</i> în agregatele celulare de <i>R. rosea</i> , tratate cu diferite	

concentrații ale preparatului <i>Reglalg</i> în ziua a 12-a de cultivare și determinate la sfârșitul perioadei de cultivare	118
Figura 4.22. Influența preparatului <i>Reglalg</i> 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 capacității antioxidante totale (Cat) în extractele din calusul de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	119
Figura 4.23. Dependența dintre valorile conținutului compușilor fenolici (CCF) și capacitatea antioxidantă totală (Cat) a extractelor etanolice din calusul de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	119
Figura 4.24. Separarea formelor izoenzimaticice ale PFO din extractele calusului de <i>R. rosea</i> cultivat pe mediu MS : M-martor; 1 și 2 - mediul MS suplimentat cu preparatul <i>Reglalg</i> diluat în raport de 1/1000 și 1/1400.....	120
Figura 4.25. Influența preparatului <i>Reglalg</i> 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 în extractele din calusul de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	121
Figura 4.26. Dependența dintre valorile conținutului total de flavonoide (CTF) și ale capacității antioxidante totale (Cat) a extractelor etanolice din calusul de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).....	121
Figura 4.27. Separarea formelor izoenzimaticice ale PO a extractelor din calusul de <i>R. rosea</i> în vârstă de 32 zile, cultivat pe mediu MS : M-martor și suplimentat cu preparatul <i>Reglalg</i> 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.....	122
Figura 4.28. Influența preparatului <i>Reglalg</i> diluat cu mediul MS în raport de 1/1000 asupra activității PO din calusul de <i>R. rosea</i> de diferită vârstă.....	122
Figura 4.29. Influența preparatului <i>Reglalg</i> diluat cu mediul MS în raport de 1/1000 și 1/1200, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului de prolină în extractele din calusul de <i>R. rosea</i> la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 32-a).....	123
Figura 4.30. Influența diferitor concentrații ale <i>alcoolului cinamic</i> în mediul MS , aplicate în ziua a 10-a de cultivare, asupra creșterii relative a agregatelor celulare de <i>R. rosea</i> , la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).....	126

- Figura 4.31.** Conținutul substanțelor extractibile în metanol din agregatele celulare de *R. rosea* obținute în medii cu diferite concentrații ale alcoolului cinamic la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a)..... 127
- Figura 4.32.** Analiza HPLC a *metaboliților secundari* extrași din agregatele celulare de *R. rosea* cultivate pe mediul nutritiv conținând 2 mM de alcool cinamic și detectați la lungimile de undă 274 nm (A) și 254 nm (B)..... 128
- Figura 4.33.** 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 – salidrozin; 3,4 – 4-metoxi-cinamil- (6'-O-α-arabinopiranozil) -O-β-glucopiranozidă; 5,6 – derivați de tipul compușilor 3,4; 7 – rosin; 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..... 129
- Figura 4.34.** 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 – salidrozin; 5,6 – derivați de tipul compușilor 3,4; 8 – rosavin; 11, 12 – derivați de tipul compușilor 3,4..... 130

LISTA ABREVIERILOR

- 2,4-D – acid 2,4-diclorfenoxiacetic
AAPH – 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihidroclorură
AC – alcool cinamic
AIA – acid β -indolilacetic
AIB – acid indolil-3-butiric
ANA – acid α -naftilacetic
ARA – activitate antiradicală
BA – 6-benzilaminopurină
Cat – capacitatea antioxidantă totală
CAT – catalaza
CC – cromatografie pe coloană
CCF – conținutul compușilor fenolici
CSS – cromatografie în strat subțire
CTF – conținutul total de flavonoide
GA₃ – acid giberelic
IR – spectroscopie în infraroșu
HPLC – cromatografia cu lichide de înaltă performanță
Kn – chinetină
MMR – masa moleculară relativă
mkMGAE – echivalentul acidului galic la un gram de materie primă
MP – metaboliți primari
MS – metaboliți secundari
MS – Murashige-Skoog
MEP – ciclul metileritritol-fosfat
MVA – ciclul acidului mevalonic
PAAG – gel de poliacrilamidă
PFO – polifenoloxidaza
PO – peroxidazele
SDS – dodecilsulfat de sodiu
SRO – specii reactive de oxigen
RMN – rezonanță magnetică nucleară
RNC – reglator natural de creștere
UV – radiație ultravioletă

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate. Plantele reprezintă o sursă prețioasă de *metaboliți secundari*, care datorită activității lor biologice se utilizează pe larg în industria alimentară, farmaceutică și cosmetologie. În acest scop se colectează plantele din flora spontană. Colectarea necontrolată a plantelor agravează situația ecologică apărând pericolul dispariției unor specii și forme de plante prețioase [60]. De menționat, de asemenea, că acumularea *metaboliților secundari* în plante este determinată de specia plantei, țesut, organ sau chiar celulă și reprezintă o expresie a individualității speciei respective [89, 294]. Multiple plante medicinale, precum *Catharanthus roseus* L., *Echinacea purpurea* L., *Silybum marianum* L., *Melissa officinalis* L. etc., sunt utilizate în medicină datorită principiilor active foarte valoroase. Printre aceste plante poate fi inclusă și specia *Rhodiola rosea* L.

Rhodiola rosea L. (rădăcina de aur) este o plantă medicinală valoroasă, care datorită proprietăților sale prețioase este intensiv colectată și se află în pericol de dispariție în multe regiuni ale globului. Plantele acestei specii se întâlnesc în flora spontană din regiunile muntoase ale diferitor continente [30, 84, 97, 102, 208, 229, 285, 329], inclusiv în munții Carpați din România [112] și Ucraina. 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) [229, 237]. Componentii activi, caracteristici speciei *R. rosea*, se acumulează preponderent în rizomi, având proprietăți adaptogene, biostimulatoare și antioxidante. În extractele obținute din rizomii acestei plante au fost identificate substanțe active aparținând diferitor clase de compuși chimici: fenilpropanoide, feniletanoloide, proantocianidine, monoterpene, flavonoide, taninuri și acizi organici [321, 329]. A fost demonstrat că proprietățile curative ale speciei menționate se datorează în mare parte fenilpropanoidelor (glicozide ale alcoolului cinamic – rosavin, rosarin și rosin), feniletanoloidelor (*p*-tirosol și glicozidul său salidrozidul) [208, 215, 259, 285, 322], și terpenelor [30, 208, 229, 308, 320]. Din punct de vedere practic prezintă interes și alte componente ale speciei *R. rosea*: flavonoidele, uleiul volatil etc. [133, 216, 229, 271, 310, 319, 320]. Din cele circa 200 specii cunoscute ale genului *Rhodiola* numai specia *R. rosea* conține rosavin și rosarin. Calitatea extractelor din *R. rosea* sunt standardizate după conținutul de rosavin și salidrozid [30, 90, 305, 330]. Salidrozidul a fost identificat și în alte specii din genul *Rhodiola*, de aceea acest compus nu poate servi în calitate de marker unic al speciei *R. rosea* [315, 323]. 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 [112].

Deși rădăcina de aur se cultiva în mai multe zone ale fostei Uniuni Sovietice [102], precum și în Suedia, Polonia [100, 102] și Germania [102], 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 [156], recolta de rizomi poate fi compromisă de unii factori (lipsa regimurilor agrotehnice bine elaborate, controlului buruienilor, fertilizării etc.) [31, 102]. 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 [7, 314, 321].

Prin urmare, obținerea 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 [17]. Această metodă face posibilă stabilirea și monitorizarea factorilor de mediu favorabili pentru multiplicarea culturilor celulare și acumularea *metaboliților secundari*. Sistemul de cultivare *in vitro* este foarte efektiv, deoarece în condiții naturale plantele medicinale sunt expuse dăunătorilor, condițiilor meteorologice nefavorabile și lipsa disponibilității terenurilor, care afectează în mod negativ productivitatea și calitățile medicinale ale plantelor recoltate [26]. Mai mult decât atât, sporirea acumulării *metaboliților secundari* esențiali în culturile de celule și țesuturi este posibilă prin creșterea cantitativă a biomasei sau prin ameliorarea biosintezei metabolitului dorit [118, 173, 186, 194]. 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 *metaboliți secundari* [29].

În ultimele decenii au fost efectuate multiple cercetări, privind obținerea *MS* caracteristici rizomilor de *R. rosea* pe cale biotehnologică, utilizând cultura celulelor și țesuturilor [173, 194, 277]. Primele rapoarte privind culturile de celule și organe de *R. rosea* în condiții *in vitro* au fost obținute în 1980. În 1981, cercetătorul rus I.V. Alexandrova a obținut primul brevet pentru metoda de regenerare a rădăcinilor de *R. rosea in vitro*. În această lucrare nu a fost furnizată informația cu privire la termenii de inducere a culturii [1981]. Actualmente există un număr limitat de rapoarte privind biosinteza *MS* în cultura de calus și agregate celulare de *R. rosea*. Cercetările efectuate în Finlanda [11, 12] și Polonia [14] au demonstrat că adăugarea unor precursori ai *metaboliților secundari* duce la sporirea acumulării principiilor active în celulele cultivate *in vitro*. În prezent nu există publicații științifice referitor la introducerea în cultura *in vitro* a rădăcinilor izolate ale acestei specii.

Procesele proliferative ale culturilor celulare atât în condiții optimale de creștere, cât și în condiții de stres, sunt însoțite de producerea *speciilor reactive de oxigen (SRO)*, excesul cărora creează condiții de stres în mediul celular. În acest sens, sistemele de apărare antioxidante din celule implică sistemul non-enzimatic, care promovează biosinteza multor *metaboliți secundari* (acizi fenolici, flavonoide, taninuri etc.) pe cale fenilpropanoidică, și un sistem antioxidant bazat pe activitatea enzimatică, localizat în mai multe compartimente celulare. Sistemul enzimatic include enzimele generatoare de H₂O₂, cum ar fi superoxid dismutaza (SOD) și enzimele de captare a H₂O₂ cum ar fi catalaza (CAT) și diferite peroxidaze (PO) etc. [68, 258, 279]. Metabolismul compușilor fenolici în plante se desfășoară cu implicarea unui spectru larg de enzime, precum CAT, PO, polifenoloxidaza (PFO) etc. [68, 258]. PO sunt considerate markeri moleculari ai creșterii și dezvoltării culturii țesuturilor vegetale [167], iar apariția unor izoenzime ale PO a fost stabilită în procesul organogenezei [206, 258] și diferențierii tisulare [51]. Este cunoscut faptul că la plante PO sunt localizate în majoritatea compartimentelor celulare, inclusiv în membranele tilacoidelor cloroplastelor, care se află în stare latentă sau activă. Activitatea enzimei latente poate fi modificată prin diferite metode, inclusiv prin tratarea cu diferite substanțe [115].

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

Reglal 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 *metaboliților secundari* 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 tabelelor, 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.

Capitolul 1 ”**Metabolismul secundar la plante**” este consacrat analizei realizărilor științifice în domeniul studiului biosintezei *MS* în cultura *in vivo* și *in vitro*, mai cu seamă celor caracteristice pentru rizomii plantelor de *R. rosea*. În prima parte a capitolului este analizată informația despre 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 *metaboliților secundari* în plante. În ultima parte a acestui capitol este descrisă specia *Rhodiola rosea* L. ca sursă de *MS* și plantă medicinală foarte valoroasă. Informațiile privind compoziția chimică a rizomilor de *R. rosea*, în deosebi celor din populația carpatină, sunt limitate și incomplete. Componentii activi, caracteristici speciei *R. rosea*, se acumulează preponderent în rizomi, având proprietăți adaptogene, biostimulatoare și antioxidante. Cultivarea plantelor de *R. rosea* în condiții *in vivo* și *in vitro* a fost realizată în mai multe țări și continente, dar problema privind obținerea *metaboliților secundari* caracteristici pentru *R. rosea* rămâne un obiectiv neatins încă. Literatura de specialitate sugerează că cultura *in vitro* reprezintă o metodă importantă 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.

Capitolul 2 ”**Materiale și metode de cercetare**”. În capitol dat sunt prezentate obiectele de studiu, condițiile de introducere, expunere și cultivare ale acestora, procedeele și metodele de

cercetare *in vivo* și *in vitro*. 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*. Pentru inițierea culturii *in vitro* au fost utilizate plantulele sterile, obținute din semințele colectate în Munții Carpați. Cercetările fiziologice și biochimice au fost realizate utilizând materialul biologic obținut în urma introducerii *in vitro* a speciei *R. rosea*: cultura calusului (1) și agregatelor celulare (2) obținute din calus.

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*.

Pentru determinarea parametrilor fiziologici și biochimici caracteristici materialului vegetal de *R. rosea*, cât și studiul influenței factorilor fizici și chimici asupra dinamicii de creștere *in vitro* a culturii de *R. rosea* și acumulării *MS*, a fost utilizată metoda spectrofotometrică UV-VIS, analiza HPLC, electroforeza în gel de PAAG în condiții native și în prezența SDS-lui.

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

Capitolul 3 „Analiza compoziției metaboliților secundari în extractele din rizomii plantelor de *R. rosea* colectate în munții Carpați, România, și celor cultivate în condiții Republicii Moldova”. În acest capitol sunt prezentate rezultatele obținute privind studierea compoziției principiilor active în extractele din rizomii de *R. rosea* colectați din Munții Carpați, masivul Ineu, România, utilizând cromatografia în strat subțire (CSS), cromatografia pe coloană (CC), cromatografia cu lichide de înaltă performanță (HPLC) și analiza spectrofotometrică UV-VIS. În calitate de standarde au fost utilizați acidul galic, *p*-tirosoleul, salidrozidul și rosavinul. De asemenea, sunt prezentate date privind compoziția biochimică a uleiului volatil, obținut din acești rizomi, ea fiind comparată cu cele ale uleiurilor volatile descrise pentru plantele de *R. rosea* colectate în diverse regiuni geografice. La fel, sunt prezentate rezultatele obținute în analizele compoziției extractelor obținute din rizomii plantelor cu vârstă de 4 ani, cultivate în Rezervația Științifică „*Plaiul Fagului*”, raionul Ungheni, Republica Moldova și Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, Ucraina.

Capitolul 4 „**Influența factorilor chimici și fizici asupra creșterii biomasei și acumulării metabolitelor secundari în cultura celulară de *R. rosea***”. Utilizarea culturilor celulare vegetale reprezintă o metodă importantă pentru studiile factorilor, implicați în reglajul proceselor de biosinteză și acumulare a *MS* în plante. În cercetările realizate de noi au fost trasate două obiective principale: elaborarea procedurilor de introducere a culturii *in vitro* (1); studiul influenței precursorilor, factorilor fizici și chimici asupra proliferării celulare și biosintezei *MS*, caracteristici pentru *R. rosea* prin intermediul culturii *in vitro* (2).

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 *in vitro* a culturii de *R. rosea* și acumulării *MS*, au fost orientate spre obținerea unor date cantitative și calitative, privind specificul influenței acestor factori asupra parametrilor menționați. Utilizarea tehnicilor moderne precum analiza HPLC și 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* și a polipeptidelor caracteristice pentru diferite variante a materialului vegetal.

1. METABOLISMUL SECUNDAR LA PLANTE

1.1. Caracteristica generală a metabolismului secundar la plante

Metabolismul reprezintă totalitatea reacțiilor biochimice ce au loc în organism. Compuși care contribuie la procesele de metabolism, numiți metaboliți, în dependență de origine și funcție, pot fi divizați în două categorii majore, și anume *metaboliții primari* și *secundari*. *Metaboliții primari (MP)* sunt esențiali pentru creșterea și dezvoltarea celulei. Aceștia sunt produși în mod continuu, fiind implicați în procesele metabolice primare, cum ar fi respirația și fotosinteza. *MP* implică biosinteza polizaharidelor, proteinelor, lipidelor, ARN-lui și ADN-lui prin utilizarea glucidelor, aminoacizilor, acizilor grași și nucleotidelor comune [218, 283, 293]. Toți acești compuși sunt componentele sau produsele căilor metabolice fundamentale sau ciclurilor, cum ar fi glicoliza, ciclul Krebs și ciclul Calvin [28, 129]. Pe lângă faptul că au roluri fundamentale în creșterea și dezvoltarea plantelor, unii *MP* sunt precursori pentru biosinteza *metaboliților secundari*.

Metaboliții secundari (MS) sunt derivați ai *MP* obținuți în rezultatul reacțiilor de metilare, hidroxilare, glicozilare și altor reacții biochimice [158]. Deși sunt foarte importanți, *MS* au o distribuție mult mai limitată în natură, comparativ cu *MP*, și nu sunt esențiali pentru funcționarea întregii plante [15, 17, 28, 129,]. Aceștia nu sunt sintetizați continuu și adesea sunt produși pe parcursul fazei de non-creștere a celulelor. Dintre *MS* pot fi menționați fenolii, fenilpropanoidele, flavonoidele, uleiurile volatile, terpenele, alcaloizii, steroizii, ligninele, rășinile, etc. Procesele fiziologice și biochimice esențiale la plante sunt prezentate schematic în Figura 1.1.

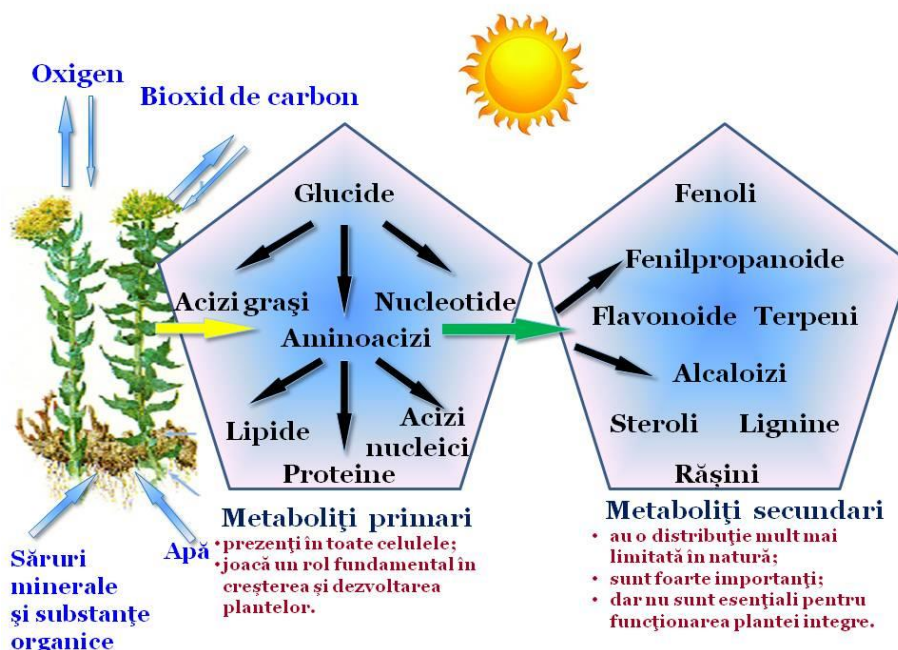


Fig.1.1. Prezentarea schematică a biosintezei *metaboliților primari* și *secundari* în plante.

În figura respectivă sunt trasate legăturile dintre factorii principali ce asigură viața plantelor: factorii externi (lumina, apa, sărurile minerale și substanțele organice din sol) și cei interni (*MP* și *MS*).

Un aspect important îl constituie asigurarea energetică a tuturor proceselor esențiale pentru viața plantei, care se realizează datorită fotosintezei [25] și energiei ce se eliberează în urma degradării *MP* și *MS* [191]. Cel mai important ciclu de obținere a energiei îl reprezintă degradarea hidraților de carbon prin procesul denumit glicoliză (Figura 1.2). Oxidarea secvențială a acizilor grași din grăsimi, numită β -oxidare, prevede de asemenea eliberarea energiei [191].

De-a lungul timpului, viziunile despre rolul *MS* s-a schimbat esențial. La început se considera că ei sunt doar „rămășițe” ale metaboliților în etapele de detoxifiere, izolare sau eliminare din organism. Această viziune a fost expusă de A. Kossel în anul 1891, fiziolog german, considerat a fi primul căruia îi aparține și conceptul de *metabolit secundar* [28]. După altă definiție, *MS* dețin rolul de stocare (acumulare). Ulterior, s-a presupus, că toți *MS* sunt de fapt *MP*, deoarece, nu erau încă cunoscute procesele importante la care participă *MS*. Punctul de plecare pentru dezvoltarea acestei idei a fost descoperirea căii shikimice de biosinteză a compușilor fenolici [22]. Un alt determinativ al *MS* a derivat din rolul protector al compușilor secundari față de diferiți factori de stres abiotici și biotici [82]. Astfel, definiția de *MS* s-a schimbat de-a lungul anilor. Cea mai acceptabilă definiție a *MS* este că ei sunt niște substanțe produse în mod natural și joacă un rol explicit în economia internă a organismului care îi produce [78, 126, 257, 284]. Totodată, funcțiile *MS* sunt diametral diferite față de cele ale *MP*, funcția lor principală fiind menținerea proceselor fundamentale în celulele vegetale și supraviețuirea speciilor în condiții nefavorabile ale mediului înconjurător [15, 78, 126].

Delimitarea între metabolismul primar și secundar nu este absolută, întrucât mulți dintre *MP* intermediari îndeplinesc roluri similare și în cadrul *MS*. Astfel, unii aminoacizi, precum 3- β -alanina și acidul γ -aminobutiric [287], sunt în mod cert *MS*, în timp ce sterolii sunt compuși structurali esențiali ai multor organisme și, în consecință, trebuie considerați *MP*. Prin urmare, suprapunerea funcțiilor biologice ale mai multor componenți ai metabolismului creează o interrelație complexă între metabolismul primar și cel secundar [275].

Din punctul nostru de vedere, o prezentare mai precisă pentru descrierea *MS* este cea propusă de Luckner [178]. După el, pentru *MS* sunt caracteristice următoarele particularități:

- diversitatea structurilor chimice;
- distribuirea limitată în plante;
- formarea enzimelor codificate de materialul genetic special;

- controlul strict al biosintezei *MS* prin reglarea cantității de enzime și a activității lor;
- compartimentarea enzimelor, precursorilor, produselor intermediare și produselor implicate în biosinteză, stocare și defalcare;
- exprimarea metabolismului secundar ca aspect al specializării celulare sau a celulelor formate *de novo* individualizate prin integrarea în procesele de diferențiere și de dezvoltare a organelor producătoare;
- lipsa de importanță a *MS* pentru celula sintetizată în sine, dar esențială pentru întreg organismul.

MP și *MS* vegetali de interes economic au câteva caracteristici comune: majoritatea lor sunt compuși biochimici non-proteici, pot fi extrași din material vegetal prin distilare cu vapori sau prin extracție cu solvenți organici sau anorganici. Pe parcursul ultimilor 20-30 de ani, analiza *MS* a avansat foarte mult. Utilizarea de către cercetători a tehnicilor analitice moderne, precum cromatografia, electroforeza, metoda izotopilor marcați și a enzimologiei, le-a permis să elucideze formulele structurale exacte și căile de biosinteză a *MS* [15, 19, 126].

a. Ciclurile metabolice implicate în biosinteza diferitor grupe de metaboliți secundari

Biosinteza *MS* implică un număr relativ mic de compuși chimici, care ulterior sunt modificați prin diferite cicluri într-un număr nelimitat de substanțe secundare [130]. Există patru cicluri implicate în biosinteza *MS*, fiecare fiind responsabil de biosinteza diferitor clase de compuși: *ciclul shikimic*: fenoli simpli, acizi hidroxicinamici, fenilpropene, fenilpropanoide, flavonoide, lignine, cumarine, naftochinone, antrachinone, taninuri; *ciclul mevalonic* și *ciclul metileritritol-fosfat*: terpene; *ciclul acetat*: alcaloizi. Totodată, după originea lor biosintetică, *MS* se clasifică în mai multe clase, inclusiv clasa fenilpropanoidelor, terpenelor, alcaloizilor etc. Ciclurile respective se desfășoară cu implicarea derivaților esențiali ai intermediarilor acetyl-CoA, acidului shikimic, acidului mevalonic și, respectiv, a metileritritolului-fosfat (Figura 1.2) [79]. În această figură sunt prezentate într-o formă simplificată ciclurile implicate în biosinteza *MS* și interconexiunea acestora cu metabolismul primar.

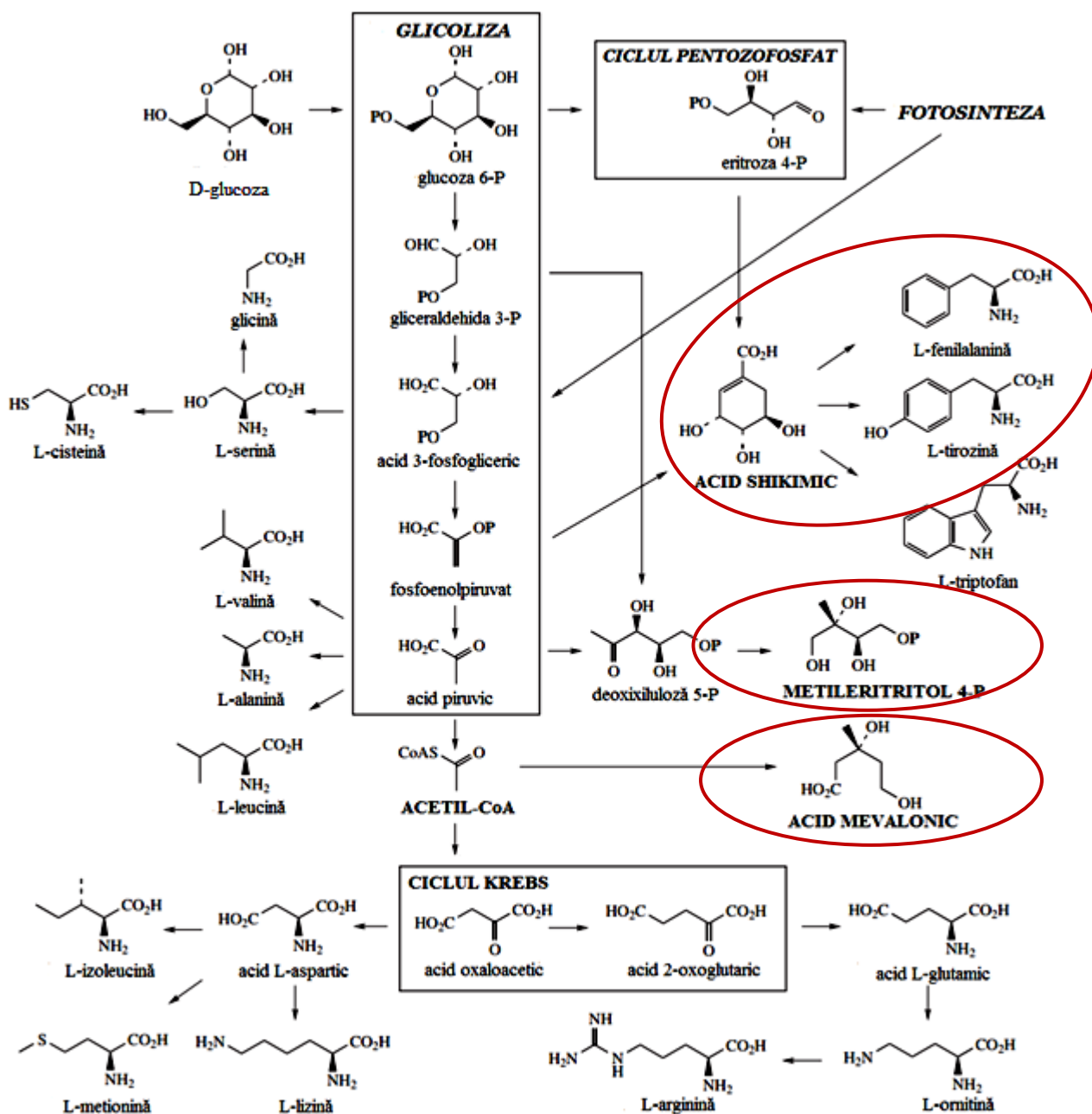


Fig.1.2. Schema simplificată a principalelor cicluri metabolice de biosinteză a *metaboliților secundari* și interconexiunea acestora cu metabolismul primar (adaptată după Dewick, 2009).

Ciclurile metabolice de biosinteză a compușilor fenolici

- *Ciclul shikimic de biosinteză a compușilor fenolici.* Ciclul shikimic se desfășoară prin intermediul ciclizării unor compuși intermediari pseudoaromatici (acidul 2-fosfoenol-piruvic, 4-fosfoeritroza), care conduc la formarea structurii inelului benzoic. Ciclul shikimic include un intermediar-cheie, și anume acidul shikimic. Acesta este principalul precursor al biosintezei aminoacizilor aromatici, cum ar fi L-fenilalanina, L-tirozina și L-triptofanul (Figura 1.2), precum

și a altor compuși ca alcaloizii, fenolii și fenilpropanoidele [213]. Ciclul respectiv este comun pentru biosinteza acizilor aromatici existenți în bacterii, fungi, drozdii, microorganisme și plante, dar nu și pentru regnul animal [193]. Acest ciclu este esențial, deoarece este implicat în generarea de blocuri structurale pentru biosinteza proteinelor, vitaminelor și compușilor purtători de electroni, cum ar fi co-factorii și chinonele [183]. Acidul shikimic a fost izolat pentru prima dată în 1885 de către Eykman din fructele unei specii originare din Japonia *Illicium religiosum* Sieb. [241]. În prezent el reprezintă materia primă pentru sinteza oseltamivirului antiviral - Tamiflu, utilizat în tratarea gripei aviare. Sursa principală de extragere a acidului shikimic o constituie fructele de anason (*Illicium verum* Hook.f.) [79, 138].

Precursorii sintezei acidului shikimic în ciclul respectiv - acidul 2-fosfoenol-piruvic, se formează din acidul 3-fosfoglicerice, iar 4-fosfateritroza se formează prin scindarea produsului de condensare dintre 6-fosfofructoză și 3-fosfogliceraldehidă (Figura 1.2). Astfel, la condensarea celor doi precursori se formează acidul 3-deoxi-D-arabino-2-heptulosonic-7-fosfat (DAHP) (Figura 1.3) [26, 213].

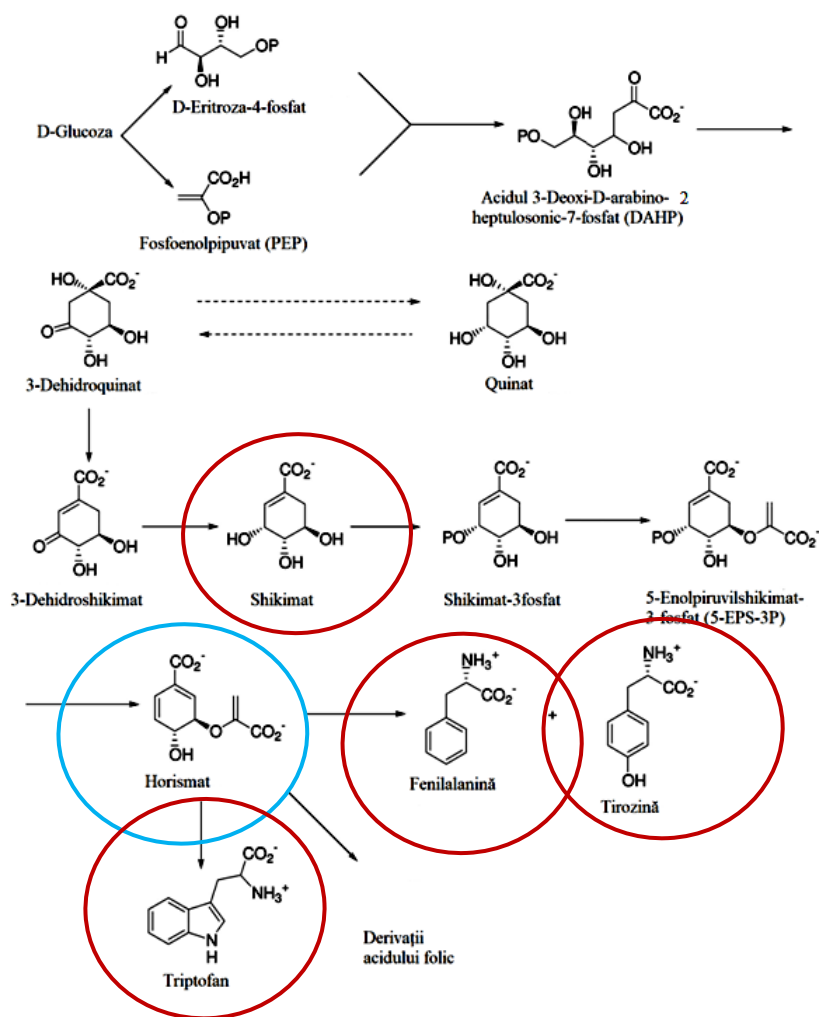


Fig.1.3. Ciclul de biosinteză a acidului shikimic (adaptat după Borah, 2015).

Compusul respectiv reprezintă o combinație de resturi glucidice, care deși au o catenă liniară, atomii de carbon sunt orientați în spațiu după o structură pseudociclică, ce permite ciclizarea ulterioară a catenei. Procesul de ciclizare se petrece în mai multe etape, prin reacții de oxidare și reducere, cu formarea acidului 3-dehidroquinic (Figura 1.3), antrenat ulterior într-un șir de transformări, cu formarea derivaților ciclohexanului. În etapa următoare are loc deshidratarea acidului 3-dehidroquinic cu formarea acidului 3-dehidroshikimic. Acesta din urmă, sub influența enzimei oxido-reducătoare shikimat-dehidrogenaza, se transformă în acid shikimic (Figura 1.3).

Acidul shikimic, spre deosebire de compușii aromatici, conține doar o legătură dublă. Ulterior, în rezultatul unui șir de conversii biochimice, acidul shikimic este transformat în acid horismic, un alt intermediar important, care are deja două duble legături (Figura 1.3).

La etapa respectivă are loc ramificarea ciclului shikimic. Una din căile biosintetice în baza acidului horismic conduce la formarea *L*-triptofanului (și alți derivați indolici), cea de-a doua cale la formarea – *L*-fenilalaninei și *L*-tirozinei. Anume cu a doua cale biosintetică sunt asociate transformările ulterioare, care în final duc la formarea compușilor fenolici în celulele și țesuturile vegetale (Figura 1.3).

Acesta este punctul final al ciclului shikimic, fiind sursa acestor aminoacizi, reprezintă totodată unul din elementele metabolismului celular primar. Transformările specifice secundare conduc spre biosinteza fenolilor.

- *Ciclul metabolic de biosinteză a fenilpropanoidelor.* *L*-fenilalanina și *L*-tirozina sunt precursorii importanți ai multor *MS* în plantele superioare, iar enzimele responsabile de redirectionarea acestor *MP* esențiali în ciclurile metabolice secundare sunt enzimele *L*-fenilalanin-amoniac-liaza (PAL) și tirozin-decarboxilaza (TirDC). Acești precursori formează unitățile de bază ale fenilpropanoidelor (*FP*) C_6C_3 , răspândite în multe produse naturale, precum acidul cinamic, cumarinele, ligninele și flavonoidele. Datorită interesului comercial, privind utilizarea *FP* în domeniul farmacologic și alte domenii industriale, au fost intens studiate funcțiile și ciclul de biosinteză a acestora la multe specii de plante. În schema generală de biosinteză a *FP* (Figura 1.4), aminoacidul aromatic - *L*-fenilalanina - derivat al ciclului shikimic, este supus ulterior transformărilor biochimice, ce constă în dezaminarea lui în reacția catalizată de enzima PAL (EC 4.3.1.5) în acidul *trans*-cinamic.

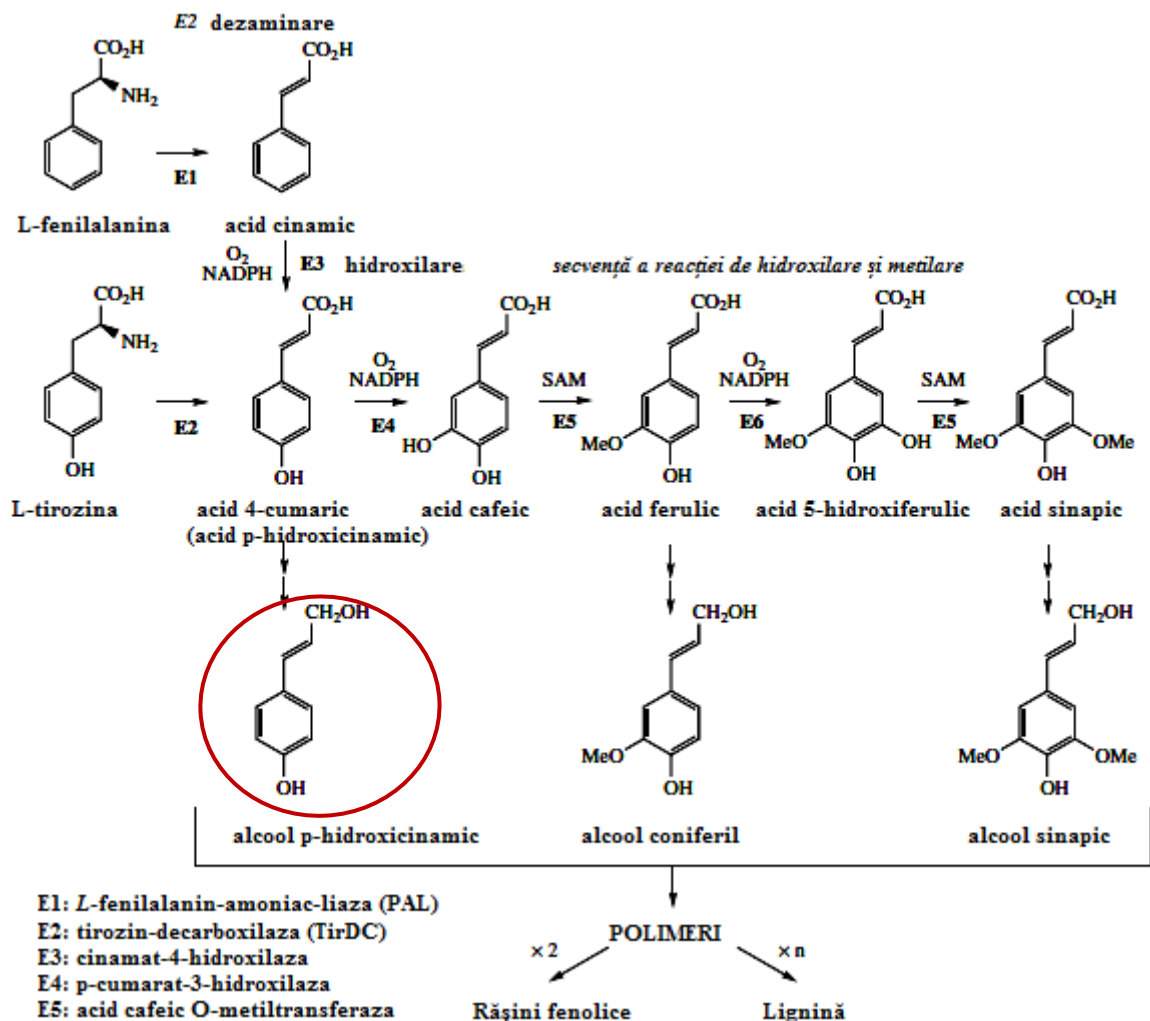


Fig.1.4. Biosinteza derivaților acidului p-cumaric în plante (adaptat după Dewick, 2009).

Ultimul este expus procesului de para-hidroxilare cu cinamat-4-hidroxilază (C4H, EC 1.14.13.11), obținându-se acidul 4-hidroxicinamic (sau acidul *p*-cumaric). Acidul *p*-cumaric este primul, iar din punct de vedere biogenetic, și cel mai simplu compus fenolic, fiind și compusul primordial în biosinteza celorlalți compuși fenolici vegetali (Figura 1.4). În urma transformărilor enzimatică ale acidului *p*-cumaric în celulele vegetale are loc biosinteza derivaților diferitor clase de compuși fenolici. Prin reducerea oxidativă a catenei laterale a acidului *p*-cumaric se formează acetofenonele, acizii fenilacetici, fenilcarbonici. Recuperarea lanțului său lateral, împreună cu dimerizarea sau polimerizarea ulterioară a produsului reconstituit, duce la formarea de lignină și de rășini fenolice - tip lignină.

Ciclurile metabolice de biosinteză a terpenelor

Terpenele, denumite și terpenoide sau izoprene, constituie cea mai mare clasă de metaboliți vegetali raportată până în prezent, care include compuși cu o largă varietate structurală. Acestea

sunt produse de toate organismele vii [65, 222]. Până în prezent au fost identificate mai mult de 45000 de terpene de origine vegetală și acest număr este în continuă creștere [59, 222]. Din zeci sau mii de terpene vegetale, doar câteva pot fi considerate *MP*, considerați esențiali pentru funcționarea plantei întregi, și sunt, prin urmare, comuni tuturor speciilor de plante. Acestea includ molecule implicate în procesele de respirație (ubiquinonele), fotosinteză (clorofilele, carotenoidele, tocoferolii, filoquinonele, plastoquinonele), de reglare a creșterii și dezvoltării plantei (brassinosteroidale, citochininele, giberelinele, acidul abscisic, strigolactonele) etc. (Figura 1.5) [279]. Restul terpenelor sunt metaboliți de specialitate, ale căror biosinteză este de obicei limitată la anumite familii de plante sau chiar la anumite specii [222]. Terpenele de obicei participă în protejarea plantelor împotriva erbivorelor și agenților patogeni, în atragerea polenizatorilor și dispersarea semințelor și ca alelochimicale, care influențează concurența dintre speciile de plante [266]. Un număr mare de metaboliți terpenici au valoare comercială și sunt utilizați în calitate de pigmenți, arome, polimeri sau medicamente [79]. Structurile tipice ale terpenelor conțin schelete de carbon reprezentate prin $(C_5)_n$ unități și sunt clasificate drept hemiterpene (C_5), monoterpene (C_{10}), sesquiterpene (C_{15}), diterpene (C_{20}), sesterterpene (C_{25}), triterpene (C_{30}) și tetraterpene (C_{40}) [79]. Conform regulii izoprenice, toți compușii terpenici derivă din doi precursori comuni ce conțin câte două unități izoprenice legate cap-coadă, și anume din izopentenil-pirofosfat (IPP) și dimetilalil-pirofosfat (DMAPP) (izomerul alilic al IPP) [79, 190]. Biosinteza normală a terpenelor în plante depinde în mod esențial de fluxul de precursori eliberați de nucleul ciclurilor metabolice ale izoprenilor și, în consecință, de reglementarea dinamică a acestor cicluri. În plante, de biosinteza unităților izoprenice sunt responsabile două cicluri independente: *ciclul acidului mevalonic (MVA)* și *ciclul metileritritol-fosfat (MEP)* (Figura 1.2 și 1.5). *Ciclul MVA* oferă predominant precursori de biosinteză a sesquiterpenelor, triterpenelor, brassinosteroidelor. Respectiv, în biosinteza hemiterpenelor, monoterpenele, diterpenelor, tetraterpenelor, carotenoidelor și a produselor de degradare a acestora - citochininelor, giberelinelor, clorofilei, tocoferolilor și plastoquinonelor participă derivați ai *ciclului MEP* [222] (Figura 1.5). Acest ciclu este considerat exclusiv *plastidic*, deoarece setul de enzime implicate în biosinteza *MS* există numai în plastide, datele fiind bazate pe cercetările experimentale și predicțiile localizării lor subcelulare [136, 279]. Spre deosebire de precedentul, localizarea subcelulară a *ciclului MVA* nu este la fel de clară. Din punct de vedere istoric, acest ciclu a fost menționat ca *ciclu citosolic*, iar noile afirmații sugerează că *ciclul MVA* este distribuit între citosol, reticulul endoplasmatic și peroxizomi [11, 222, 248]. Localizarea subcelulară a enzimelor ciclurilor *MEP* și *MVA* în *Arabidopsis thaliana* este prezentată schematic în Figura 1.5.

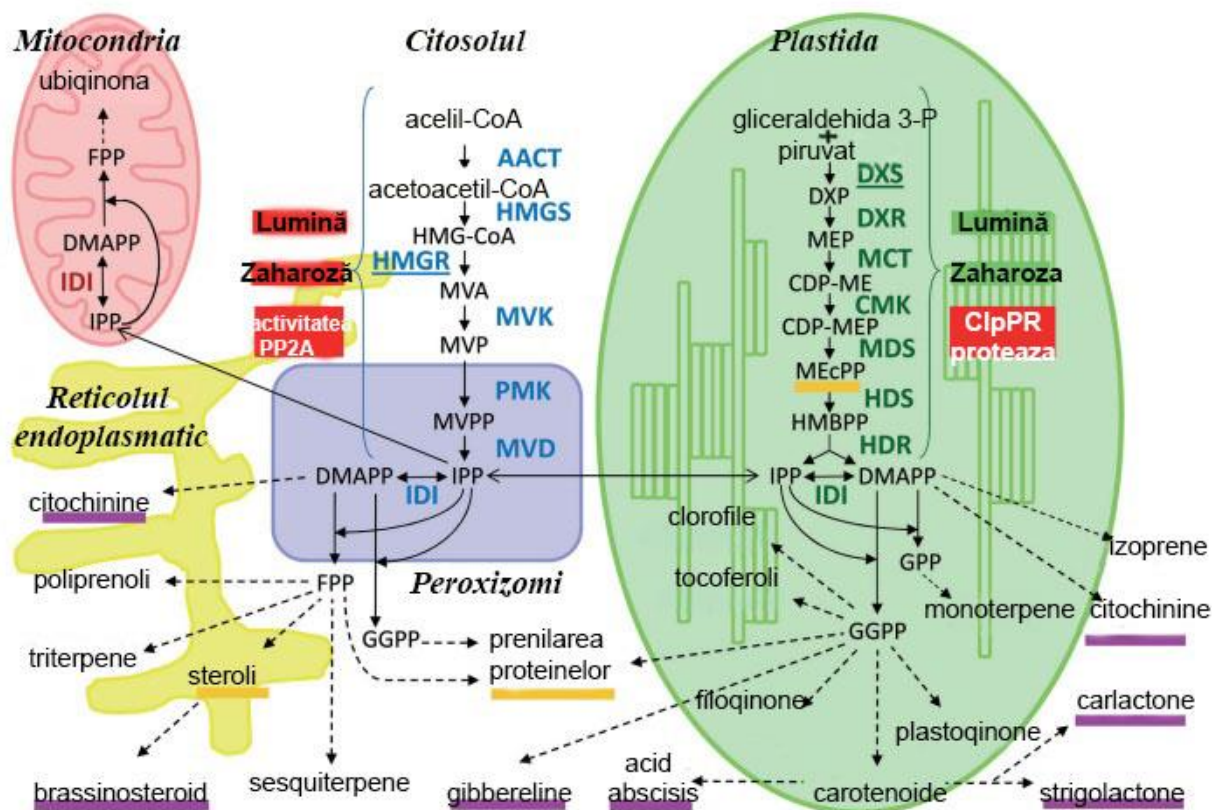


Fig. 1.5. Ciclurile de biosinteză a compușilor izoprenici în celula vegetală (adaptate după Pulido, 2012). Enzimele ciclului MVA sunt reprezentate cu culoare albastră, iar cele ale ciclului MEP cu verde. Terpenele cu roluri de reglementare sunt evidențiate cu mov și, respectiv, cu galben (compuși asemănători hormonilor). CDP-ME -4- (citidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol, CDP-MEP - CDP-ME 2-fosfat, DMAPP - difosfat-dimetilalil, DXP - 1-deoxi-D-xilulozo-5-fosfat, FPP - difosfat-farnesil, GGPP - difosfat-geranilgeranil, GPP - difosfat-geranil, HBMPP - 1-hidroxi-2-metil-2-butenil-4-difosfat, HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, IPP - izopentenil-difosfat, MEcPP - 2-C-metil-D-eritrol-2,4-ciclodifosfate, MEP - 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfat, MVA - acid mevalonic, MVP - 5-fosfomevalonate, MVPP - 5-difosfomevalonate.

• *Ciclul metabolic de biosinteză a acidului mevalonic.* Primul pas în acest ciclu este formarea coenzimei A-(S)-3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG-CoA) prin condensarea acetil-CoA cu acetoacetil-CoA. Următoarea etapă implică reducerea enzimatică ireversibilă a HMG-CoA cu hidrogenul din nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfat (2xNADPH) pentru a obține acidul mevalonic (MVA). Ulterior MVA suferă două fosforilări succesive cu adenozin-trifosfat (2xATP) formându-se 5-pirofosfatul. Etapa următoare implică deja *trans*-eliminarea grupării hidroxil-terțiare și grupării carboxil a 5-pirofosfatului, cu formarea IPP. Această transformare este într-un echilibru cu formarea DMAPP (Figura 1.5) [65, 266, 279]. Enzimele-cheie implicate în ciclul MVA sunt acetoacetil-CoA tiolaza (AACT), HMG-CoA sintetaza (HMGS), HMG-CoA reductaza (HMGR) și mevalonat difosfat decarboxilaza (MPDC sau MVD) [266].

• *Ciclul metabolic de biosinteză a metileritritol-fosfatului.* Izoprenoidele plastidice sunt derivați ai IPP prin intermediul ciclului 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (*MEP*) [111, 222, 233, 266, 279]. Prima etapă a acestui ciclu implică condensarea acidului piruvic (acidul 2-hidroxiopropanoic) și a D-gliceraldehidei 3-fosfat. Reacția inițială este catalizată de 1-deoxi-D-xiluloză 5-fosfat (*DXP*) sintetază (*DXS*) pentru producerea *DXP*. Cea de-a doua etapă constă în rearanjarea intramoleculară și reducerea *DXP* cu ajutorul enzimei 1-deoxi-D-xiluloză 5-fosfat reductoizomerazei (*DXR*) ce duce la formarea 2-C-metil-D-eritritol 4-P (*MEP*) (Figura 1.5). Acesta, la rândul, său este supus în continuare unor serii de reacții pentru a forma IPP. Următorul pas este izomerizarea stereospecifică și reversibilă a dublei legături a IPP care duce la formarea *DMAPP* (Figura 1.5). Acest pas este foarte important, deoarece generează pirofosfatulilic reactiv, ce ajută la unirea a două unități de izopren pentru a forma geranil-pirofosfatul (*GPP*, C10). Farnesil difosfatul (*FPP*, C15) derivă de la două unități de IPP și o unitate de *DMAPP*, geranilgeranil difosfat (*GGPP*, C20) – trei IPP și un *DMAPP* [233, 266]. Biosinteza monoterpenelor utilizează *GPP* ca substrat pentru a sintetiza monoterpene cu structură liniară și ciclică; biosinteza sesquiterpenelor utilizează *FPP*, iar a diterpenelor - *GGPP* [65] (Figura 1.5). Enzimele- cheie implicate în ciclul *MEP* sunt 1-deoxi-D-xiluloză 5-fosfat sintetaza (*DXS*), 1-deoxi-D-xiluloză reductoizomeraza 5-fosfat (*DXR*) și (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfat reductaza (*HDR*) [222, 233, 266, 279].

b. Rolul metaboliților secundari și specificul acumulării lor în plante

Deși doar 20-30% din plantele superioare au fost investigate până în prezent, mai multe zeci de mii de *MS* au fost deja izolați, iar structurile lor au fost determinate prin spectrometrie de masă (*MS*), rezonanță magnetică nucleară (^1H RMN, ^{13}C RMN) sau difracția cu raze X pe monocristal [287]. Rolul *MS* a fost mult timp trecut cu vederea, dar este pe larg recunoscut acum. Ei sunt considerați neesențiali pentru susținerea vieții, dar cruciali pentru supraviețuirea organismului producător [126, 257, 284]. *MS* sunt adesea acumulați de plante în cantități mai mici decât *MP*, aproximativ 1-3% din masa uscată [65, 79], și pot fi identificați numai într-un anumit stadiu al creșterii și dezvoltării speciei sau în cadrul numai unei specii [89, 294], ceea ce face extragerea și purificarea lor dificilă. Deși *MS* sunt cunoscuți de sute de ani și au fost utilizați în calitate de coloranți (de exemplu *indigo*, *shikonin*), aromatizatori (*vanilină*, *capsaicină*, *ulei de muștar*), arome (*ulei de trandafir*, *ulei de levănțică* și *alte uleiuri volatile*), stimulatori (*cofeină*, *nicotină*, *efedrină*), halucinogeni (*morfină*, *cocaina*, *scopolamină*, *tetrahidrocanabinol*), insecticide (*nicotină*, *piperină*, *piretrină*, *rotenon*), toxine umane și pentru vertebrate (*coniină*, *stricnină*, *aconitină*, *colchicină*, *glicozidele cardiace*) și chiar ca agenți terapeutici (*atropină*,

chinină, codeină), funcțiile lor biologice presupuse au fost o chestiune contradictorie [17, 159, 227, 287].

În ecosistemele naturale există un reglaj al efectivelor populațiilor, un control natural, în care intervin factorii interni ai populațiilor respective (factorii endogeni), precum și factorii externi (exogeni). La rândul lor, factorii exogeni pot fi abiotici și biotici. Printre factorii abiotici, cei mai relevanți sunt temperatura, radiația *UV* (afectează fenolii și derivații fenilalaninei), compoziția solului (afectează *MS* ce conțin azot). Unii *MS*, de exemplu flavonoidele, constituie compuși esențiali, ce absorb razele *UV* și totodată manifestă funcții protectoare față de razele respective [287], prevenind astfel fotodegradarea clorofilelor [107, 142], sau chiar distrugerea integrității structurale a cloroplastelor [107]. Efectele biotice însă includ agenții patogeni ai plantelor, precum virușii și bacteriile, dar și animalele erbivore. Pe parcursul perioadelor de stres, cauzate de atacul unor microorganisme, se activează biosinteza *MS*. Printre aceștia au fost descriși *MS* cu acțiune antibiotică, antifungică, antivirală, care sunt capabili de a proteja plantele de agenți patogeni (fitoalexinele) [116, 127]. De asemenea, sunt cunoscuți *MS* cu proprietăți antigerminative, precum monoterpenele, în următoarea ordine a puterii de inhibare: geraniol > carvona > borneol > β -citronelol > α -terpineol > camfor > mentol > mentona > limonen > citral [77]. Totodată, camforul manifestă și efecte toxice (alelopatice) pentru plante [204], care joacă un rol important în interacțiunea cu polenizatorii și cu garnitura de semințe [1]. Adicional, plantele posedă și mecanisme de răspuns la factorii de stres, asemănător sistemului imunitar al animalelor. Ele se bazează pe acțiunea acidului salicilic și jasmonic. Biosinteza acestora pare fără semnificație directă pentru celula sintetizatoare, dar poate fi decisivă pentru dezvoltarea și funcționarea organismului integru.

Unii *MS* determină gustul și aroma fructelor și legumelor, iar eterii, esterii, terpenele etc., prin mirosul lor plăcut, au un rol important în polenizarea plantelor. Pigmenții, care de asemenea sunt produși ai metabolismului secundar, au un rol important în reacțiile de oxido-reducere. Ei determină culoarea florilor, fructelor, legumelor, a tuturor organelor plantelor și au un rol important în procesul de polenizare.

c. Utilizarea metaboliților secundari în medicină

Fenilpropanoidele constituie una dintre cele mai importante grupe de compuși naturali. Ele pot fi găsite într-o mare varietate de plante medicinale foarte prețioase, precum *Echinacea purpurea*, *Rhodiola rosea*, *Silybum marianum*, *Melissa officinalis* etc. *FP* joacă un rol esențial în integritatea plantelor, posedă efect protector contra stresurilor biotice și abiotice [91]. Ele sunt împărțite în mai multe clase majore, precum cumarinele, flavonoidele, acizii hidroxicinamici și

fenilpropenele [278]. *FP* posedă activitate antioxidantă și manifestă efecte benefice pentru sănătatea omului [149, 170]. De asemenea, *FP* sunt cunoscute prin proprietățile antibacteriene, antifungice și antiinflamatorii [76, 87, 158].

Terpenele, fiind sintetizate de către toate organismele vii, reprezintă cea mai numeroasă clasă de compuși naturali. Ele constituie un component esențial al nutriției umane, iar multe dintre aceste substanțe sunt importante din punct de vedere economic ca preparate farmaceutice, substanțe aromatice și potențial biocombustibil de ultima generație [11]. În industria farmaceutică, terpenele au un spectru larg de utilizare, fiind folosite atât ca excipienți pentru îmbunătățirea penetrării pielii, cât și ca principii active medicamentoase [23, 303] cu proprietăți farmacologice anticancerigene, antimicrobiene, antifungice, antivirale, antihiperglicemice, antiinflamatoare etc. [127, 205]. Datele din literatura de specialitate sugerează că cele mai multe dintre materialele studiate descriu profilul analgezic al monoterpenelor și sesquiterpenelor, singure sau în combinație cu alte componente biochimice cum ar fi uleiurile esențiale extrase din plantele medicinale. Aceasta ne confirmă că terpenele reprezintă unii din cei mai importanți compuși pentru ameliorarea durerii [120]. Drept exemple de medicamente de proveniență biologică, comercializate în prezent ca produse terpenice, sunt artemisininul (sesquiterpenoid), taxolul (diterpenoid) și vincristinul (monoterpenoid).

Acizii hidroxicinamici (clorogenic, ferulic, cafeic etc.) și alți hidroxiacizi aromatici (acizii galic și salicilic etc.) sunt cei mai răspândiți acizi fenolici din plantele superioare și acționează ca precursori biogenetici în biosinteza celorlalți compuși fenolici vegetali (Figura 1.4 și 1.11) Atât acizii, cât și derivații lor sunt antioxidanți puternici, care posedă proprietăți antiradicale pronunțate în testările *in vitro*. Activitățile lor imunostimulatoare, antivirale și antiinflamatorii sunt foarte bine studiate. A fost stabilit efectul colagenic pronunțat al acizilor ferulic, cafeic și clorogenic. Totalitatea acizilor cafeic, clorogenic, ferulic, cumaric și altor acizi hidroxicinamici este esențială în prevenirea și tratamentul obezității, diabetului și tulburărilor asociate [4], îmbunătățesc funcția renală, stimulează funcția antitoxică a ficatului și au un efect antimicrobian, antimalign [228]. Conținutul ridicat de acizi hidroxicinamici și derivații lor este caracteristic pentru speciile *Echinacea purpurea*, *Rhodiola rosea*, ale căror materii vegetale sunt utilizate pe scară largă în medicină pentru corectarea tulburărilor sistemului imunitar [208].

Deci, evaluarea mecanismelor implicate în acumularea *MS* cu efect benefic pentru ameliorarea sănătății, precum și evidențierea acelor factori exogeni cu efect de stimulare a principiilor active, reprezintă o problemă științifică de importanță semnificativă socială și economică.

1.2. Metode alternative de cultivare a plantelor pentru obținerea *metaboliților secundari*

Mai multe plante au fost evaluate științific, privind posibilitatea aplicării lor în medicină. Asigurarea industriei cu produse naturale active din punct de vedere farmaceutic adesea a fost o provocare datorită ritmului de creștere lentă a unor specii de plante, randamentului scăzut și variabilității imprevizibile în acumularea *MS* [155]. De asemenea se cunoaște că habitatele naturale ale plantelor medicinale sunt pe cale de dispariție rapidă, împreună cu instabilitatea mediului și a geopoliticii [60]. Pe lângă acestea, în special în cazul structurilor foarte complexe, sinteza chimică a *MS* este practic imposibilă din punct de vedere economic. Prin urmare, devine tot mai problematică obținerea mai multor *MS* derivați din plante. Acest lucru a determinat industria și oamenii de știință de a lua în considerare posibilitatea investigării culturilor celulare, ca metodă alternativă de obținere a produselor farmaceutice naturale [17, 80, 83, 201, 240]. Celulele plantelor sunt biosintetic totipotente, ceea ce înseamnă că fiecare celulă introdusă în cultură păstrează informația genetică completă, prin urmare este capabilă de a produce gama de compuși chimici detectați în celulele maternelor.

În ultimii ani, numeroase cercetări au fost dedicate producerii de compuși activi prin culturi de celule și țesuturi vegetale *in vitro*, fiind înregistrate progrese tehnologice remarcabile, astfel că în prezent studiile bazate pe culturi de celule și țesuturi se desfășoară atât la nivel fundamental, cât și sub forma cercetărilor aplicative, care utilizează culturi de celule pe scară industrială, pentru producerea comercială a *MS* [141, 150]. Beneficiul acestor metode este că în final se poate asigura continuu o sursă sigură de produse naturale. Avantajele majore ale culturilor de celule sunt:

- biosinteza *MS* bioactivi efectuată într-un mediu controlat;
- eliminarea influențelor factorilor sporadici, cum ar fi microorganismele, insectele etc., care afectează biosinteza *MS*;
- posibilitatea multiplicării celulelor oricărei plante, tropicale sau alpine, în scopul producerii metaboliților specifici;
- compușii de interferență care apar în plantele cultivate în câmp pot fi evitați în culturile celulare;
- culturile celulare și țesuturile sunt un potențial model pentru a testa acțiunea elicitorilor și precursorilor;
- controlul automat al creșterii celulare și reglarea proceselor metabolice contribuie la reducerea volumului forței de muncă și la îmbunătățirea productivității;
- ciclurile biosintetice ale culturilor celulare în bioreactoare sunt mult mai rapide decât cele ale plantei în condiții naturale. De exemplu, în cazul shikoninului un ciclu de producție în bioreactoare

durează câteva săptămâni, în timp ce pentru extracția produsului farmaceutic sunt recomandate plantele în vârstă de 5 ani;

- prin selecție clonară și mutagenză se pot izola linii celulare, care sintetizează *MS* în cantități chiar mai mari decât cele prezente în organele specializate ale plantei intacte;
- culturile celulare în suspensie pot fi utilizate și pentru biotransformarea unor substraturi pentru obținerea unor noi compuși neidentificați în natură sau pentru producerea unor enzime utilizate ulterior în sinteza chimică a compușilor naturali.

În timp ce cercetătorii au reușit să producă până în prezent prin culturi de calus sau de celule vegetale diverși *MS* valoroși (Tabelul 1.1), în alte cazuri producția necesită plante micropropagate sau culturi de organe diferențiate [232].

Tabelul 1.1. Randamentul obținerii *MS* în culturile celulare vegetale (adaptat după Ruffoni, 2010).

Metabolitul secundar	Specia plantei	Randamentul (% masă uscată)		Tipul culturii *
		Cultura	Planta	
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc	20	1.5	s
Ginsenosid	<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey	27	4.5	c
Antraquinonă	<i>Morinda citrifolia</i> L.	18	0.3	s
Ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i> L.	1.0	0.3	s
Acid rosmarinic	<i>Coleus blumel</i> Benth.	15	3	s
Ubiquinona 10	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	0.036	0.003	s
Diosgenină	<i>Dioscorea deltoidea</i> Wall. ex Griseb.	2	2	s
Alcaloidul benzilizoquinolină	<i>Coptis japonica</i> Makino	11	510	s
Berberină	<i>Thalictrum minus</i> L.	10	0.01	s
Berberină	<i>Coptis japonica</i> Makino	10	2 4	s
Antraquinonă	<i>Galium verum</i> L.	5.4	1.2	s
Antraquinonă	<i>Galium aparine</i> L.	3.8	0.2	s
Nicotină	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	3.4	2.0	c
Bisoclaurine	<i>Stephania cephalantha</i> Hayata	2.3	0.8	s
Triptiolid	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook.f.	0.05	0.001	s

*s - suspensie celulară; c – calus

Această situație apare adesea, atunci când metabolitul de interes este produs numai în țesuturile vegetale sau glandele specializate ale plantei. Un prim exemplu este ginsengul (*Panax ginseng*), unde saponina și alți metaboliți valoroși sunt produși în mod special în rădăcinile de ginseng. Prin urmare, inducerea culturii de rădăcini izolate *in vitro* a fost un procedeu indispensabil. Însă, pentru a regla metabolismul secundar în culturile de țesuturi și celule vegetale, care vizează obținerea unei producții maxime de compuși utili, este important de a stabili în primul rând care sunt mecanismele implicate aceste sisteme de cultură.

a. Obținerea metaboliților secundari prin metode biotehnologice

În prezent un rol important în cercetarea mecanismelor de reglare și obținere practică a *MS* reprezintă metodele biotehnologice de cultivare a calusului și agregatelor celulare. Culturile celulare vegetale includ în principiu câteva abordări esențiale. Și anume, cultura calusului, cultura celulelor (în suspensie sau agregate) și cultura celulelor diferențiate [150, 201, 226]. Culturile celulare sunt produse în mod obișnuit în condiții sterile din fragmente ale plantei întregi. Aceste fragmente, denumite explante, pot constitui bucăți de organe, cum ar fi frunzele sau rădăcinile, sau pot fi tipuri de celule specifice, cum ar fi polenul sau endospermul. În general, țesutul tânăr, fiind în creștere rapidă sau prelevat într-un stadiu mai timpuriu de dezvoltare, este cel mai eficient explant.

Creșterea culturilor de calus și celule vegetale este determinată prin tehnici standard (determinarea masei proaspete și masei uscate, indicelui de creștere etc.) [234], iar conținutul metaboliților prin metode analitice specifice (colorimetrică, HPLS, GC, ELISA etc.) [8]. Fiind inițiate, culturile de calus și celule vegetale sunt menținute în condiții controlate cu factori optimizați și subcultivate periodic pe medii nutritive proaspete. Perioada optimă de subcultivare variază în fiecare caz individual. În general, sunt prelevate probe din fiecare subkultură și sunt utilizate pentru determinarea modificării creșterii și producerii metaboliților. Se menționează că diferite chemotipuri co-habitează în țesut [251], iar selecția repetitivă a celor mai productive celule este esențială pentru a evita proliferarea exagerată a celulelor mai puțin producătoare în inițierea culturilor productive [109, 280].

Specificul inițierii culturii calusului. Caracteristica principală a celulelor vegetale este plasticitatea înaltă pentru diferențiere celulară. Ca răspuns la rănire sau infectare cu patogeni, plantele generează mase de celule dezorganizate, cum ar fi calusul sau tumorile. După descoperirea revoluționară, precum că cultura de calus poate fi generată în condiții artificiale *in vitro* și că echilibrul dintre doi fitohormoni, auxine și citochinine determină starea de diferențiere și dediferențiere [252], cultura de calus a fost pe larg utilizată atât în cercetările fundamentale, cât și în aplicațiile industriale [28]. Calusul poate fi produs de o singură celulă diferențiată, iar majoritatea celulelor, fiind totipotente, sunt capabile de a genera plantule în întregime (Figura 1.6) [256].

Aplicarea exogenă a auxinelor și citochininelor a indus formarea calusului la diferite specii de plante, prin cultivarea pe mediu semisolid. La general vorbind, un raport intermediar de auxine și citochinine inițiază inducția calusului, în timp ce un raport ridicat de auxine și citochinine sau citochinine și auxine va induce regenerarea rădăcinilor și, respectiv, a lăstarilor [252].

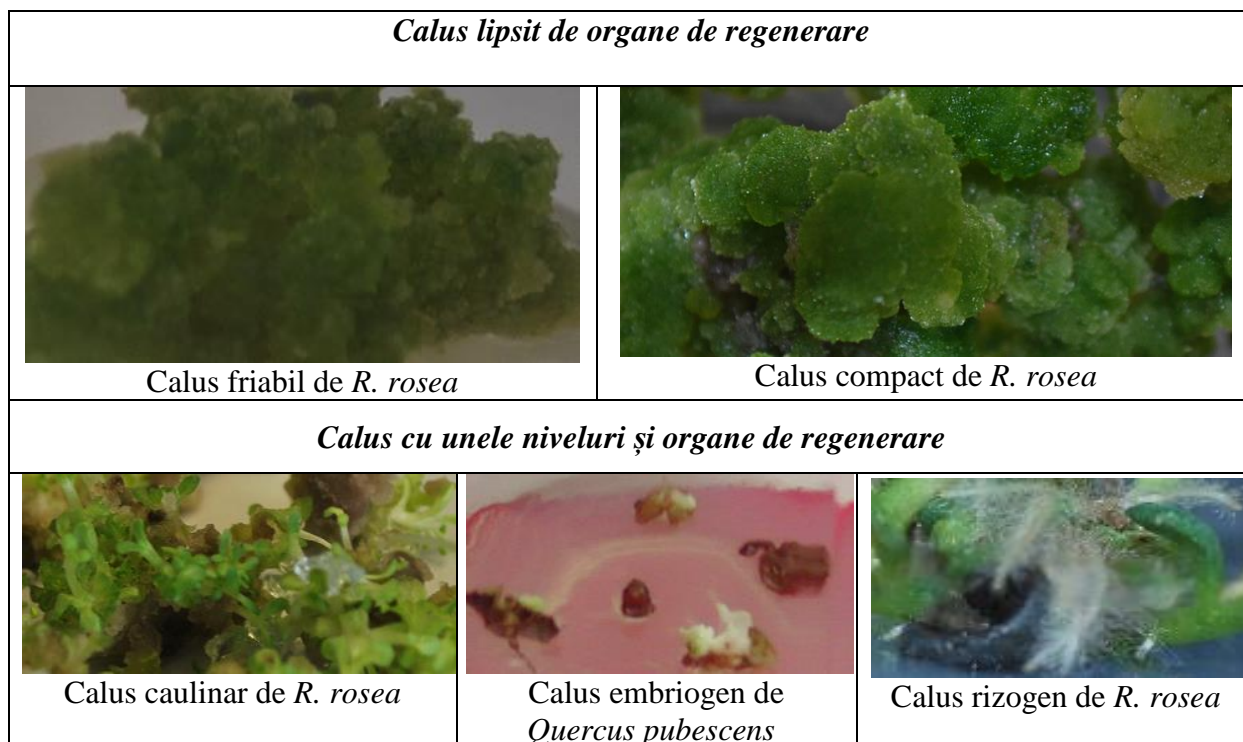


Fig. 1.6. Ilustrarea schematică a diferitor tipuri de calus (imaginile prezentate au fost obținute de noi la diverse culturi).

Alți hormoni, cum ar fi brassinosteroidele sau acidul abscisic, de asemenea induc formarea calusului, iar în unele specii pot substitui chiar auxinele și citochininele în formarea calusului [139]. Cu toate acestea, auxinele și citochininele sunt indiscutabil cei mai extensiv utilizați și cercetați fitohormoni în contextul formării calusului și regenerării organelor ulterioare.

Specificul generării și cultivării agregatelor celulare. După efectuarea screening-ului și selecției liniilor producătoare, cultura de calus este utilizată pentru inițierea culturii de celule (în suspensie sau agregate). Aceste sisteme sunt cele mai recomandabile pentru realizarea unui proces de producție la scară largă. Cultura de celule este generată prin transferarea unei porțiuni a calusului relativ friabil în mediul lichid și menținerea în condiții adecvate de aerare, agitare, iluminare, temperatură și alți parametri fizici. Cultura de celule din mediul lichid are avantaje în comparație cu cultura sub formă semi-solidă. În primul rând, suprafața de contact al celulelor cu mediul de cultivare este mult mai mare, și, prin urmare, nutrienții vor fi utilizați mult mai ușor de către celule și cu o eficiență mai sporită [134, 202]. În al doilea rând, compușii nocivi, formați pe parcursul cultivării, pot fi diluați în mod eficient pentru a evita inhibarea creșterii ulterioare. În al treilea rând, în sistemul de cultură lichid, mediul de cultivare este bine agitat, iar oxigenul dizolvat poate fi monitorizat și controlat în mod independent de condițiile de climă și sol [150]. Această tehnică prezintă o alternativă mai accesibilă pentru plantele dificil de cultivat și/sau au o perioadă

de cultivare mai îndelungată [134]. Ciclurile rapide și scurte de creștere a culturilor de celule *in vitro* fac posibilă producerea de noi *MS* la scară industrială, devenind în cele din urmă o sursă continuă, fiabilă a produselor naturale [226]. De asemenea, producerea și acumularea *MS* în culturile de celule este îmbunătățită prin manipularea micromediilor chimice și fizice și selectarea clonelor celulare cu randament înalt. Densitatea inițială a inoculului este un factor-cheie în stabilirea culturii de celule din orice specie de plante, deoarece celulele nu pot relua sau chiar opri creșterea lor activă după transfer, dacă densitatea inoculului inițial este sub densitatea celulelor critice.

Pentru cultivarea în masă a celulelor vegetale au fost folosite diferite tipuri de bioreactoare. Prima aplicare comercială a cultivării pe scară industrială a celulelor vegetale a fost efectuată în reactoare tip rezervor cu agitare de 200 rot/min și capacitate de 750 litri pentru a produce shikonina prin cultură celulară de *Lithospermum erythrorhizon* [212]. Celule de *Catharanthus roseus*, *Dioscorea deltoidea*, *Digitalis lanata*, *Panax ginseng*, *Taxus wallichiana*, *Podophyllum hexandrum* și *Rhodiola rosea* au fost de asemenea cultivate în diferite bioreactoare pentru producerea *MS*.

b. Creșterea biomasei și acumularea metaboliților secundari în cultura in vitro în dependență de compoziția mediilor și influența factorilor fizici

Culturile celulare vegetale reprezintă un potențial enorm privind acumularea biomasei și producerea *MS* care sunt influențate de un șir de factori fizici și chimici [8, 184]. Compoziția mediului de cultivare, condițiile de cultură și combinațiile exogene ale reglatorilor de creștere luate împreună influențează acumularea metabolitului în celulă. Compoziția mediului este un factor fundamental și critic care afectează fiziologia și metabolismul culturii celulare [201, 226].

Influența compoziției mediului nutritiv asupra culturii in vitro. Un parametru important în tehnologia de cultivare a culturilor celulare vegetale reprezintă optimizarea mediului de cultivare. Deși mediul Murashige-Skoog [200] este unul dintre cele mai utilizate pentru creșterea rapidă a calusului, acesta nu a fost remarcat ca mediu ideal pentru inducerea acumulării *MS*. Compoziția macro- și microelementelor în mediul de cultivare a culturilor celulare are un efect primordial atât asupra metabolismului primar și secundar al celulelor vegetale, cât și în mediul celular care conduce la diviziunea rapidă a celulelor. De asemenea, compoziția macro- și microelementelor limitează staționarea precoce a creșterii exponențiale, fiind considerată necesară pentru biosinteza *MS*. Culturile celulare sunt, la fel, influențate de glucidele simple ca sursă de carbon împreună cu contribuția anorganică a altor substanțe nutritive [226].

- *Reglatorii de creștere.* După cum a fost menționat mai sus, reglatorii de creștere ocupă poziții cheie în procesele de multiplicare celulară și în creșterea acestora. Ei sunt specifici în acțiunea lor și reglementează extinderea și diviziunea celulară, diferențierea celulelor, organogeneza, senescența și latența celulară [302]. Tipul și concentrația de auxină și citochinină sau raportul auxină/citochinină modifică dramatic atât creșterea, cât și biosinteza *MS* în culturile celulare vegetale [185]. De exemplu, acidul β -indolilacetic (AIA) și chinetina (Kn) a sporit creșterea biomasei și conținutul de antociane în cultura suspensiilor celulare de *Daucus carota* [223, 242], iar acidul 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D) a îmbunătățit producția carotenoidelor în această cultură. În schimb, 2,4-D a inhibat producția de nicotină din *Nicotiana tabacum* [235].

- *Introducerea precursorilor.* Pe baza cunoștințelor despre ciclurile metabolice, introducerea precursorilor sau compușilor structural înrudiți cu *MS*, detectați în culturile celulare vegetale, este cea mai eficientă strategie pentru sporirea biosintezei *MS* în celulele culturilor de țesuturi și de celule. Conceptul se bazează pe ideea că orice compus este intermediarul sau inițiatorul unei căi de biosinteză a *MS* și este un procedeu accesibil în creșterea randamentului produsului final [226]. Încercările de a induce producerea *MS* vegetali, prin furnizarea precursorilor sau intermediarilor, au fost eficiente în multe cazuri. De exemplu, Fett-Neto și colab. [92] au raportat că introducerea fenilalaninei, ca precursor al *N*-benzoilfenilizoserinei din catena laterală a taxolului, a condus la ameliorarea și sporirea randamentului de obținere a acestuia din cultura celulară de *Taxus cuspidat* L. [93]. De asemenea, fenilalanina acționează ca un precursor al biosintezei acidului rozmarinic. Introducerea fenilalaninei în cultura de suspensie celulară de *Salvia officinalis* L. a stimulat biosinteza acidului rozmarinic de 10 ori și totodată a redus timpul de producere a lui de la 25 zile până la 10 zile [134]. În plus, adăugarea de leucină a dus la ameliorarea biosintezei monoterpenele volatile α - și β -pinen în cultura de *Perilla frutescens*, în timp ce adăugarea geraniolului în cultura celulară de trandafir a dus la acumularea nerolului și citronelolului [199]. Introducerea în cultura celulară de *Scutellaria baicalensis* a precursorului, precum cinamatul de sodiu și acidul cinamic, a dus la sporirea acumulării flavonoidelor [187]. Pentru sporirea randamentului sintezei *MS* este necesar de a lua în considerare factorii, cum ar fi concentrația precursorilor și timpul (perioada) aplicării lor în mediul de cultivare.

Influența factorilor fizici asupra culturii in vitro. Prin manipularea condițiilor de cultivare, cum ar fi iluminarea, temperatura, pH-ul mediului, au fost găsite variații în proliferarea și biosinteza *MS* în culturile țesuturilor și celulelor vegetale.

- *Influența temperaturii.* La începutul dezvoltării biotehnologiei plantelor a fost investigat efectul temperaturii asupra culturilor de țesuturi și celule în intervalul de 17-25°C, utilizat în mod normal pentru menținerea acestor culturi. Totuși, fiecare specie de plante poate prezenta creștere

și metabolism sporit la diferite regimuri de temperatură. La cultura de *Lavandula vera*, proliferarea maximă a culturii a fost determinată la 30°C, iar acumularea acidului rozmarinic la 28°C [108]. Hoopen a atestat că temperatura optimă pentru producerea ajmalicinei în cultura calusului de *Catharanthus roseus* a fost de 27,5°C [135]. Morris [197], în schimb, a studiat linia celulară C87 de *Catharanthus roseus*, constatând că rata maximă de creștere s-a obținut la temperatura de 35°C, iar randamentul maximal de substanță uscată de 0,47g/g a fost observat la temperatura de 25°C. Scragg și colab.[240] au investigat linia celulară ID1 de *Catharanthus roseus* la temperaturile de 20, 25 și 30°C, însă randamentul maximal de biomasă de 0,65g/g a fost observat la 25°C. Morris [197] de asemenea a mai raportat că temperatura optimă pentru producerea serpentinei este de 25°C și 20°C pentru producerea ajmalicinei.

Shohael și colab. [247] au studiat efectul temperaturilor scăzute (12 și 16°C) și ridicate (30°C) și au raportat că temperaturile joase sau ridicate provoacă diminuarea semnificativă a acumulării biomasei și reduce conținutul fenolilor și flavonoidelor. În același timp, un alt tip de experiențe demonstrează că temperaturile scăzute stimulează acumularea eleuterosidului E în embrionii somatici de *Eleutherococcus senticosus* și corelează cu acumularea sporită a eleuterosidului E după stresul oxidativ.

- *Iluminarea*. Efectul iluminării asupra proliferării culturilor de țesuturi și celulelor vegetale, precum și asupra acumulării MS variază la diverse culturi celulare. Cultura celulară de *Daucus carota* a produs mai multe antociane, în cazul când aceasta este cultivată la lumină [242], iar cultivarea la întuneric este benefică pentru culturile celulare de *Citrus lemon* producând mai multe monoterpene [199].

- *Concentrația ionilor de hidrogen*, pH-ul mediului de cultivare este ajustat de obicei între valorile 5 și 6 înainte de autoclavare, iar valorile extreme ale lui sunt evitate. Modificările pH-lui mediului pe parcursul cultivării se datorează absorbției nutrienților sau ca urmare a acumulării unui metabolit în cultură. De exemplu, McDonold și Jackman [189] au raportat că valoarea pH-lui mediului de cultivare se micșorează din cauza asimilării sărurilor de amoniu și, respectiv, crește datorită eliberării amoniacului rezultat prin reducerea intracelulară a nitraților. În cultura rădăcinilor izolate de *Withania somnifera*, pH-ul inițial al mediului a fost stabilit la valoarea de 5,8, fiind favorabil pentru acumularea biomasei (12,1 g/l masă uscată), iar pH-ul 6,0 a favorizat acumularea în rădăcini a withanolidei A (13,84 mg/g masă uscată) [220]. Cultura rădăcinilor izolate de *Panax ginseng*, în variantele mediilor de cultivare cu pH-ul 6,0 și 6,5, a favorizat atât acumularea biomasei, cât și producția de ginsenozide [250].

- *Iradieră cu raze UV*. Diversi stimulenți externi sunt capabili de a declanșa schimbări la nivelul celulelor vegetale cu inițierea unui șir de reacții. Printre aceștia se numără și razele

ultraviolete (*UV*). Contrar numeroaselor cercetări anterioare asupra razelor ultraviolete (*UV-B*) ce ajung la suprafața Pământului, din cauza epuizării stratului de ozon stratosferic [211], recente investigații au demonstrat că radiațiile *UV-B* sunt un important regulator al metabolismului secundar în plante. Nivelul scăzut al razelor *UV-B* declanșează modificări distincte în biosinteza *MS*, cum ar fi biosinteza compușilor fenolici, carotenoidelor, glicozinolaților etc. Cunoașterea fundamentală a percepției și răspunsului razelor *UV-B* asupra plantelor, deschide noi oportunități pentru manipularea culturilor. Astfel, tratarea cu doze reduse de raze *UV-B*, ca tehnologie emergentă, poate fi utilizată pentru a genera fructe, legume și plante pentru consum zilnic în stare proaspătă sau ca sursă de alimente funcționale sau substanțe biologic active [238].

Iradieră cu raze *UV-B* a culturilor celulare vegetale reprezintă un factor abiotic, ce stimulează biosinteza *MS* [29], și anume sporește activitatea enzimelor ciclului fenilpropanoidic de sinteză a compușilor fenolici, în special a fenilalaninamoniac-liazei. Un astfel de studiu a fost efectuat de către Hao și colab.[128], la nivelul biosintezei flavonoidelor din calusul de *Ginkgo biloba*. Zagoskin și colab, 2003, au studiat două linii de calus de *Camelia sinensis* L., care ca răspuns la iradierea cu *UV* s-au deosebit prin capacitatea de biosinteză, localizarea și acumularea în țesut a compușilor fenolici [299]. Antognoni și colab.[9], au demonstrat că iradierea cu *UV* a calusului de *Passiflora quadrangularis* a sporit activitatea antioxidantă față de cultura netratată de la 28% până la 76%. Iradierea cu *UV* a culturii de suspensie celulară și a numeroșilor lăstari de *Catharanthus roseus* a indicat că induce o creștere considerabilă a producției de alcaloizi indolici terpenoide, împreună cu precursorii dimeri alcaloizi vinblastinul și vincristinul [24]. Alți cercetători, precum Ramani și Chelliah, [224], au expus culturile de suspensie celulară de *Catharanthus roseus* iradierii cu doze mici în faza staționară și au reușit să consolideze substanțial cantitățile de vindolin și catarantine, fără a afecta creșterea celulară și viabilitatea lor. Concentrațiile acestor *MS* au fost identificate după 48-72 ore de la iradierea cu *UV*.

1.3. Implicarea speciilor reactive de oxigen în biosinteza, degradarea și acumularea metaboliților secundari la plante

Mecanismele implicate în biosinteza, degradarea și acumularea *MS* au o importanță majoră în dezvoltarea strategiei de sporire a principiilor active în culturile celulare și plantele medicinale. Procesele proliferative ale celulelor plantelor și culturilor celulare atât în condiții optimale de creștere, cât și în condiții de stres sunt însoțite de modificări ale cantității și calității producerii speciilor reactive de oxigen (*SRO*). Aceștia includ radicali liberi, cum ar fi anionul superoxid (O_2^-), radicalul hidroxil (OH^\bullet) și forme non-radicale (H_2O_2 , O_2) [96, 131, 236]. *SRO* sunt produse în

mod constant în cloroplaste, mitocondrii și peroxizomi prin intermediul proceselor aerobe [10]. Sistemele de apărare antioxidante din celule implică sistemul non-enzimatic, care promovează biosinteza multor *MS* (acizi fenolici, flavonoide, taninuri etc.) pe calea fenilpropanoidică, și un sistem antioxidant bazat pe activitatea enzimatică. Sistemul enzimatic include enzimele generatoare de H_2O_2 , cum ar fi superoxid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1.) și enzimele de captare a H_2O_2 , cum ar fi catalaza (CAT, EC 1.11.1.6) și peroxidaza (PO, EC 1.11.1.7) etc. [68, 258]. Redox homeostaza în celulele plantelor este menținută de echilibrul între generarea *SRO* și mecanismele de anihilare a lor [10]. Condițiile de stres biotic și abiotic generează sporirea nivelului *SRO*, ceea ce duce la modificarea homeostazei redox celulare. Supraproducția *SRO* duce la deteriorări oxidative, cum ar fi peroxidarea lipidică a membranelor celulare [143] sau chiar la moartea celulară. De exemplu, radicalul superoxid poate distruge aparatul fotosintetic, provocând daune în producerea de *MP*, ceea ce împiedică creșterea și dezvoltarea plantelor și poate duce la moartea celulelor. De asemenea, radicalul superoxid (O_2^-) și H_2O_2 servesc ca molecule importante de semnalizare în creșterea și diferențierea plantelor [253]. În cazul rizogenezei, a fost demonstrat că *SRO* sunt implicate în formarea centrilor de dormitare [147], alungirea rădăcinilor [175], dezvoltarea rădăcinilor izolate [95] și diferențierea xilemului [269].

Biosinteza *MS*, indusă de factorii de stres, nu este similară pentru toate speciile și reprezintă un obiect de studiu important și în continuare. Cu toate acestea, culturile celulare se pot adapta la mediul corespunzător prin intermediul unor mecanisme biochimice și genetice, ce pot fi benefice pentru supraviețuirea lor, precum și pentru obținerea *MS*. Metabolismul compușilor fenolici în plante se desfășoară cu implicarea unui spectru larg de enzime, precum CAT, PO, polifenoloxidaza (PFO) etc. [68, 258]. PO este implicată în multe procese fiziologice din plante, cum ar fi degradarea H_2O_2 , îndepărtarea compușilor toxici, apărarea împotriva insectelor erbivore și multe alte răspunsuri legate de stres [171]. De asemenea, PO este considerată un marker molecular al creșterii și dezvoltării culturii țesuturilor vegetale [167], iar apariția unor izoenzime ale PO a fost stabilită în procesul organogenezei [206, 258] și diferențierii tisulare [51]. În general, în condiții de stres atât plantele, cât și culturile celulare își măresc activitatea enzimatică, ce duce la biosinteza *MS*.

După cum a fost menționat în *p.I.I*, în baza ciclurilor de biosinteză, *MS* sunt clasificați în trei grupuri principale: compușii fenolici (fenilpropanoide și flavonoide), terpeni și compușii ce conțin azot (alcaloizi, glicozide, glucozinolați și glicozide cianogene). Acumularea *MS* se datorează creșterii activității enzimelor, precum *L*-fenilalanin-amoniac-liaza (PAL)(EC 4.1.3.5.) și chalcon sintetaza (CHS)(EC 2.3.1.74). Ambele enzime sunt enzime-cheie în biosinteza

flavonoidelor și pot afecta activitatea în funcție de stresul mediului [27]. PAL este principala enzimă în calea fenilpropanoidelor și una dintre cele responsabile pentru biosinteza polifenolilor (Figura 1.7). Ea catalizează dezaminarea *L*-fenilalaninei pentru producerea acidului *trans*-cinamic, intermediar în biosinteza fenolilor [81] pentru anihilarea *SRO* în plantele supuse stresului.

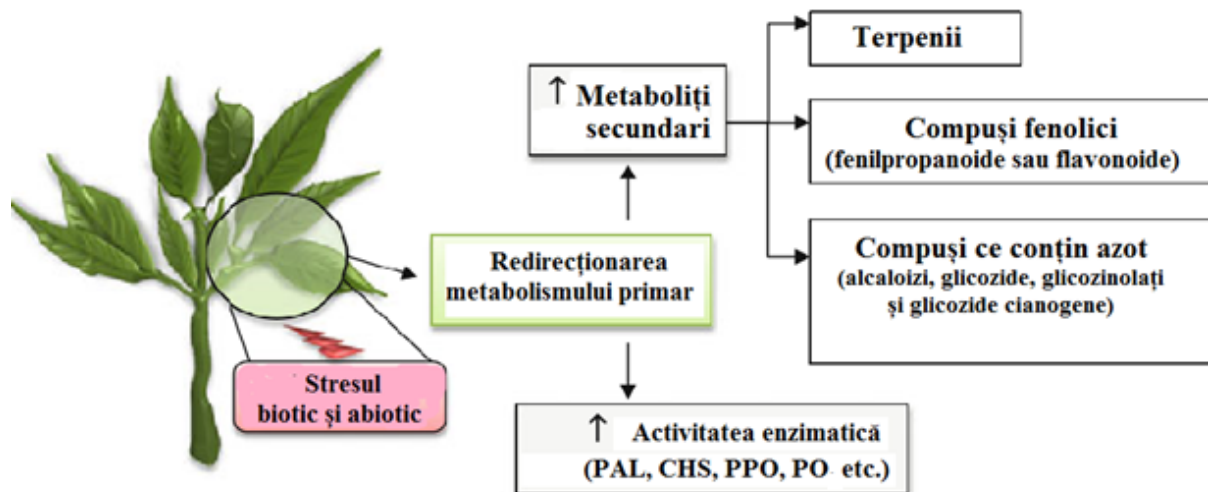


Fig.1.7. Influența stresului biotic și/sau abiotic la redirecționarea metabolismului primar al plantelor către ciclurile de biosinteză ale metabolismului secundar (adaptă după Borges, 2017).

De asemenea, compușii fenolici asigură un șir de funcții fiziologice privind supraviețuirea plantelor și au importanță fundamentală în apărarea plantelor de modificările de mediu induse [276].

1.4. *Rhodiola rosea* L. – sursă de metaboliți secundari importantă pentru medicină

Rhodiola rosea L. (sinonim *Sedum rhodiola*, *S. rosea* (L.) Scop.), cunoscută și sub denumirea de „rădăcină de aur”, „rădăcină arctică” sau „rădăcină de trandafir”, este o plantă ierboasă perenă, dioică din familia *Crassulaceae*, cu un polimorfism foarte evidențiat [30], care crește în crăpăturile rocilor din regiunile muntoase. Specia *R. rosea* se întâlnește în flora spontană la altitudini mari, precum și în regiunile reci ale continentului Asia, Europa și America (Figura 1.8) [30, 84]. În Asia continentală se întâlnește abundent în munții Altai, situați între Mongolia și Siberia [97, 102]. În Europa continentală, este larg răspândită în Islanda și Insulele Britanice, între Scandinavia și alte zone muntoase, precum Pirinei, Alpi și munții din regiunea balcanică [30, 208, 285].

În Carpații din România, specia *R. rosea* a fost întâlnită în munții Bucegi, Călimani, Rodnei, Făgăraș, Ceahlău, Rarău și Maramureș [112]. Mai mult decât atât, unele varietăți de

Rhodiola au fost găsite în diferite regiuni de înaltă altitudine din Alaska, Canada și alți munți de pe continentul nord-american [30]. Condițiile de creștere se caracterizează prin factori climaterici duri și accidentali, plantele fiind expuse diferitor condiții de stres, inclusiv altitudini înalte (între 1000 și 5000 m) [229], temperaturi extreme și radiații ultraviolete intense. Potrivit datelor GBIF [2010], genul *Rhodiola* conține 136 de specii acceptate în compartimentul „Lista Plantelor” de pe site-ul <http://data.gbif.org> [137].

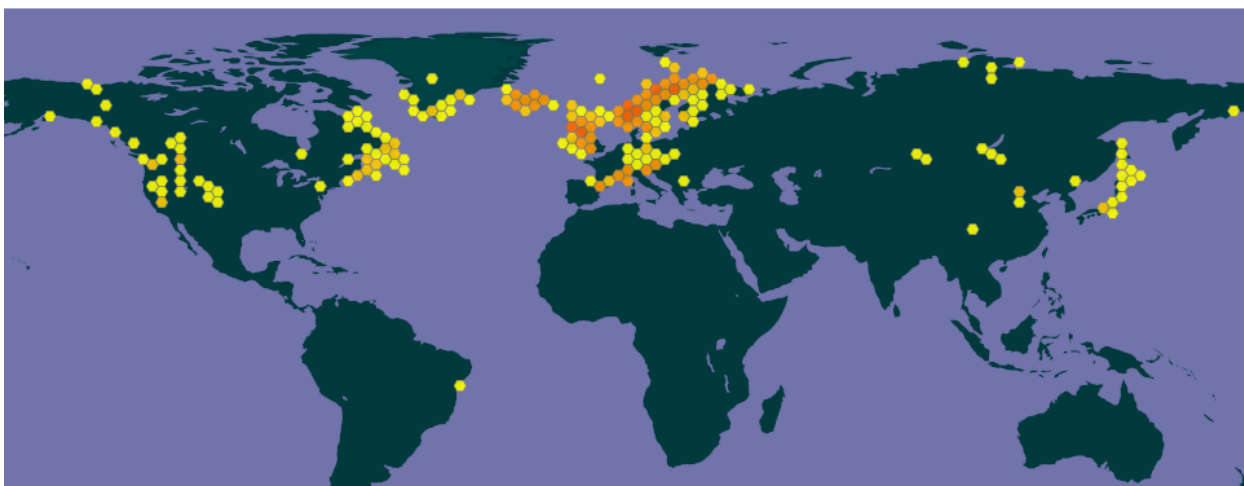


Fig. 1.8. Distribuția geografică a speciei *R. rosea* (GBIF, Portal data, 2017).

R. rosea este considerată plantă sacră și este utilizată în medicina populară de sute, ba chiar de mii de ani. Proprietățile sale medicinale au fost descrise de Pedanius Dioscorides, medicul, farmacologul și biologul grec din Armata Romană [180]. Romanii și grecii antici o foloseau pentru combaterea oboselii, iar vikingii pentru creșterea rezistenței și împotriva mahmurelii, în timp ce eschimoșii și laponii o consumau după vânătorile lungi și extenuante, în drum spre casă. Cu toate acestea, renumele *R. rosea* a fost câștigat în Orientul Îndepărtat și Siberia. În aceste regiuni a fost utilizată pentru a spori rezistența fizică, productivitatea muncii, longevitatea, rezistența la altitudini și în tratamentul oboselii, depresiei, anemiei, impotenței, bolilor gastrointestinale, infecțiilor și tulburărilor sistemului nervos [30, 102, 152], mai este utilizată și pentru tratarea bolilor mentale [30]. Pentru o scurtă perioadă de timp, s-a crezut chiar că este un antidot pentru ciumă. Rețeta extractului din această plantă a constituit, timp de secole, un secret bine păstrat, știut doar de cunoscători.

În 1961, Krîlov, profesor la Academia Rusă de Științe, a desfășurat o expediție în Munții Altai. Acesta a descoperit că misterioasa rădăcină de aur, planta cu puteri tămăduitoare miraculoase, este *R. rosea*. După această descoperire, specialiștii au început să studieze planta în profunzime, cu utilizarea metodelor științifice standard. S-a dovedit că extractul din această plantă

este un adaptogen puternic. Termenul de adaptogen a fost introdus pentru prima dată de către Lazarev în 1949 [207] și reprezintă un agent fiziologic care crește în mod natural rezistența organismului în fața stresului fizic și emoțional. Datorită acestor proprietăți, *R. rosea* a fost folosită în cadrul programului sovietic de cercetare spațială din 1960 și a devenit rapid una dintre panaceele folosite de astronauți [102]. Pe lângă efectul adaptogen al *R. rosea*, au fost descrise și alte efecte terapeutice, cum ar fi cardioprotector, hepatoprotector, antioxidant, stimulator asupra sistemului nervos (efecte asupra funcțiilor cognitive precum atenția, memorarea), împotriva oboselii, antidepresiv și anxiolitic, totodată prelungește durata vieții [208]. Acțiunea adaptogenă și stimulantă asupra sistemului nervos central al *R. rosea* se datorează capacității acesteia de a influența activitatea unor monoamine biogene, cum ar fi serotonina, noradrenalina și dopamina.

Numeroase cercetări privitor la acțiunea *MS* și efectele farmacologice ale plantei *R. rosea* au fost însoțite și de cercetări referitoare la dezvoltarea biologică a plantelor [161, 313], introducerea în cultură [312, 333], germinarea semințelor [160, 329], calitatea materiei prime [315, 322, 323], culturii de țesuturi [325] și micropropagare [162, 304, 312]. În Occident această plantă a fost descoperită abia în anii 90, deoarece majoritatea cercetărilor au fost publicate în limba slavonă.

a. Conținutul metaboliților secundari caracteristici pentru rizomii de R. rosea. Dintre organele plantei *R. rosea* se evidențiază rizomul, care reprezintă cea mai mare parte din masa totală a plantei, în care se realizează biosinteza și acumularea substanțelor biologice active. Investigațiile privind spectrul fitochimic al extractului din rizomii acestei plante au demonstrat prezența a aproximativ 28 de compuși, care sunt clasificați după Brown [30], în șase grupe distincte. Acestea sunt fenilpropanoidele, derivații feniletanolului, flavonoidele, acizii fenolici (hidroxicinamici), monoterpenele și triterpenele [319, 320, 321, 329]. Fenilpropanoidele: **rosavinul**, **rosinul**, **rosarinul**, [271, 321, 310], cinamil-(6'-O- β -xilopiranozil)-O- β -glucopiranozid 4-metoxi-cinamil-(6'-O- α -aranopiranozil)-O- β -glucopiranozida, picein și benzil-O- β -glucopiranozida [271] reprezintă glicozidele acidului cinamic (Figura A1.1). Derivații feniletanolului includ în primul rând **p-tirosolul**, care este un aglicon și, respectiv, glicozidul său – **salidrozidul** (rodiolozid) (Figura A1.1).

- *Ciclul ipotetic de biosinteză a salidrozidului.* Salidrozidul este un β -D-glicozid sintetizat prin glicolizarea *p*-tirosolului [317, 331], care se acumulează preponderent în rizomii și rădăcinile de *R. rosea*. Pe parcursul mai multor ani ciclul de biosinteză a salidrozidului a fost neclar [173], iar reglarea lui nu foarte bine înțeleasă [16, 182]. În literatura de specialitate sunt descrise două cicluri de formare a *p*-tirosolului. Primul ciclu implică conversia *L*-tirozinei în tiramină de

către tirozin-decarboxilază (TDC) (Figura 1.9) și transformarea ulterioară consecutivă a tiraminei în tirosol de către tiraminoxidază (TIO) și alcooldehidrogenază (ADH) [16]. Al doilea ciclu presupune biosinteza tirosolului de către decarboxilază dintr-un precursor al acidului *p*-cumaric, care este derivat al fenilalaninei [181].

Recent a fost elucidat complet ciclul de biosinteză a salidrozidului. Așa dar, pentru biosinteza salidrozidului, tirozina este direct convertită în 4-hidroxi-fenilacetaldehidă (4-HPAA) de către 4-hidroxi-fenilacetaldehid sintetază (4-HPAAS) în celulele plantelor de *R. rosea* (Figura 1.9) [273].

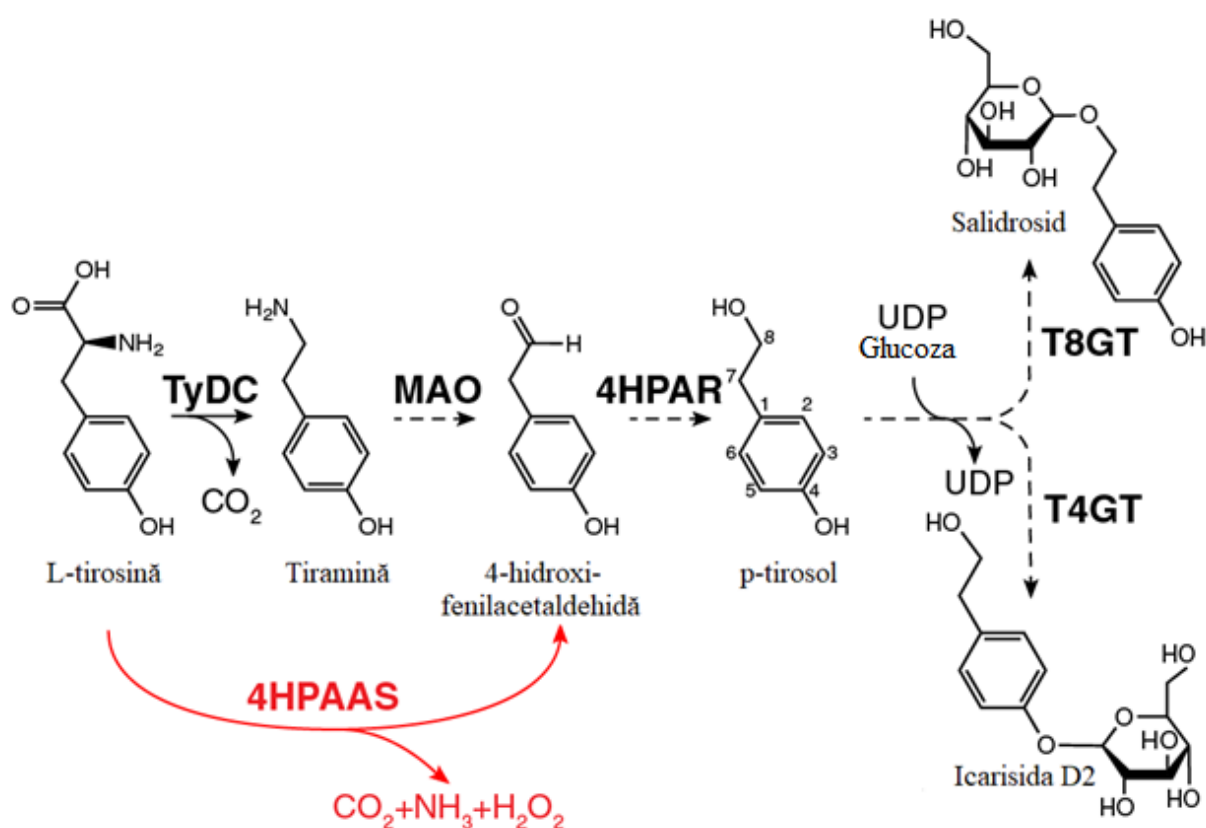


Fig. 1.9. Ciclul de biosinteză a salidrozidului în plantele genului *Rhodiola*. Ciclul propus anterior este reprezentat cu negru, în timp ce calea descrisă recent este evidențiată cu roșu (adaptată după Torrens-Spence, 2018).

Următoarea etapă include reducerea 4-HPAA cu 4-HPAA reductază. Într-un studiu efectuat anterior de Yu și colab. a fost izolată glicoziltransferaza UGT73B6 din *R. sachalinensis*, fiind demonstrat că această enzimă poate transforma *p*-tirosolul în salidrozid [298]. Din aceste motive a apărut interes considerabil și pentru biosinteza *MS* din *R. rosea*, prin modularea expresiei enzimelor endogene sau prin introducerea enzimelor noi [16, 182, 183]. Prin urmare, ultima etapă de biosinteză a salidrozidului reprezintă glicolizarea *p*-tirosolului cu UDP-glicoziltransferaza (UGT73B6) [182, 183, 273, 298] (Figura 1.9.).

Cei mai simpli compuși fenolici care se sintetizează în plantele de *R. rosea* sunt acizii hidroxicinamici, care se formează în rezultatul modificării acidului *trans*-cinamic (Figura 1.4). Printre acizii hidroxicinamici pot fi enumerați **acizii clorogenic, ferulic și cafeic**, iar dintre acizii fenolici – **acidul galic și salicilic** (Figura A1.1) [229, 322].

Nu mai puțin importante sunt și alte grupe de *MS*, precum flavonoidele și terpenele. Un conținut ridicat de **flavonoide** este specific nu numai rizomilor, dar și frunzelor și florilor plantelor de *R. rosea*. Spectrul lor conține glicozide ale herbacetinei, gosipetinei și kaemferolului, precum rhodionin (herbacetin-7-O- α -L-ramnopiranozida), rhodionidin (herbacetin-7-O- α -L-ramnopiranozid-8-O- β -D-glucopiranozida), rhodiolgin (gosipetin-7-O- α -L-ramnopiranozida), rhodioldin (gosipetin-7-O- α -L-ramnopiranozid-8-O- β -D-glucopiranozida), rhodalin (herbacetin-8-O- β -D-xilopiranozida), rhodalidin (herbacetin-8-O- β -D-xilopiranozid-3-O- β -D-glucopiranozida), rhodiosin (herbacetin-(3"-O- β -D-glucopiranozil)-7-O- α -L-ramnopiranozida) și kaempferol-7-O- α -L-ramnopiranozida (Figura A2.1) [311, 317, 318], iar alți zece compuși au fost identificați mai târziu de către Petsalo [216] etc.

Pentru prima dată, din rizomi de *R. rosea*, chimistul rus Куркин В.А., în 1985, a izolat și stabilit structurile chimice a două **monoterpene**, și anume rosiridolul (3,7-dimetilocta-2,6-dien-1,4-diol) și rosiridinul (3,7-dimetilocta-2,6-dien-1,4-diol-1-O- β -D-glucopiranozidă) (Figura A2.2) [320]. Prezența acestor monoterpene a fost confirmată mai târziu și de către Rohloff [229], Brown [30], Panossian [208]. Într-un studiu realizat de Ma și colab. [180], au fost identificate și elucidate structurile chimice a cinci noi glicozide **monoterpenice**, precum rhodiolosidele A-E (Figura A2.2), iar ulterior a fost identificată și **monoterpena** rhodiolosida F de către Ali [6]. De asemenea au fost izolate și stabilite structurile chimice a două **triterpene** daucosterol [30, 308, 320] și β -sitostirol [30, 308].

Rizomii de *R. rosea* se caracterizează printr-o aromă plăcută de trandafir, care se datorează uleiului esențial. În urma analizei compoziției uleiului esențial din rizomi de *R. rosea*, cultivați în diferite zone, au fost identificate numeroase componente. Potrivit lui Rohloff, în compoziția uleiului esențial din rizomii cultivați în Norvegia au fost identificați în total 86 de constituenți [229]. În principal, cele mai abundente substanțe volatile au fost *n*-decanolul, geraniolul, 1,4-*p*-mentadien-7-olul, limonenul, α -pinenul și dodecanolul (Figura A2.3).

Geraniolul a fost identificat ca cea mai importantă aromă asemănătoare trandafirului, alături de formatul și acetatul de geranil, alcoolii benzilici și fenilici. Notele florale, cum ar fi linalolul și oxizii săi, nonanalul, decanalul, nerolul și alcoolii cinamici, accentuează aroma florală a rizomilor de *R. rosea* (rădăcină de trandafir).

Conform datelor FAO [133], uleiul esențial din rizomii de *R. rosea* cultivați în Finlanda și Ungaria a constituit 0,05% din masa uscată, iar cele mai abundente substanțe volatile au fost miterolul, *trans*-pinocarveolul, geraniolul și alcoolul dihidrocumin.

b. Principiile de standardizare a extractelor metaboliților secundari din rizomii de *R. rosea*. Numeroase studii, care demonstrează potențialele efecte bioactive ale *R. rosea*, au condus la clasificarea acesteia ca plantă medicinală de către Comitetul Farmacologic Rus al Ministerului Sănătății, Farmacopeea Națională Suedeză și Canadiană [208]. Standardizarea extractelor din rizomi de *R. rosea* a trecut prin două faze. Inițial, în anul 1970, salidrozidul a fost considerat un compus cu proprietăți farmacologice unice. De aceea, prima generație de extracte de *R. rosea* aprobată de Comitetul pentru Farmacopeea Rusă a fost standardizată la un conținut de minimum 0,8% salidrozid [30, 305]. Dar, salidrozidul se conține și în alte specii din genul *Rhodiola*, de aceea acest compus nu a putut fi utilizat drept marker unic al speciei [315, 322]. La sfârșitul anilor 80, pe baza analizelor comparative, a fost demonstrat că extractul inițial cu potențial farmacologic conține și alți compuși activi specifici pentru specia *R. rosea*. Aceștia nu fuseseră încă identificați. Din datele prezentate de Pannosian, numai în regiunea Altai există aproximativ 24 specii de *Rhodiola*, care pot fi identificate greșit drept *R. rosea* [208]. Printre ele se numără *R. kirilowii*, *R. yunnanensis*, *R. crenulata*, *R. sacra* și *R. sachalinensis*. În cercetările recente, referitor la identificarea speciilor de *Rhodiola* ale genului respectiv, se utilizează metode noi, precum genotiparea și markerii chemotaxonomici. Pe baza profilurilor chimice, obținute din 47 probe de *Rhodiola* colectate în China, bunăoară *R. crenulata*, *R. sachalinensis*, *R. himalensis*, *R. serrata*, *R. fastigiata*, *R. kirilowii* și *R. rosea*, au fost detectați opt markeri de referință caracteristici în diferite concentrații și la diverse specii [176]. Ca markeri de referință au fost luați compușii: rosavinul, rosarinul și rosinul, *p*-tirosolul și salidrozidul, catehina, rhodionina și acidul galic. Salidrozidul și acidul galic au fost identificați în toate speciile, în timp ce rosarinul și rosinul au fost detectați în *R. sachalinensis*, *R. himalensis* și *R. rosea*. Rosavinul a fost caracteristic numai pentru *R. himalensis*, *R. serrata* și *R. rosea*. Prin urmare, din cele circa 136 specii ale genului *Rhodiola* numai specia *R. rosea* conține rosavin și rosarin [271, 322]. Până în prezent, calitatea extractului de *R. rosea* este în principal determinată de suma conținutului glicozidelor acidului cinamic în raport cu rosavinul (nu mai mic de 1%) și salidrozidul (nu mai puțin de 0,8%) [90, 330, 332].

Activitatea farmacologică a extractelor metaboliților secundari din rizomi de *R. rosea*. Testarea biologică a diferitor extracte de adaptogeni vegetali, utilizând modele de animale, a demonstrat că componentele active ale extractelor din rizomi de *R. rosea*, sunt în principal fenilpropanoidele și derivații feniletanolului, inclusiv salidrozidul, *p*-tirosolul și rosavinul [215,

285, 322]. Fenilpropanoidele: rosavinul, rosinul și rosarinul sunt nu doar markeri pentru rizomii de *R. rosea*, ci și farmacologici activi, antioxidanți și neostimulatori [208]. Compușii, cum ar fi *p*-tirosoolul și acidul galic, s-au dovedit a fi agenți de anihilare a radicalilor liberi [259]. Un studiu recent a arătat că rhodioninul și salidrozidul pot avea efecte antitumorale [259]. În plus, rhodioninul este recunoscut a fi implicat în procesul de învățare și memorare [61].

c. Conservarea și cultivarea plantelor de *R. rosea*. Datorită proprietăților sale prețioase, în ultimele decenii plantele de *R. rosea* sunt intensiv colectate. Principala sursă de rădăcini și rizomi disponibili în comerț este din Munții Altai [32, 102, 105; 208, 221]. De exemplu, în anul 2005 au fost raportate exporturi de rizomi de *R. rosea* în cantități de 20-30 t pe an, exclusiv din Rusia [101]. Peste 46 de companii din întreaga lume comercializează produse de *R. rosea*, iar aproximativ 30 de companii furnizează aceste produse ca ingrediente alimentare [101, 290]. Creșterea rapidă a cererii, precum și prețul ridicat oferit pentru materia primă a produs presiuni sporite asupra habitatelor naturale ale acestei specii. Deși colectarea în țările europene nu este la fel de extinsă precum în zona Altai din Rusia, specia a fost raportată ca plantă medicinală pe cale de dispariție în Federația Rusă, Republica Cehă, Bosnia-Herțegovina [217] și vulnerabilă în Slovacia [102]. *R. rosea* este, de asemenea, inclusă în Cartea Roșie a Bulgariei, Ucrainei, Scandinaviei și Suediei [102].

Cele menționate sugerează că sursele naturale de materie primă de *R. rosea* sunt în continuă descreștere, fapt ce determină necesitatea elaborării unor metode efective și economic avantajoase de cultivare a plantei în condiții *in vivo* și *in vitro*.

Cultivarea în condiții de câmp. Capacitatea de regenerare a plantelor de *R. rosea* este destul de lentă și constituie aproximativ 10 – 15 ani [329]. Problema satisfacerii necesităților în materie primă și de conservare a populațiilor naturale de *R. rosea* poate fi soluționată prin cultivarea în câmp a plantelor și micropropagarea lor. Deși există informație că *R. rosea* se cultiva în mai multe zone ale fostei Uniuni Sovietice, [102], precum și în Suedia, Polonia [100, 102], Germania [102], la ora actuală plantațiile de *R. rosea* sunt limitate din cauza costurilor 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 [156], recolta de rizomi poate fi compromisă de anumiți factori (lipsa condițiilor agrotehnice bine elaborate, controlului buruienilor, fertilizării etc.) [31, 102].

Cu toate că cultivarea plantelor de *R. rosea* în condiții de câmp a fost realizată în mai multe țări și continente, elaborarea unei agrotehnici de cultivare economic avantajoase a plantei rămâne

a fi un obiectiv neatins încă. Principalele obiective care necesită a fi elucidate constau în obținerea artificială a biomasei rizomilor de *R. rosea* cu conținut și compoziție de *MS* comparabilă cu cea caracteristică rizomilor colectați în condiții naturale.

Micropropagarea plantelor de *R. rosea* în condiții *in vitro*. Pe parcursul cercetărilor din ultimii ani au fost elaborate și stabilite mai multe protocoale de micropropagare *in vitro* a speciei *Rhodiola* (*R. crenulata*, *R. kirilowii*, *R. quadrifida*, *R. sachalinensis*), inclusiv *R. rosea*, care este și cea mai pretențioasă privind condițiile de cultivare. Acest lucru este confirmat și de numeroase publicații, în care au fost prezentate rezultate contradictorii. Datele din literatură ne demonstrează că pentru fiecare caz în parte, condițiile optime sunt determinate experimental. Trebuie remarcat faptul că rezultatele obținute cu succes asupra inducerii organogenezei *in vitro* au fost realizate utilizând toate organele plantei *R. rosea*. Practic, fiecare lucrare separată, privind cultivarea *in vitro* a *R. rosea*, oferă protocoale de cultivare independente, care determină compoziția și concentrația regulatorilor de creștere, precum BA, AIA, ANA, AIB și 2,4-D [112, 261, 262]. Concentrația optimă și combinarea regulatorilor de creștere a plantelor depinde de genotip, ecotip, tipul explantului și stadiul de dezvoltare [295].

Unele scheme eficiente de micropropagare *in vitro* a plantelor de *R. rosea*, care ar permite restabilirea habitatelor, conservarea germoplasmelor și posibila aplicare biotehnologică pentru producerea substanțelor valoroase, au fost elaborate de către Tasheva [261] și Ghiorghită [112]. Aceste cercetări au inclus utilizarea diverselor tipuri de explant, precum mugurii apicali și rizomoidali, noduri de frunze, segmente de tulpină și rădăcină, inclusiv semințe de la plantele din habitatele naturale. Rezultate reușite au fost obținute din semințele germinate pe mediul de cultivare Murashige-Skoog modificat [200], ce conține 2 mg/l Zea sau BA fiecare [261]. Reducerea concentrației acestor regulatori a stimulat formarea lăstarilor, obținând în pasajele următoare un coeficient de multiplicare egal cu 5. Inducerea rizogenezei a avut loc pe $\frac{1}{2}$ *MS* suplimentat cu 2 mg/l AIB, iar stimularea creșterii rădăcinii prin adăugarea a 0,2 mg/l AIA [261].

În cazul când se dorește micropropagarea unui genotip valoros, se recurge la inițierea culturii direct din plantele mature ce se găsesc în habitatele naturale. Anume, printr-un astfel de procedeu au fost micropropagate plantele de *R. rosea* de către Ghiorghită [112], utilizând segmente și vârfuri de lăstari. Dintre toate variantele experimentale, cele mai bune combinații pentru micropropagarea acestei specii au fost Kn/ANA și Zea/AIA, caracterizate și prin rizogeneză intensă.

Rezumând cele menționate, constatăm că anumite cerințe privind condițiile de cultivare *in vitro* a speciei *R. rosea* nu sunt disponibile în acest sens și este necesar de a elabora propriul protocol pentru micropropagarea genotipului selectat.

d. Cultura in vitro de *R. rosea* ca metodă alternativă de obținere a metaboliților secundari. Obținerea tot mai dificilă a compușilor derivați din plante a determinat industria și oamenii de știință să ia în considerare posibilitatea investigării culturilor celulare, ca metodă alternativă și durabilă de obținere a produselor farmaceutice naturale valoroase. Acest procedeu oferă posibilitatea constituirii factorilor de mediu favorabili pentru multiplicarea culturilor celulare și acumularea *metaboliților secundari*. Mai mult decât atât, pot fi aplicate mai multe strategii privind creșterea metabolitului dorit, facilitând procesele descendente și obținând randamente crescute ale metabolitului-cheie [118, 173, 186]. În ultimele decenii au fost efectuate un șir de cercetări, privind obținerea *MS* caracteristici rizomilor de *R. rosea* pe cale biotehnologică, utilizând cultura celulelor și țesuturilor [17, 173, 277]. Primele rapoarte privind culturile de celule și organe de *R. rosea* în condiții *in vitro* au fost obținute în 1980, iar în 1981, de către Alexandrova, a fost obținut și primul brevet pentru metoda de regenerare a rădăcinilor de *R. rosea in vitro*. În această lucrare nu a fost furnizată informație cu privire la termenii de inducere a culturii [329].

Numeroase cercetări au fost efectuate privitor la stabilirea culturii de calus la specia *Rhodiola*. Sheng și colab. au investigat inducerea și menținerea culturii de calus la *Rhodiola quadrifida* (plantă utilizată în medicina tradițională chineză de peste 1000 de ani) [244]. Cultura de calus a fost indusă pe mediul nutritiv Murashige și Skoog [200] suplimentat cu 2,4-D, ANA, BA și Kn, iar pentru menținerea lui, mediul nutritiv a fost suplimentat numai cu 2,4-D, Ba și Kn. Tasheva și Kosturkova au reușit să inducă cultura de calus de *Rhodiola rosea* în prezența unui spectru mai variat de fitohormoni, precum BAP, 2-iP, Kn, 2,4-D, AIA, ANA, dar cele mai reușite rezultate au fost obținute în variantele ce conțineau BA și 2,4-D [262]. După 30 de zile de cultivare, a fost determinat conținutul de salidrozyd, totodată s-a constatat biosinteza și a altor substanțe biologice active în cultura de calus cercetată. Kim și colab. au descoperit că în calusul obținut din frunze de *Rhodiola sachalinensis*, cultivat pe mediul nutritiv Gamborg, suplimentat cu ANA, BA și 5% zaharoză, biosinteza salidrozidului a atins un nivel superior (0,41% raportat la masa uscată), comparativ cu rizomul intact (0,17%) [153].

Actualmente există un număr limitat de rapoarte privind biosinteza *MS* în cultura de calus și agregate celulare de *R. rosea*, iar publicații științifice pentru inducerea și cultivarea rădăcinilor izolate ale acestei specii încă nu sunt. *MS* biosintetizați în calusul și agregatele celulare de *R. rosea* includ fenilpropanoidele: rosavinul, rosinul, rosarinul (Figura A1.1) și triandrina [98, 122, 123, 124, 163], feniletanoloidele: salidrozydul și *p*-tirosolul [164], acidul fenolic – acidul galic și acizii hidroxicinamici: clorogenic, cafeic și acidul *p*-cumaric (Figura A1.1) [98, 163, 325]. Cu toate acestea, *MS* produși *in vitro* sunt sintetizați în cantități mici [122], iar în unele cazuri nici nu au fost generați [187] sau au nevoie de condiții specifice pentru biosinteza lor, cum ar fi adaosul de

precursori [117, 122, 123, 124]. Există rapoarte privind biosinteza salidrozidului de către microorganisme [16]. Unul din motivele biosintezei scăzute a salidrozidului este eficiența scăzută a glicolizării și non-sincronizarea activității UDP-glicoziltransferazei cu acumularea *p*-tirosolului [117, 291].

Rezumând cele menționate mai sus, putem concluda că cultura *in vitro* de *R. rosea* reprezintă o metodă valoroasă de cercetare a influenței diferitor factori chimici și fizici asupra sporirii biomasei și acumulării principiilor active în celule. Numai cunoscând mecanismele de reglare a acestor procese devine posibilă elaborarea unor tehnologii avantajoase de obținere a *metaboliților secundari* din sursele vegetale.

1.5. Concluzii la capitolul 1

1. Biosinteza *metaboliților secundari* implică un număr relativ mic de compuși biochimici, care ulterior sunt modificați prin diferite cicluri într-un număr extrem de larg de substanțe secundare. *Metaboliții secundari* obținuți în rezultatul reacțiilor biochimice sunt considerați cruciali pentru supraviețuirea organismului producător, adesea identificați numai într-un anumit stadiu al creșterii și dezvoltării speciei sau în cadrul numai unei specii.

2. Cercetarea mecanismelor de reglare și biosinteză a *metaboliților secundari* la plante dă posibilitate de a intensifica procesul producerii lor pe cale biotehnologică. Culturile *in vitro* a celulelor și țesuturilor este unanim apreciată ca metodă alternativă și durabilă de obținere a *metaboliților secundari*. Acest procedeu oferă posibilitatea constituirii factorilor de mediu favorabili pentru multiplicarea culturilor celulare și acumularea produselor farmaceutice naturale valoroase.

3. *Rhodiola rosea* L., datorită proprietăților sale medicinale prețioase și colectării intensive, se află în pericol de dispariție în multe regiuni ale globului. Componentii activi, caracteristici speciei *R. rosea*, se acumulează preponderent în rizomi, având proprietăți adaptogene, biostimulatoare și antioxidante. Cultivarea plantelor de *R. rosea* în condiții *in vivo* și *in vitro* a fost realizată în mai multe țări și continente, dar problema privind obținerea *metaboliților secundari* caracteristici pentru *R. rosea* rămâne un obiectiv neatins încă.

4. Din informația din literatura de specialitate urmează, că în foarte puține lucrări este investigată influența proceselor de acumulare a *metaboliților secundari* în organele plantelor medicinale, în particular, în rizomii de *R. rosea* în funcție de condițiile arealului de creștere.

5. Cultura *in vitro* de *R. rosea* reprezintă o metodă valoroasă de cercetare a influenței diferitor factori chimici și fizici asupra sporirii biomasei și acumulării principiilor active în celule. În așa fel atât cultura calusului, cât și cultura agregatelor celulare de *R. rosea* reprezintă un obiect

model important în vederea cercetării influenței diferitor factori asupra proliferării celulare, biosintezei și acumulării *metaboliților secundari*. Numai cunoscând mecanismele de reglare a acestor procese devine posibilă elaborarea unor tehnologii avantajoase de obținere a *metaboliților secundari* din surse vegetale cultivate în condiții *in vivo* și *in vitro*. Acest deziderat constituie scopul cercetărilor noastre.

În acest context lucrarea are o deosebită importanță și actualitate incontestabilă în aspectul gnoseologiei mecanismelor privind acumularea principiilor active în rizomii de *R. rosea* din populațiile carpatine (îndeosebi cele din România) și 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.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Obiectele de studiu

Ca obiect de studiu *in vivo* au servit plantele din specia *R. rosea* L., colectate din populațiile munților Carpați, masivul Ineu, Romania (Figura 2.1A, B). În cercetări au fost utilizați rizomi (Figura 2.1C) și semințe (Figura 2.1D) ale plantelor de *R. rosea* colectate din habitatele naturale ale României în timpul expedițiilor organizate în Carpații Orientali, pe masivul Rodnei, piscul Pietrosul și Ineu (județul Bistrița-Năsăud), și masivul Ceahlău (jud. Piatra Neamț).

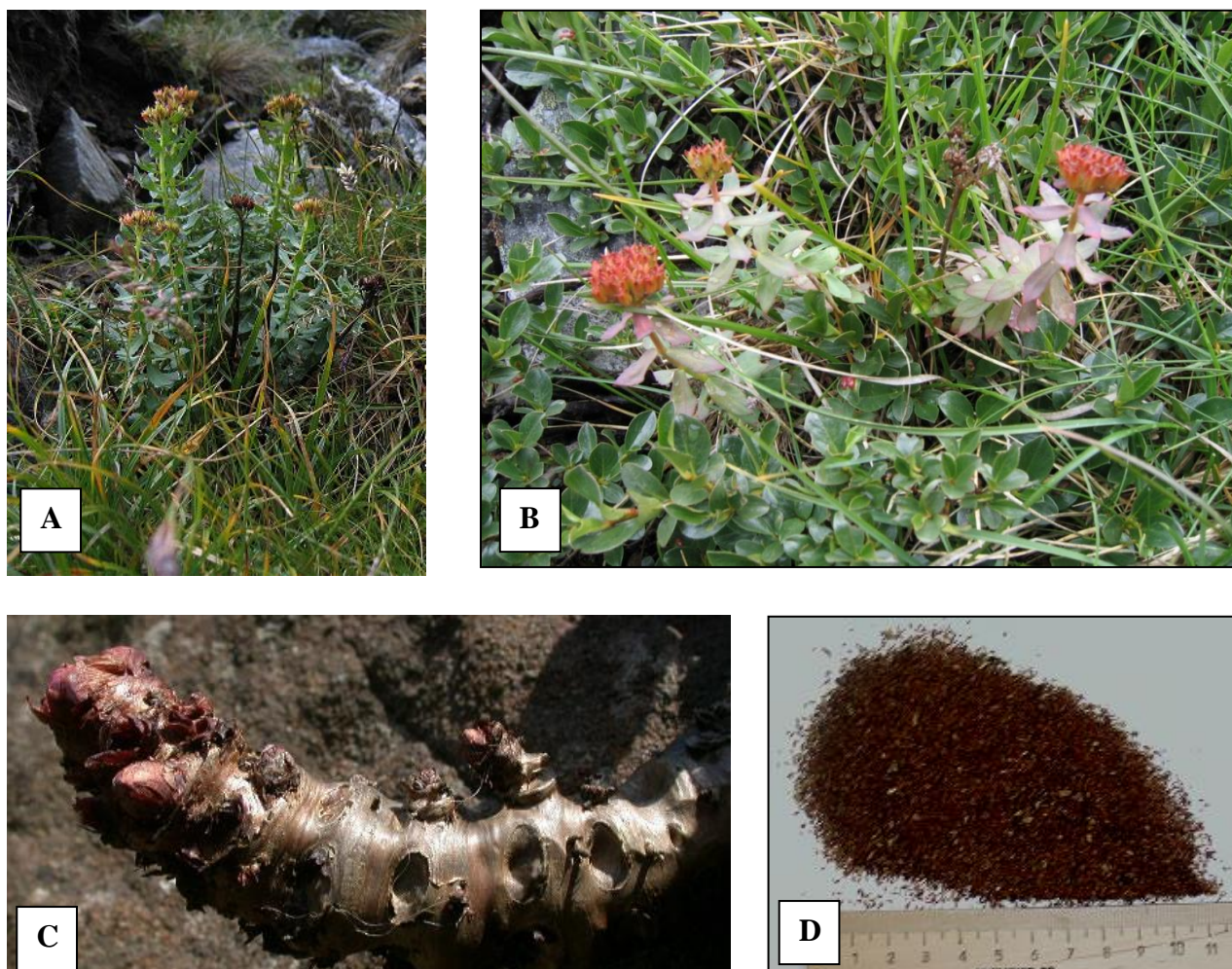


Fig. 2.1. Plante (A, B), rizomi (C) și semințe (D) de *R. rosea* colectate din habitatele naturale ale munților Carpați (Masivul Ineu, România).

Rizomii plantelor de *R. rosea* colectați la începutul lunii septembrie, anul 2004, au fost incluși pentru multiplicarea vegetativă și pentru analiza biochimică a *MS* acumulați în condiții naturale, iar semințele au servit pentru multiplicarea generativă și inițierea culturii *in vitro* din aceste genotipuri. De asemenea, au fost analizați rizomii plantelor de *R. rosea* colectați din diferite habitate ale Munților Carpați din România, Ucraina și Polonia. În cercetări au fost la fel utilizate

și plante de *R. rosea* obținute din semințe și cultivate în condiții de laborator, în Rezervația Științifică „Plaiul Fagului”, raionul Ungheni, și Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, Ucraina.

Pentru cercetările fiziologice și biochimice a fost utilizat materialul biologic obținut în cultura *in vitro* a speciei *R. rosea*: plantulele de *R. rosea* micropropagate *in vitro* (1); calusul (2) și agregatele celulare (3).

2.2. Metodele și procedeele de cercetare

2.2.1. Metode de multiplicare și cultivare a plantelor de *R. rosea* în condiții *in vivo*

Multiplicarea plantelor de R. rosea prin germinarea semințelor colectate de la plantele spontane din Masivul Ineu, România. Semințele de *R. rosea* au fost colectate la sfârșitul lunii august. Pentru eliminarea stării de dormitare și sporire a ratei de germinare, semințele au fost imersate timp de 24 ore în soluție de acid giberelic (GA₃) cu concentrația de 0,05% [160]. Ulterior, au fost puse la stratificare. Stratificarea semințelor a fost realizată după metoda clasică prin incubare pe nisip umed la temperatura de +4°C și întuneric [69, 307], în termostat (Friocell) cu umiditatea relativă a aerului de 75-85%. După expirarea perioadei de stratificare, la a 21-a zi, rata de germinare a semințelor de *R. rosea* a atins ≈ 95% (Figura A3.1A).

Ulterior, cutiile Petri cu semințele germinate au fost transferate în termostat la temperatura de +22°C, umiditatea relativă a aerului 75-80% și fotoperioada de 16 ore și 8 ore întuneric. După o săptămână de cultivare plantulele au atins înălțimea între 0,5 și 2,5 cm (Figura A3.1B). La fel menționăm că în această perioadă a fost depistat un număr mare de plantule de *R. rosea* albinoase (Figura A3.1B) cu/sau fără rădăcini. Plantulele bine dezvoltate au fost transferate în sol și menținute în camera de cultivare iluminată natural.

Pentru cultivarea ulterioară a plantelor de *R. rosea* în condiții de câmp, o parte din plantule au fost cultivate în sera Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, iar altă parte în sera special construită în rezervația științifică „Plaiul Fagului” din raionul Ungheni și în câmp deschis (grilă de referință 61° 44'N, 27° 18'E) pe o parcelă cu expoziție spre răsărit-sud. Solul din sera IGFPP era constituit din cernoziom tipic moderat, cu pH-ul 6,5, iar cel din „Plaiul Fagului” era sol de pădure, cu pH-ul 6,2. Mărimea parcelelor experimentale a variat de la 2 m² până la 40 m², în trei repetiții.

Multiplicarea plantelor de R. rosea prin creșterea rizomilor secționați. *R. rosea*, fiind plantă perenă, poate fi propagată și prin divizarea rizomilor. Pentru aceasta, rizomul subteran a fost separat în secțiuni cu lungimea de 1,5 și 15 cm, care conținea cel puțin un mugure și câteva rădăcini pe fiecare porțiune. Fragmentele secționate au fost plantate primăvara în sol, în rezervația

științifică „Plaiul Fagului”. Datorită faptului că secțiunile au fost relativ mari, ele au început să crească după aproximativ 3 săptămâni de la plantarea în condiții de câmp. Durata cultivării a constituit aproximativ 3 ani.

2.2.2. Multiplicarea plantelor de *R. rosea* în condiții *in vitro*

Introducerea *in vitro* a speciei *R. rosea* a constat mai întâi în obținerea materialului aseptice utilizat în elaborarea metodei de micropropagare *in vitro* (1); inițierea culturii calusului (2), din care ulterior au fost obținute agregate celulare (3).

Plante aseptice de *R. rosea* au fost obținute din semințe sterilizate cu soluție de ACE (agent de înălbire pe bază de clor), în concentrație de 20%, pe parcursul a 7 min și spălate de trei ori cu apă distilată sterilă. Ulterior, semințele au fost plasate la stratificare în condiții sterile pe strat de agar dizolvat în apă distilată în concentrație de 0,6%. După 21 zile de stratificare și 14 zile de menținere în camera de cultivare (vezi p. 2.2.1.) au fost obținute plantule sterile (Figura A3.2). O parte dintre acestea a fost utilizată pentru elaborarea metodei de micropropagare, iar alta pentru inducerea calusului și a agregatelor celulare.

Introducerea și micropropagarea plantelor de *R. rosea* în cultura *in vitro*. Pentru realizarea micropropagării plantelor de *R. rosea* au fost testate mai multe medii de cultivare. În final, pentru micropropagare a fost utilizat mediul nutritiv Murashige-Skoog de bază [200]. Mediile nutritive se deosebeau după conținutul unor componente, precum BA - 0,2 mg/L, AIA - 0,1 mg/L și cărbune activ - 1200 mg/L [34, 36]. Înainte de autoclavare mediile de cultivare au fost ajustate la valoarea pH 5,8-6,5 cu ajutorul soluției de 2N NaOH sau 1 N HCl. Recipientele cu mediile nutritive au fost autoclavate la 121⁰C, presiunea 1,1 bari, timp de 22 min. Cultivarea *in vitro* a fost realizată la temperatura de +26⁰C, fotoperioada de 16 ore (intensitatea luminii 1000-2000 lx) și 8 ore întuneric. Umiditatea relativă a aerului în camera de cultivare a constituit ≈70%.

Inducerea și menținerea culturii calusului și a agregatelor celulare de *R. rosea*. Inducerea calusului a fost realizată din frunzele plantelor sterile. Segmente foliare au fost inoculate pe mediul nutritiv **MS** solid (0,6% agar), suplimentat cu 1,5 mg/L BA și 0,5 mg/L ANA, și amplasate în camera de cultivare cu fotoperioada de 16 ore și 8 ore întuneric, intensitatea luminii de 2000 lx. În baza mai multor testări efectuate a fost demonstrat că în acest mediu celulele calusului proliferază activ, fiind denumit ulterior *mediul de bază MS*. Pentru menținerea calusului, la fiecare 40 zile de cultivare fragmente de calus cu masa de aproximativ 2 g se transfera pe mediul **MS** proaspăt cu aceeași compoziție.

În scopul obținerii culturii agregatelor celulare au fost utilizate 2 g fragmente de calus cu vârsta de 20 zile inoculate pe mediul de bază **MS** - lichid (lipsit de agar), suplimentat cu 1,5 mg/L

BA și 0,5 mg/L ANA. Vasele de cultivare au fost amplasate pe un giratoriu cu cauciucuri la 75 rot./min aflat în camera de cultivare. Pentru menținerea culturii, la fiecare 20 de zile de cultivare, agregatele celulare au fost transferate prin decantare în mediu **MS** proaspăt.

2.2.3. Metode de determinare a parametrilor fiziologici și biochimici a culturii in vitro

Determinarea dinamicii de creștere a calusului și agregatelor celulare în condiții in vitro.

Creșterea calusului a fost monitorizată consecutiv, la intervale de 10 zile, până în ziua 90-a de cultivare. La cultura agregatelor celulare monitorizarea a fost realizată la intervale de 5 zile, până la vârsta de 25 zile. Pentru fiecare analiză au fost luate aleatoriu câte 3 vase. În baza valorilor masei materialului proaspăt și a celui uscat a fost determinată dinamica creșterii calusului și agregatelor celulare, iar în baza rezultatelor obținute a fost construită curba dinamicii de creștere a calusului și agregatelor celulare. Pentru a caracteriza dinamica de creștere a fost determinat *indicele de creștere*. El reprezintă raportul dintre acumularea biomasei în dinamică și biomasa inițială, conform Godoy-Hernández, G., Vázquez-Flota [114].

2.2.4. Studiul influenței factorilor chimici și fizici asupra dinamicii de creștere a culturii in vitro de *R. rosea*

Influența fitohormonilor. Pentru optimizarea condițiilor de cultivare a calusului și agregatelor celulare, inițial au fost testate medii nutritive ce conțineau următorii fitohormoni: BA (6-benzilaminopurină), Kn (chinetină), ANA (acid α -naftilacetic), 2,4-D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic) și AIB (acid indolil-3-butiric) în concentrații și raporturi variate, Tabelul 2.1. O atenție deosebită a fost atrasă raportului dintre conținutul citochininelor și auxinelor.

Tabelul 2.1. Parametrii mediilor de testare a influenței diferitor fitohormoni, introduși în mediul nutritiv MS agarizat și lichid, asupra creșterii calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*.

№ variantei	Concentrația fitohormonilor, mg/L				
	BA	Kn	ANA	2,4-D	AIB
Mediul nutritiv agarizat					
1	0,5	0,5	1	-	-
2	0,5	-	-	-	0,5
3	1	-	-	2	-
4	1,5	-	0,5	-	-
5	-	0,5	1	-	-
6	-	0,5	-	1	-
Mediul nutritiv lichid					
1	0,5	-	-	-	0,5
2	1,5	-	0,5	-	-

În cercetare au fost introduse șase variante cu concentrații diferite de fitohormoni pe mediul nutritiv **MS** agarizat și două variante pe mediul nutritiv **MS** lichid (Tabelul 2.1).

Influența alcoolului cinamic. Cultivarea calusului și agregatelor celulare a fost realizată pe mediul nutritiv **MS** de bază (*martor*) și pe medii *experimentale*, la care suplimentar s-a adăugat alcool cinamic (Sigma), precursorul de sinteză a rosavinului. Alcoolul cinamic a fost introdus în mediul lichid, atingând concentrația finală de 1, 2 și 4 mM. Sterilizarea alcoolului cinamic a fost efectuată cu ajutorul filtrului cu membrană Millipore cu diametrul porilor de 0,2 μm.

Influența reglatorului natural de creștere Reglalg. RNC *Reglalg*, testat în experiențe, a fost inițial sterilizat prin filtrare (conform procedurii descris mai sus), iar ulterior introdus în mediul nutritiv **MS** de bază steril (conținând fitohormonii BA și ANA) în următoarele rapoarte: 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1400 și 1/1800 (*variante experimentale*). În mediul din *varianta martor* au fost introduși doar fitohormoni.

Influența radiațiilor ultraviolete. Pentru testarea acțiunii radiațiilor ultraviolete, creșterea calusului de *R. rosea* a fost efectuată la regimul de temperatură de +26°C, cu perioada de 16 ore lumină (2000 lux) și 8 ore întuneric (*martor*), calusul a fost tratat suplimentar, începând cu ora a doua a perioadei de iluminare, cu unde UV (280-320 nm) (*experimental*). Iradierea cu UV a calusului de *R. rosea* a fost efectuată zilnic pe parcursul a 18 zile (începând cu ziua a 12-a de la realizarea pasajului). Expunerea la radiația UV a fost efectuată pe parcursul a 5, 15, 30, 60, 120 și 180 min. În total au fost testate 7 variante.

Influența expunerii de scurtă durată la temperaturi joase pozitive. Pentru testarea acțiunii de scurtă durată a temperaturilor joase pozitive, creșterea calusului și a agregatelor celulare a fost realizată la regimul de temperatură de +26°C (*martor*), cu expoziția în termostat la temperatura +4°C, +8°C timp de 30, 60, 180, 360 min (*variantele experimentale*) în ziua a 20-a și, respectiv, a 12-a după pasaj (la începutul fazei exponențiale de creștere).

Influența expunerii de scurtă durată la temperaturi negative. Pentru testarea acțiunii de scurtă durată a temperaturilor negative, creșterea calusului și a agregatelor celulare a fost realizată la regimul de temperatură de +26°C (*martor*) și de expoziție la -16°C, -14°C, -12°C, -8°C, -4°C timp de 8 ore (*variantele experimentale*) în ziua a 20-a și, respectiv, a 12-a după pasaj (la începutul fazei exponențiale de creștere).

2.2.5. Metode fiziologice și biochimice de analiză a materialului vegetal

Determinarea viabilității celulelor cultivate in vitro. Determinarea viabilității celulelor calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* a fost realizată prin metoda spectrofotometrică. Atât în cazul dat, cât și în restul cercetărilor spectrele de absorbție UV-VIS au fost înregistrate la

spectrofotometrul Agilent 8453 în diferite diapazoane (190 - 1100 nm). Metoda de determinare a viabilității celulelor reprezintă evaluarea integrității membranei celulare utilizând colorantul Metilen blue (Panreac), care difuzează prin membranele deteriorate colorând doar conținutul celulelor moarte. În baza unor experiențe preliminare, metoda respectivă a fost adaptată pentru cultura calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*. Inițial a fost construită curba de calibrare. Pentru aceasta au fost prelevate mostre din calusul de *R. rosea* în faza exponențială de creștere (la a 20-a zi de cultivare când se presupune că toate celulele sunt vii). Cultura prelevată a fost divizată în două variante. Prima variantă reprezenta celulele intacte – vii. La celulele din varianta a doua a fost indusă moartea totală prin incubarea probei în soluție de 10% NaCl, la +37°C, timp de 1 oră. Ulterior, proba cu celule vii a fost amestecată cu cele moarte în următoarele proporții: 100:0; 75:25; 50:50; 25:75 și, respectiv, 0:100%. Amestecurile rezultate au fost colorate prin adăugarea soluției de Metilen blue de 0,1% și menținute la temperatura camerei timp de 5 min. Raportul dintre masa culturii celulare și volumul soluției de colorant a fost de 1:5 (m/v). Probele obținute au fost spălate de excesul de colorant cu patru volume de apă distilată. Ulterior, colorantul din probe a fost extras prin agitare cu soluție de 20% acid acetic în etanol pe parcursul a 15 min. Amestecurile alcătuite din celule vii și moarte în raporturi diferite au format o dependență directă între procentul conținutului de celule moarte și valoarea absorbției la lungimea de undă egală cu 660 nm (Figura A4.1) [239]. Graficul construit, a fost utilizat ca curbă de calibrare în determinarea viabilității celulelor culturi calusului de *R. rosea*. La diferite faze de creștere a culturii calusului și agregatelor celulare a fost realizată colorarea cu Metilen blue, după metoda descrisă mai sus, și determinând procentul de celule moarte la diferite faze de creștere a culturilor.

Determinarea conținutului de pigmenți fotosintetici în celulele calusului și agregatelor celulare de R. rosea. Determinarea conținutului de clorofila *a*, *b* și carotenoide a fost realizată prin metoda spectrofotometrică [328]. Pigmenții fotosintetici au fost extrași din celulele calusului și agregatelor celulare, prealabil macerate în prezența pulberii de sticlă, cu soluție de 90% acetonă în apă, adăugând 5 volume de soluție pentru extragere la o unitate de masă biologică proaspătă. Extractele obținute au fost separate de biomasă prin filtrare. Concentrația pigmenților în extracte a fost apreciată prin determinarea densității optice a extractelor la lungimi de undă cu absorbție maximă pentru fiecare component: 662 nm (clorofila *a*), 644 nm (clorofila *b*) și 440 nm (carotenoidele), utilizând următoarele ecuații [328].

Extragerea proteinelor solubile totale. Extragerea proteinelor solubile totale din calusul de *R. rosea* destinate studiului prin electroforeza unidimensională a cuprins o serie de operațiuni consecutive, care aveau drept scop obținerea unei soluții de proteine nealterate de proteaze. Probele luate în cercetare au fost mai întâi mărunțite la rece cu praf de sticlă până la obținerea unei

consistențe de pudră, iar apoi transferate în tuburi Eppendorf, adăugându-se soluție–tampon pentru extragere (într-un raport de 250 mg probă / 100 μ L soluție de extragere). Soluția de extragere a proteinelor conținea 1,4% (v/v) β -mercaptoetanol, 0,1% (m/v) sodiudodecilsulfat (SDS), 1M Tris-HCl, pH 8.8, albastru de bromfenol 0,1% (m/v). Probele au fost agitate timp de 30 min pe un agitator de tip "Bio-Mini-Shaker" (Ucraina), apoi incubate în baia de apă fierbinte timp de 3-5 min pentru a reduce complet punțile bisulfide și a inhiba activitatea proteazelor. Ulterior, probele au fost centrifugate timp de 10 min într-o centrifugă de tip SIGMA 3K30 (SUA) la o viteză de 15.000 rot./min. Supernatantul, este pus la păstrare în congelator la -16...-20°C sau imediat supus electroforezei unidimensionale.

Electroforeza unidimensională a polipeptidelor. Electroforeza unidimensională a fost efectuată în bloc vertical în gel de poliacrilamidă (PAAG), conform metodei Laemmli [169], modificată, în condiții denaturante în prezență de SDS. Specificul metodei constă în faptul că gelul de separare este în formă de gradient liniar cu concentrația de 10 - 18% de acrilamidă/bisacrilamidă (29,2/0,8). *Gelul de separare* a fost preparat utilizând 1,5 M Tris-HCl (pH-ul 8,8), 10% SDS, 10% persulfat de amoniu și TEMED, iar *gelul de concentrare* (4,8%) – 1,0 M Tris-HCl (pH-ul 6,8), 10% SDS, 10% persulfat de amoniu și TEMED.

Electroforeza s-a desfășurat la 26 mA - 14 mA până când frontul colorantului a ajuns la 1 cm de la marginea inferioară a gelului de separare. Soluția–tampon de migrare a avut următoarea componență: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS (m/v), pH-8,3. După electroforeză gelul a fost colorat cu 0,25% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka) în 10% acid acetic și 45% metanol, timp de 30 min. Ulterior, gelul a fost decolorat în soluție de 10% acid acetic și supus analizei. Pentru determinarea masei moleculare relative a proteinelor au fost utilizate probe cu markeri cu valori cuprinse între 6,5 kD și 180 kD.

Obținerea extractelor proteice pentru determinarea activității enzimaticе. Extractele enzimaticе au fost obținute prin macerarea biomasei proaspete a calusului sau agregatelor celulare de *R. rosea* în soluția–tampon de 0,05 M fosfat de sodiu, cu adaos de 1,5% (m/v) polivinilpolipirrolidon, 1 mM EDTA și 0,5 mM fenilmetilsulfonilflorură, pH – 6,8. Raportul dintre masa culturii celulare și volumul soluției de extracție a fost de 1:1. Proteinele solubile extrase au fost separate prin centrifugare la +4°C, 16 000 g pe parcursul a 15 min.

Metodele de determinare a activității diferitor enzime

Determinarea activității peroxidazei. Activitatea cantitativă a peroxidazei (PO) (EC 1.11.1.7) în fracțiile proteice a fost determinată spectrofotometric ($\lambda = 334$ nm). Esența reacției constă în oxidarea benzidinei cu H₂O₂ în prezența peroxidazei, timp de 2-3 min la +25°C [119, 188]. Benzidina oxidată trece în *p*-parahinondiimidă, care formează cu benzidina neoxidată un

compus de nuanță verde-albastră. Ulterior, nuanța extractului treptat se transformă în culoare maro. Amestecul reactant a constat din 4 mL soluție–tampon fosfat de sodiu de 50 mM (pH-ul 7,8), 100 μ L H₂O₂ de 2,5mM, 100 μ L benzidină de 34 μ M și 100 μ L extract. În cuveta de referință a lipsit H₂O₂. Activitatea enzimatică a peroxidazei a fost efectuată determinată conform ecuației:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

unde: A – activitatea enzimei; ΔD – modificarea densității optice (diferența dintre densitatea optică de la finele reacției și densitatea optică la momentul inițial); V – volumul total al extractului obținut, mL; X – diluția finală a extractului în cuveta (raportul dintre volumul amestecului de reacție și cantitatea de extract care urmează să fie adăugată); T – durata reacției, s; L – grosimea stratului soluției analizate, cm; m – masa probei, g; Δm – raportul dintre masa uscată și masa proaspătă.

Studierea spectrului electroforetic al PO a fost realizată prin electroforeză în condiții native, în gel de poliacrilamidă de 7,5% [75]. Vizualizarea benzilor corespunzătoare activității izoenzimelor PO a fost posibilă incubând gelul în soluție ce conține benzidină cu concentrația 1,9 mM și 0,6% H₂O₂ în calitate de substrat [54]. Gelurile au fost menținute la temperatura camerei până la apariția benzilor maro. Reacția a fost oprită prin clătirea gelurilor cu apă deionizată.

Determinarea activității catalazei. Pentru determinarea activității catalazei (CAT) (EC 1.11.1.6) a fost utilizată metoda spectrofotometrică, monitorizând diminuarea absorbției la 240 nm prin descompunerea H₂O₂ pe parcursul a 2-3 min [21]. Amestecul reactant a constat din 2 mL soluție–tampon fosfat de potasiu 50 mM (pH-ul 7,0), 100 μ L H₂O₂ de 20 mM și 100 μ L extract. Activitatea enzimatică a catalazei fost determinată conform ecuației prezentate mai sus. Activitatea enzimatică a extractului a fost apreciată în baza numărului de micromoli de H₂O₂ care se descompun într-un minut, o unitate a activității CAT fiind egală cu 1 μ mol H₂O₂ descompus într-un minut [196].

Prepararea extractelor din calusul de R. rosea și metodele de determinare a conținutului compușilor fenolici, conținutului total de flavonoide și a activității antioxidante totale. Pentru extragere a fost utilizată biomasa uscată și soluție de alcool etilic cu concentrația de 60%, luate în raport de 1: 3. Amestecul a fost agitat pe parcursul a 4 ore la temperatura camerei (\approx 20°C), apoi centrifugat pe parcursul a 15 min la 12000 rot./min. Supernatantul a fost utilizat pentru a determina conținutul compușilor fenolici, conținutul total de flavonoide și activitatea antioxidantă totală.

Metoda de determinare a conținutului compușilor fenolici. Conținutul compușilor fenolici (CCF) a fost determinat după metoda [249] cu utilizarea reagentului Folin-Ciocalteu. Amestecul reactant a constat din 100 μ L extract diluat cu apă distilată în raport de 1:2,5 (v/v), 2,3 mL apă

distilată și 200 μL de reactiv Folin–Ciocalteu. Amestecul obținut a fost incubat la temperatura camerei timp de 3–5 min, la care ulterior s-a adăugat 1,4 mL de soluție de 29% carbonat de sodiu, agitându-l puternic. Înainte de a fi supus analizei la spectrofotometrul UV-VIS (Agilent 8453) la $\lambda=760$ nm, amestecul a fost incubat timp de 40 min la 18-20°C. Concentrația totală a compușilor fenolici într-un gram de masă proaspătă a fost exprimată în echivalenți ai acidului galic care asigură aceeași densitate optică a reacției (determinați în baza curbei de calibrare). Pentru construirea curbei de calibrare a fost utilizată substanța standard – acidul galic (Sigma).

Metoda de determinare a conținutului total de flavonoide. Conținutul total de flavonoide (CTF) a fost determinat conform metodei [231]. Amestecul reactant a constat din 200 μL extract, 100 μL soluție cu 1% de AlCl_3 în 95% etanol, adăugându-se etanol de 95% până la volumul total de 2,5 mL. După 20 de min a fost măsurată densitatea optică a soluției la lungimea de undă egală cu 430 nm. CTF fiind exprimat în mg/g echivalenți de quercetină într-un gram de biomasă uscată. Pentru construirea curbei de calibrare a fost utilizată substanța standard – quercetina (Sigma).

Metoda de determinare a capacității antioxidante totale. Capacitatea antioxidantă totală (Cat) a extractelor din explanții de *R. rosea* a fost măsurată spectrofotometric după metoda [198]. Amestecul reactant a constat din 100 μL extract, la care s-au adăugat 900 μL de amestec reactiv (în final concentrația soluției fiind de 0,6 M acid sulfuric, 28 mM fosfat de sodiu și 4 mM molibdat de amoniu). În cuveta de referință a fost introdus 100 μL soluție etanol de 60% și 900 μL de amestec reactiv. Densitatea optică a soluției a fost determinată la lungimea de undă egală cu 695 nm, iar activitatea antioxidantă a fost exprimată în echivalenți de acid ascorbic într-un gram de biomasă uscată.

Metoda de determinare a conținutului de prolină. Conținutul de prolină din masa uscată a calusului a fost evaluat în conformitate cu metoda [20]. Amestecul reactant, care a constat din 1 mL extract, 1 mL acid acetic glacial, 1 mL reactiv de ninhidrină, a fost incubat timp de 1 oră pe baie de apă la fierbere. Reacția a fost oprită prin plasarea fiolelor cu probe într-un recipient cu gheață zdrobită. La amestecul reactant s-au adăugat 4 mL toluen, agitându-l puternic. Densitatea optică a soluției ninhidrină-prolină în toluen a fost măsurată la lungimea de undă egală cu 520 nm. Conținutul de prolină a fost determinat din curba de calibrare construită, folosind un set de soluții standard de prolină în acid sulfosalicilic 3%.

2.2.6. Metodele utilizate în separarea, purificarea și analiza metaboliților secundari

Determinarea masei uscate a rizomilor, calusului și agregatelor celulare de R. rosea.

Rizomii de *R. rosea* au fost tăiați în secțiuni cu lungimea de 5-10 cm, care ulterior au fost cântărite și uscate în termostat la temperatura de 40 - 45°C până la atingerea masei constante. Umiditatea

rizomilor a fost determinată în 4 repetiții. În baza datelor obținute a fost calculată umiditatea medie a rizomilor de *R. rosea*, care pentru rizomii colectați în condiții naturale a constituit $W_{\text{umid.med.}} = 59,2 \pm 3,28\%$.

Identic a fost determinată masa uscată a calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*, care în mediu a constituit $m_{\text{usc}} = 5,24 \pm 0,67\%$ pentru celulele calusului și $4,98 \pm 0,14\%$ pentru agregatele celulare.

Extragerea metaboliților secundari din rizomi. Fragmente uscate ale rizomilor de *R. rosea* au fost măcinate, obținându-se particule cu diametrul de 2-3 mm. Pentru extragerea *MS*, în baloane Erlenmeyer ($V = 150$ mL) au fost introduse câte 2,0 g de rizomi, fin mărunțiți, la care s-au adăugat câte 40 mL de metanol (de 60%). Conținutul acestora a fost agitat la temperatura camerei ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) timp de 1,5 ore, apoi extractele metanolice au fost filtrate prin pâlnia Buchner.

Pregătirea probei pentru analiza HPLC a inclus cromatografierea prealabilă a 1 mL de extract pe o coloană cu silicagel (1,5 cm x 25 cm, SiO_2 2,5 g, L40/100) prin eluare cu un amestec (100 mL) format din CHCl_3 : MeOH (1:1). Eluatul, conținând *MS*, a fost distilat la presiune redusă până la uscat, iar reziduul (20 mg) a fost redizolvat în 100% MeOH (1 mL), filtrat și supus analizei HPLC.

Extragerea metaboliților secundari din agregatele celulare. Probele uscate de agregate celulare (2,0 g) au fost extrase cu metanol de 100% într-un raport de masă/volum 1 : 20, timp de 24 ore, extractele filtrate, iar solventul distilat la presiune redusă. Separarea și identificarea metaboliților secundari din probele de agregate celulare de *R. rosea* au fost realizate cu ajutorul analizei HPLC-ESI-MS.

Analiza HPLC a metaboliților secundari din agregate celulare de *R. rosea*. Extractele din agregatele celulare au fost redizolvate în metanol și supuse analizei HPLC-ESI-MS, utilizând sistemul *HPLC Agilent 1200 Series* echipat cu un degazor pentru solvenți, o pompa binară, un sistem de injectare automată, o coloană cromatografică cu fază inversă (Agilent 300 Extended C_{18} , 4.6 x 150 mm, 5 μm) și un detector UV-VIS DAD (diode array detector). Condițiile optime pentru separare au fost următoarele: temperatura camerei, volumul injectat - 10 μl probă, debitul de solvent 1 mL/min (cu splitter 9:1 pentru ESI-MS), eluție în gradient: 100- 95% A/0-5% B, 0-10 min; 95-60% A/5-40% B, 10-32 min; 60-0% A/40-100% B, 32-45 min; menținere 100% B până la 55 min, revenire la 0% B în 5 min și echilibrarea coloanei la 0% B încă 10 min, unde (A) este un amestec de 89% apă, 10% acetonitril și 1% acid formic, iar (B) este 100% metanol. Solvenții au fost filtrați și degazați înainte de utilizare. Separarea a fost monitorizată cu ajutorul detectorului UV-VIS DAD la 254 și 280 nm; sistemul LC a fost conectat direct la sursa de ionizare prin electrospray (ESI) a spectrometrului de masă. Condițiile din Q/TOF MS selectate au fost

următoarele: ESI în modul negativ, debitul gazului de uscare (N₂) 7 L/min, temperatura gazului 250°C; presiunea din nebuliser 35 psig, voltajul capilarei 4200 V; voltajul de fragmentare 200 V; compușii au fost investigați pe domeniul m/z 100–1500. Datele au fost înregistrate și procesate folosind un software MassHunter Workstation.

Analiza metaboliților secundari în extractele din rizomi de R. rosea cu ajutorul cromatografiei în strat subțire. Fragmente uscate ale rizomilor de *R. rosea* (10,0 g) au fost mărunțite și extrase cu soluție de 40% etanol (200 mL) la temperatura camerei (22±2°C) cu agitare energetică timp de 1,5 ore. Extractele alcoolice obținute au fost supuse cromatografiei în strat subțire (CSS), pe placi de „Sorbfil” (sorbent SiO₂ pe suport de plastic), folosind în calitate de sistem eluant amestecul format din cloroform : metanol (3:1). Detecția a fost efectuată cu acid sulfuric concentrat cu carbonizarea ulterioară a componentelor. Prin comparare cu standardele au fost identificați *p*-tirosozul, salidrozidul și rosavinul (Cromatograma CSS este reprezentată în Figura 3.1). În mod identic au fost obținute extractele din rizomi de *R. rosea* folosind soluții hidroetanolicе (de 50, 60 și 70%), care au fost analizate prin metoda UV-VIS.

Izolarea metaboliților secundari cu ajutorul metodei de cromatografie pe coloană. Procesul de extragere este asemănător celui descris mai sus. Suplimentar, pentru sedimentarea proteinelor și taninurilor, extractul alcoolic a fost tratat cu soluție de 10% tetraacetat de plumb (Pb(OAc)₄) până la încetarea formării sedimentului galben. Apoi extractul a fost filtrat, sedimentul spălat cu soluție hidroetanolică (de 60%, 2 x 20 mL), iar filtratul obținut a fost centrifugat. Supernatantul combinat a fost tratat cu soluție de 5% sulfat de sodiu, filtrat și extras cu 1-butanol (3 x 50 mL). Extractele butanolice au fost combinate, iar solventul a fost distilat până la volum mic la presiune redusă. Reziduul a fost filtrat și distilat până la uscat, obținându-se (0,304 g, 3,04%) un extract brun deschis, care a fost supus cromatografiei pe coloană (CC).

Analiza cu ajutorul spectrofotometriei UV-VIS a extractelor alcoolice din rizomi de R. rosea. Analiza extractelor etanolice obținute a constat în determinarea componentelor principali, precum rosavinul și salidrozidul. Probele de extracte au fost analizate la lungimile de undă λ_{max} 254 și 276 nm, în cuvetă de cuarț cu grosimea 0,2 mm. În calitate de solvent a fost folosit alcoolul etilic de 40% (EtOH 40%). Anterior, utilizând substanțele-standard: rosavinul, acidul galic și salidrozidul (Sigma) au fost construite curbele de calibrare. În baza acestor curbe au fost determinate concentrațiile substanțelor cercetate (Fig. A4.2).

Analiza HPLC a metaboliților secundari din rizomi de R. rosea. Analiza HPLC a MS a fost efectuată utilizând un sistem cromatografic de tip Agilent 1100, cu matrice de diode, coloana analitică - Zorbax RX 300 C-18, pre-coloană 300 SB C-18. Faza mobilă a constituit un amestec de MeCN: H₂O (în gradient de la 2 până la 100%, apoi la 0%) cu spălare preliminară cu soluție-

tampon fosfat (K_2HPO_4 , 0,025 M) cu un debit de la 0,2 până la 0,8 mL/min, la presiunea maximă de 300 bar, iar timpul de analiză de 65 min. Detectarea a fost efectuată cu ajutorul unui detector DAD cu matrice de diode (*diode array detector*) la trei lungimi de undă: 222, 254 și 280 nm [315].

Obținerea substanțelor volatile din rizomi de *R. rosea* prin hidrodistilare. Pentru extragerea componentelor volatile din rizomi de *R. rosea* prin hidrodistilare a fost folosită o instalație compusă dintr-un reșou, un vas de extracție de 0,1 L, un recipient gradat de 5 mL (de tip *Dean-Stark*) și un condensator. La 2,0 g de rizomi mărunțiți (2 - 3 mm) de *R. rosea* s-a adăugat apă ($V = 50$ mL). Distilarea a durat 6 ore de la începutul fierberii. Distilatul obținut a fost ulterior extras cu eter dietilic, iar extractul eteric a fost filtrat și evaporat până la uscat, fiind apoi utilizat pentru analiza HPLC după solubilizare în acetonitril. Același lucru a fost efectuat cu o probă (50 g) de rizomi uscați, obținându-se 0,025 g (0,05%) de ulei. În baza cercetărilor efectuate putem conchide că la uscare și păstrare rizomii pierd $\approx 70\%$ din componentele volatile. Uleiul volatil din rizomi de *R. rosea* reprezintă un lichid de culoare galbenă deschisă, transparent, cu un miros specific plăcut.

Analiza HPLC a substanțelor volatile din rizomi de *R. rosea*. Analizele au fost efectuate utilizând sistemul cromatografic de tip Agilent 1100. S-a folosit o coloană analitică de tip Zorbax XDB C-18 cu pre-coloană Extend C-18. Faza mobilă a fost constituită dintr-un amestec de MeCN : H_2O (în gradient), cu un debit de la 0,4 până la 1,2 mL/min. Presiunea maximă a fost de 300 bari, temperatura – $40^\circ C$, timpul de analiză 43 min. Detectarea a fost efectuată cu ajutorul detectorului DAD pe trei lungimi de undă 195, 200 și 210 nm.

Extragerea, izolarea și caracterizarea *p*-tirosoului din rizomi de *R. rosea*. Rizomii uscați de *R. rosea* (200,0 g) au fost mărunțiți în particule de 2 -3 mm. Fragmentele obținute au fost extrase cu MeOH într-un extractor de tip Soxhlet timp de 8 ore. Extractul a fost filtrat, iar solventul îndepărtat la presiune redusă, obținându-se un lichid de culoare brună închisă (82,0 g), care a fost redizolvat în apă și extras repetat cu *n*-butanol. Extractul obținut a fost evaporat până la uscat, iar reziduul (24,2 g) redizolvat într-un volum minim de etanol, purificat apoi prin eluție cu apă printr-o coloană cu poliamidă. Frațiunile colectate au fost monitorizate prin cromatografie în strat subțire (CSS), utilizând sistemul: toluen – EtOAc – EtOH (2: 2: 1). Frațiunile, conținând produsele de interes, au fost combinate și extrase cu *n*-butanol, apoi concentrate, iar produsul (0,16 g) a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu silicagel și eluat cu un amestec format din cloroform - MeOH (1: 1). Unul dintre compușii izolați a fost *p*-tirosoolul (21 mg, 0,01%), un compus cristalin alb. Structura acestuia a fost confirmată prin analiza RMN și IR.

p-Tirosool (**1**), p.t. $87^\circ C$, ($92-93^\circ C$), lit. IR γ_{max} (ulei de vaselină) cm^{-1} : 710, 805, 1045, 1215, 1385, 1460, 1595, 2920, 3395.

^1H RMN (400 MHz, DMSO, ppm): δ 2.61 (t, 2H, $\text{C}_2\text{-CH}_2$, J 7.2 Hz), 3.51 (d, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$, J 7.2 Hz), 3.54 (d, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$, J 6.8 Hz), 4.57 (t, 1H, J 5.2 Hz, OH), 6.66 (d, 2H, J 8.2 Hz), 6.99 (d, 2H, J 8.2 Hz), 9.12 (s, 1H, OH).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO, ppm): δ 38.17 (C_1), 62.45 (C_4^1), 62.57 (C_2), 114.81 (C_3^1), 114.91 (C_5^1), 129.43 (C_2^1), 129.64 (C_6^1), 155.41 (C_1^1).

Acetilarea *p*-tirosoolului. Pentru a confirma structura acestuia, o probă mică de *p*-tirosool a fost supusă acetilării în condiții standard, folosind anhidrida acetică $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ în piridină (Py) timp de 3 ore la temperatura camerei (Figura 3.5). În continuare, amestecul de reacție a fost diluat cu apă și extras cu eter dietilic $((\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O})$ de trei ori. Extractul eteric combinat a fost spălat cu soluție de HCl (15%) pentru îndepărtarea urmelor de piridină (Py) din sistem, apoi cu apă și uscat pe Na_2SO_4 (anh.). După filtrarea și îndepărtarea solventului, produsul a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu SiO_2 , prin eluare cu 15% etilacetat (EtOAc) în eter petroleic (EP), obținându-se diacetat de *p*-tirosool, un compus cristalin alb (Figura 3.5). Datele spectrale ale diacetatului de *p*-tirosool confirmă structura acestuia și sunt în conformitate cu cele din literatura de specialitate [106, 176, 215, 272].

^1H RMN (400 MHz, DMSO, ppm): δ 2.04 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.93 (t, 2H, $\text{C}_2\text{-CH}_2$, J 7.0 Hz), 4.27 (t, 2H, J 7.0 Hz, $\text{C}_1\text{-CH}_2$), 7.02 (d, 2H, J 8.4 Hz), 7.22 (d, 2H, J 8.4 Hz).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO, ppm): δ 20.97 (CH_3CO), 21.13 (CH_3CO), 34.47 (C_1), 64.75 (C_2), 121.58 (C_3^1 și C_5^1), 129.85 (C_2^1 și C_6^1), 135.44 (C_6^1), 149.36 (C_1^1), 169.57 (CH_3CO), 171.01 (CH_3CO).

Analiza RMN a *p*-tirosoolului și diacetatului *p*-tirosoolului. Spectrele IR au fost obținute în ulei de vaselină folosind un spectrometru de tip Specord 70. Spectrele ^1H și ^{13}C RMN au fost înregistrate pe un spectrometru de tip Bruker Avance DRX 400 în DMSO- d_6 și CDCl_3 (400,13 MHz pentru ^1H și 100,61 MHz pentru ^{13}C , respectiv).

Deplasările chimice sunt exprimate în ppm, iar constantele de cuplare (J) în Hertz.

Pentru cromatografie analitică în strat subțire (CSS) s-au folosit plăci cu silicagel Merck 60G cu grosimea de 0,25 mm. Separările cromatografice pe coloană au fost efectuate pe silicagel 60 Merck, folosind un amestec de eter petroleic (EP) și acetat de etil (EtOAc) în gradient. Toți solvenții au fost purificați și uscați prin tehnici standard înainte de utilizare. Prelucrarea produsului de reacție a inclus diluarea acestuia cu apă, urmată de extracția cu eter dietilic $((\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O})$, spălarea extractelor organice combinate cu apă și, la necesitate, cu soluție saturată de sare de bucătărie, uscarea pe Na_2SO_4 și distilarea la presiune redusă până la uscat.

2.3. Analiza statistică a datelor

Rezultatele obținute cu utilizarea metodelor prezentate mai sus au fost prelucrate statistic, determinând media aritmetică, devierea standard, coeficientul de variație și gradul de corelare R2 prin metode computerizate [63].

2.5. Concluzii la capitolul 2

1. În calitate de obiect de studiu *in vivo* au servit plantele speciei *R. rosea* L., colectate din populația munților Carpați, masivul Ineu, Romania. La fel au fost utilizate plantele cultivate în condițiile Republicii Moldova (Rezervația Științifică „Plaiul Fagului”, raionul Ungheni), 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.

2. În cercetări au fost utilizați rizomi și semințe ale plantelor de *R. rosea*. Rizomii plantelor de *R. rosea* au servit pentru multiplicarea vegetativă în condiții de câmp și pentru analiza biochimică a MS acumulați în condițiile habitatelor naturale și celor de câmp, iar semințele au servit pentru multiplicarea generativă și inițierea culturii *in vitro* din aceste genotipuri. Cercetările fiziologice și biochimice au fost realizate utilizând materialul biologic obținut în urma introducerii *in vitro* a speciei *R. rosea*: plantulele de *R. rosea* micropropagate *in vitro* (1); cultura calusului (2) și agregatele celulare (3) obținute din calus.

3. Drept metode de cercetare au servit procedeele de multiplicare și cultivare a plantelor de *R. rosea* în condițiile *in vivo*, introducerea și micropropagarea plantelor de *R. rosea* în cultura *in vitro*, inducerea și menținerea culturii calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*.

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

5. Utilizarea tehnicilor rapide ale diferitor metode de cromatografie, inclusiv, HPLC, spectrofotometria și electroforeza au permis identificarea calitativă și cantitativă în extracte a compoziției *metaboliților secundari*, enzimelor implicate în degradarea SRO și a polipeptidelor caracteristice pentru diferite variante ale materialului vegetal.

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

În ultimele decenii cercetările științifice au confirmat faptul că medicamentele tradiționale obținute din plante conțin *MS* [288]. De asemenea, a fost demonstrat că acumularea și biosinteza *MS* în plante depinde de condițiile de mediu din habitatele naturale. Printre condițiile de creștere care în primul rând influențează acumularea *MS* sunt: altitudinea, temperatura, iluminarea și umiditatea [102, 177]. Scopul cercetărilor noastre a fost de a determina și compara compoziția principiilor active extrase din rizomii de *R. rosea* din populația carpatină, România, cu cea descrisă în literatura de specialitate pentru rizomii de *R. rosea* colectați în Munții Altai și alte regiuni ale Rusiei (Ural, Saian) [32, 329]. Menționăm că în literatura de specialitate informații privind conținutul *MS* în rizomii plantelor colectate în Munții Carpați, în general, și din Carpații din România, în special, la momentul inițierii cercetărilor noastre practic lipseau.

În acest capitol sunt prezentate rezultatele obținute ce țin de studierea compoziției principiilor active în extractele din rizomii de *R. rosea* colectați din Munții Carpați, masivul Ineu, România, utilizând cromatografia în strat subțire (CSS), cromatografia pe coloană (CC), cromatografia cu lichide de înaltă performanță (HPLC) și analiza spectrofotometrică UV-VIS. În calitate de standarde au fost utilizați *MS* precum acidul galic, *p*-tirozolul, salidrozidul și rosavinul. De asemenea, a fost analizată compoziția biochimică a uleiului esențial obținut din acești rizomi și comparată cu cele ale uleiurilor volatile descrise pentru plantele de *R. rosea* colectate în diverse regiuni geografice. La fel, a fost realizată analiza compoziției extractelor obținute din rizomi de plante cu vârsta de 4 ani cultivați în Rezervația Științifică „*Plaiul Fagului*”, raionul Ungheni, Republica Moldova. Extracția materiei prime a fost efectuată în conformitate cu procedura standard, descrisă în compartimentul Materiale și metode.

3.1. Analiza *metaboliților secundari* în extractele din rizomi de *R. rosea* colectați în Munții Carpați, România

3.1.1. Analiza compoziției extractelor prin cromatografia în strat subțire

Scopul inițial al cercetărilor a fost de a determina concentrația optimală a soluției de alcool etilic (40, 50, 60 și 70%) pentru extragerea principiilor active valoroase din rizomi, printre care menționăm rosavinul, *p*-tirozolul și salidrozidul. Structura chimică a acestor și altor componente esențiale, caracteristici pentru *R. rosea* [97, 310, 317, 321, 326], este prezentată în Anexa 1 și 2

(Fig. A1.1, A2.1, A2.2 și A2.3). Pentru analiza compoziției extractelor inițial a fost utilizată CSS, tehnică frecvent utilizată în identificarea și determinarea compușilor chimici [310, 317]. Rezultatele analizei cromatografice în strat subțire (CSS) a extractelor din rizomi de *R. rosea* au demonstrat că conținutul cel mai înalt al *MS* este caracteristic pentru extractul realizat cu soluție de alcool etilic de 40% (Figura 3.1).

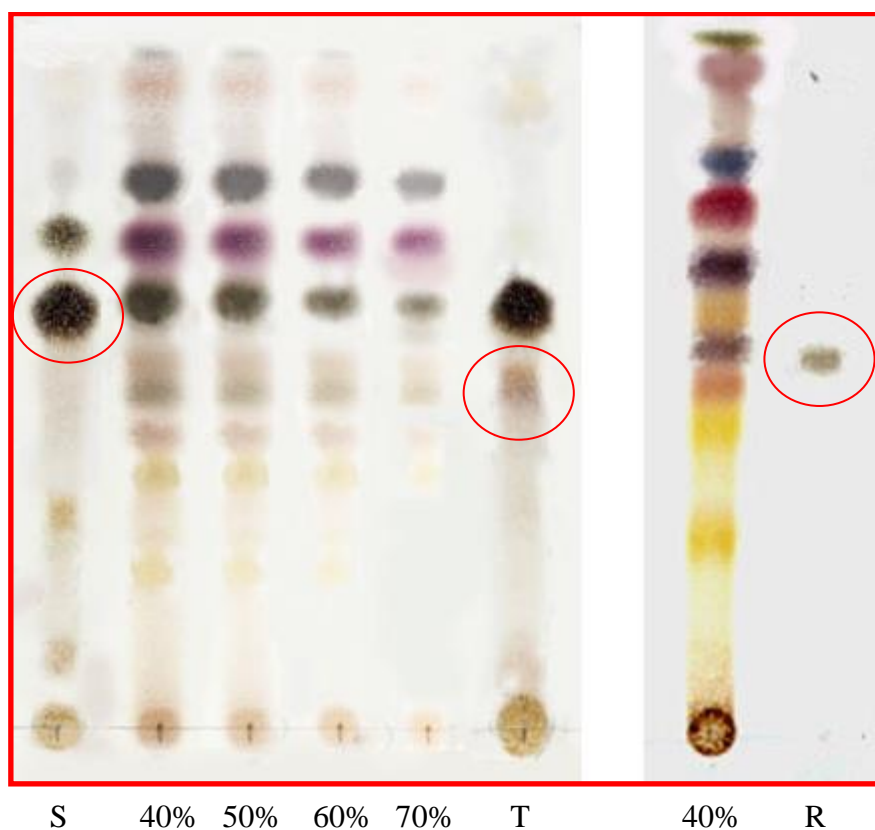


Fig. 3.1. Analiza cromatografică (CSS) a *metaboliților secundari* în extractele hidroalcoolice (de 40, 50, 60 și 70 %), obținute din rizomi de *R. rosea*. Sistemul eluant format din clorofom:metanol (3:1). Soluțiile standard conțin salidrozin (S), *p*-tirosol (T) și rosavin (R). Intensitatea benzilor cu Rf caracteristic pentru rosavin, *p*-tirosol și salidrozin în cromatograma extractului în soluția de alcool etilic cu concentrația de 40% la fel este mai înaltă în comparație cu cea caracteristică pentru alte extracte. Mărirea concentrației alcoolului etilic de la 40% până la 50, 60 și 70% a dus la diminuarea graduală a intensității tuturor componentelor.

3.1.2. Analiza prin spectrofotometria UV-VIS a conținutului *metaboliților secundari* în extractele alcoolice din rizomi de *R. rosea*

Pentru a obține date cantitative privind conținutul *MS* în soluțiile hidroalcoolice cu concentrații diferite, componentii menționați în Figura 3.1., în special rosavinul, acidul galic și salidrozinul, au fost extrași, iar concentrația lor a fost determinată spectrofotometric [305, 332].

Pentru fiecare din acești componenți a fost construită curba de calibrare (Figura A4.2). Menționăm că densitatea optică a fost determinată pentru următoarele lungimi de undă: 276 nm pentru salidrozin (Figura A4.2A), 254 nm pentru rosavin (Figura A4.2B) și 750 nm pentru acidul galic (Figura A4.2C). S-a observat că adsorbția soluțiilor crește în dependență de concentrația componentelor, iar sensibilitatea determinării conținutului componentelor în baza aprecierii densității optice scade semnificativ în următoarea secvență: acid galic > rosavin > salidrozin.

În baza acestor curbe au fost determinate concentrațiile substanțelor menționate în extractele din rizomi de *R. rosea* (Tabelul 3.1). Aceste date confirmă concluzia trasată anterior, care sugerează că odată cu creșterea în soluția de extragere a concentrației de alcool etilic mai sus de 40% se manifestă diminuarea graduală a conținutului fiecărui component.

Tabelul 3.1. Conținutul de acid galic, salidrozin și rosavin în extractele alcoolice din rizomi de *R. rosea*.

Compusul Proba (% alcool etilic)	Acid galic, mg/mL	Salidrozin, mg/mL	Rosavin, mg/mL
40%	9,69±1,15	2,23±0,58	1,24±0,11
50%	2,46 ±0,41	1,53±0,42	0,53±0,05
60%	1,11±0,3	0,63±0,25	0,12±0,03
70%	0,345±0,1	0,2±0,07	0,085±0,007

De exemplu, procentul salidrozinului și al rosavinului în extractul alcoolic de 40% este de 11 și, respectiv, de 14,5 ori mai înalt față de cel din extractul alcoolic de 70%. Aceste date demonstrează că extragerea principiilor active din rizomi de *R. rosea* depinde de gradul de hidrofilizare al solventului. De asemenea, rezultatele obținute ne relevă că conținutul de salidrozin în extractele din rizomi de *R. rosea* constituie $1,53 \pm 0,98\%$, rosavin $1,25 \pm 0,19\%$, acid galic $0,18 \pm 0,09\%$, iar suma totală a compușilor fenolici reprezintă $4,09 \pm 0,19\%$ din masa uscată a rizomilor. Studiile efectuate de Kurkin [324], Weęglarz [282] și Galambosi [103] au demonstrat că conținutul de salidrozin în rizomii de *R. rosea*, colectați din diferite habitate naturale, variază de la 0,13% până la 2%, iar concentrația rosavinului de la 0,05 până la 2,8 % (Tabelul A5.1). Prin urmare, datele obținute de noi pentru rizomii din populația carpatină se încadrează în valorile indicilor de acumulare a *MS* în rizomii de *R. rosea* caracteristici pentru rizomii plantelor din alte habitate naturale.

Prin urmare, în baza datelor obținute prin metoda CSS și spectrofotometrică putem concluziona că *MS* din rizomi de *R. rosea* se extrag cel mai bine în soluție de alcool etilic în concentrație de 40%, iar conținutul principiilor active în rizomii colectați în Munții Carpați, România, se încadrează în limita datelor caracteristice pentru rizomii de *R. rosea* colectați în alte

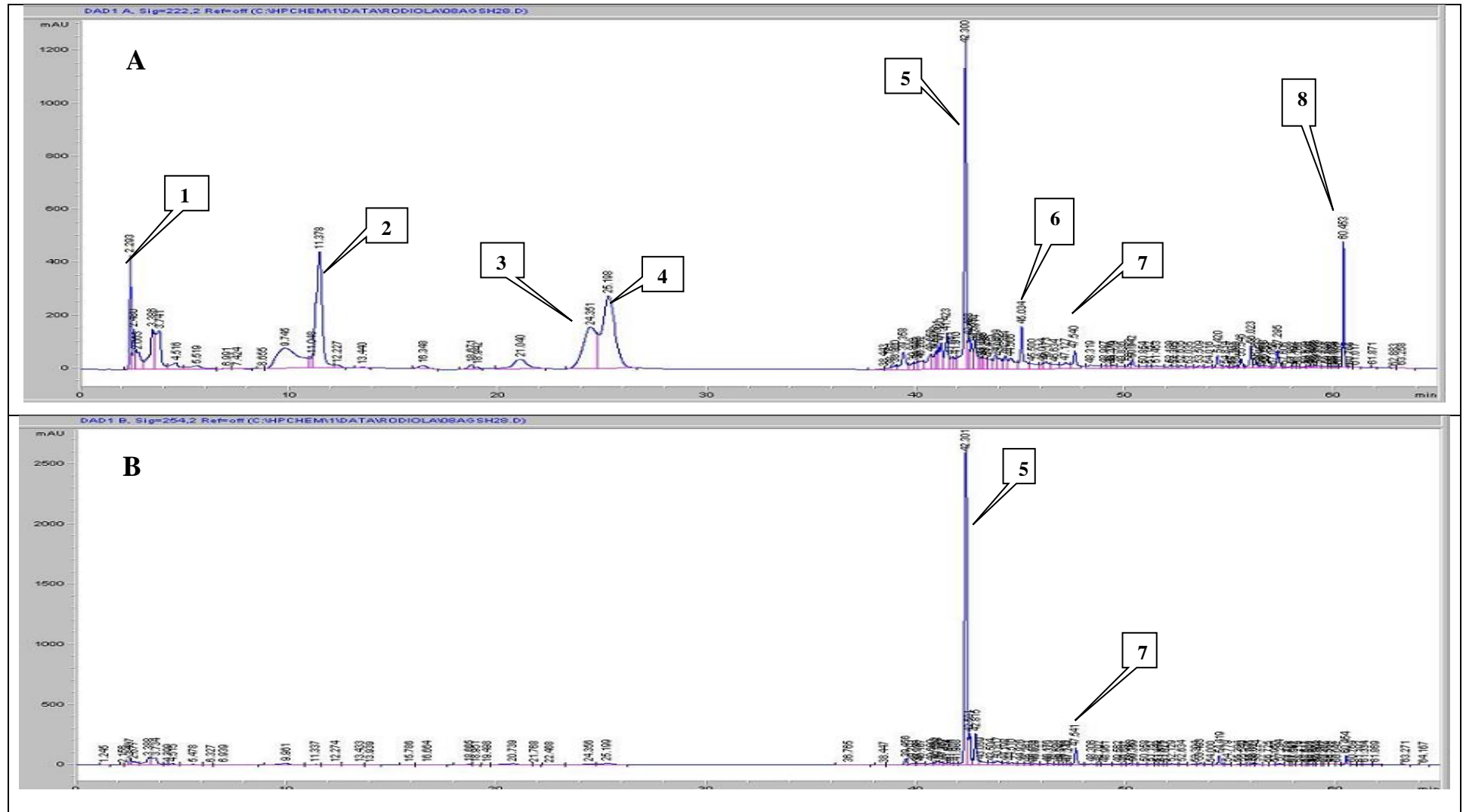
regiuni ale Terrei. Luând în considerare aceste concluzii, ulterior, pentru a analiza conținutul și spectrul *MS*, aceștia au fost extrași din materialul vegetal de *R. rosea* de diferită origine (habitate naturale și condiții de câmp) doar în soluție de 40% de alcool etilic.

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

Metodele tradiționale de separare a *MS* din extractele rizomilor de *R. rosea* necesită timp și multiple procedee privind purificarea componentelor esențiali [6, 310, 321]. Din aceste considerente a fost utilizată metoda HPLC, o tehnică rapidă, sensibilă și eficientă în identificarea profilului metaboliților din extractele plantelor. Această metodă, fiind una fundamentală, este tot mai des utilizată pentru distincția exactă a speciilor genului *Rhodiola* care sunt morfologic asemănătoare, dar din punct de vedere biochimic diferite [281]. În plus, populațiile plantelor de *R. rosea* dintr-o anumită zonă geografică pot prezenta un nivel ridicat al diversității genetice [86]. Astfel, variațiile genotipice și fenotipice ale compoziției *MS* pot afecta conținutul și chiar compoziția principiilor active.

Componenta *MS* în extractele de *R. rosea* a fost analizată pe o coloană cu fază inversă, utilizând metoda HPLC. Pentru a obține o sensibilitate ridicată și capacitate maximă de absorbție, condițiile de cromatografiere au fost optimizate, precum este descris în secțiunea Materiale și metode, (*Analiza HPLC a metaboliților secundari din rizomi de R. rosea*). Monitoring-ul conținutului de *MS* din probele analizate a fost efectuat la trei lungimi de undă: 222 nm, 280 nm (maximele de absorbție a *p*-tirosoolului, salidrozidului și acidului galic) [176, 272] și la 254 nm (absorbția specifică a fenilpropanoidelor: rosavinului, rosinului și rosarinului [105, 106, 176, 272, 321]).

Rezultatele analizei HPLC a extractelor de *R. rosea* sunt prezentate în Figura 3.2, care include cromatogramele extractelor, înregistrate la lungimile de undă menționate. Din figură se observă că componentii (5) și (7) se detectă la cele trei lungimi de undă utilizate: 222 nm (Figura 3.2A), 254 nm (Figura 3.2B) și, respectiv, la 280 nm (Figura 3.2C). Profilul cromatografic și timpul de retenție a componentelor coincid cu cei ai compușilor de referință și cu valorile indicate în literatura de specialitate [106, 176, 215, 272]. 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 componentii (5) și (7) reprezintă fenilpropanoidele, și anume rosavinul și rosarinul. Menționăm că în Figura 3.2 au fost numerotate picurile componentelor, care au fost identificate



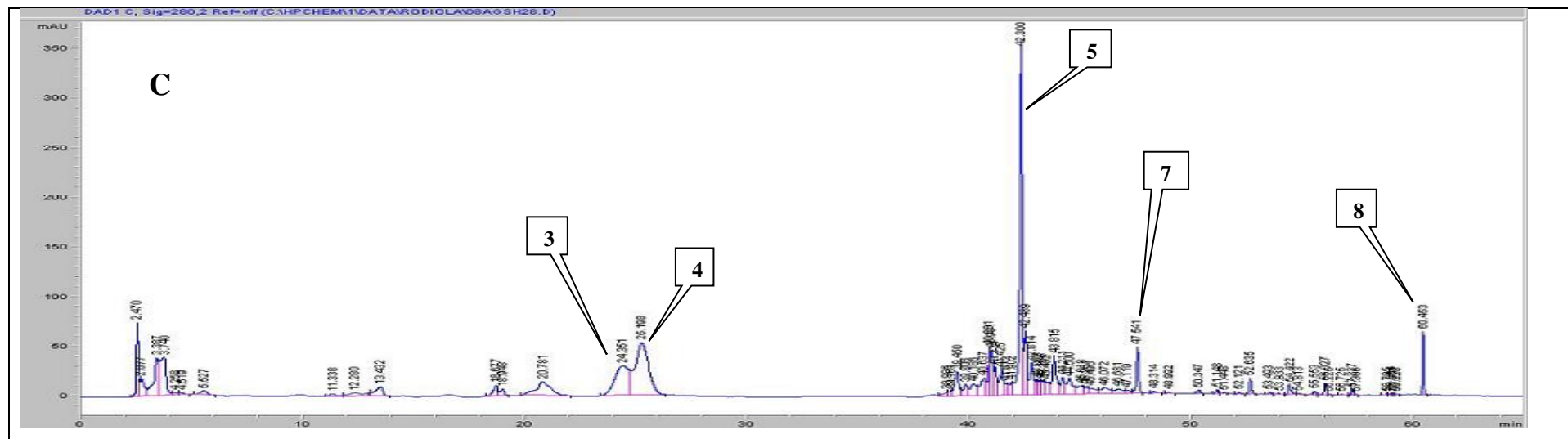


Fig. 3.2. Analiza HPLC a metabolizilor secundari extrași din rizomi de *R. rosea* și detectați la lungimile de undă: A - 222 nm; B - 254 nm; C - 280 nm. Separarea a fost efectuată pe coloana Zorbax XDB C-18 combinată cu coloana de protecție Extend C-18. 1 – metilgalat; 2 – *p*-tirozol; 3 - acid galic; 4 – salidrozyd; 5 – rosavin; 6 – rosin; 7 – rosarin; 8 – acid cinamic.

prin comparație cu markerii autentici și elucidate datorită comparației cu cromatogramele prezentate în literatura de specialitate [106, 215, 272]. În baza acestor analize am concluzionat că componenții 1-8 din Figura 3.2 reprezintă metilgalatul, *p*-tirozolul, acidul galic, salidrozydul, rosavinul, rosinul, rosarinul și, respectiv, acidul cinamic.

Analiza cromatogramei prezentate în Figura 3.2 demonstrează că, din punct de vedere cantitativ, componenții de bază extrași din rizomi de *R. rosea* sunt salidrozydul, *p*-tirozolul 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 3.2A) și a produsului de transformare a acestuia, metilgalatul (componentul 1 în Figura 3.2A), depășește valoarea ariei picurilor pentru alte componente. Aria picului și intensitatea adsorbției rosinului (componentul 7 în Figura 3.2), unul dintre cei mai importanți compuși biologic activi caracteristici pentru *R. rosea*, sunt la un nivel relativ scăzut.

Rezultatele analizei componentelor detectați pe cromatograma prezentată în Figura 3.2, identificați datorită utilizării salidrozidului, *p*-tirosoolului și rosavinului, ca markeri, precum și analizei comparative a timpilor de retenție și a caracteristicilor de adsorbție ale componentelor la diferite lungimi de undă expuse în literatura științifică [14, 272, 315], au oferit posibilitatea de a compara indicii calitativi ai diferitor componente din rizomii de *R. rosea* din populația munților Carpați, România. Datele sunt prezentate în Tabelul 3.2.

Separarea *MS* din extractele de *R. rosea* prin metoda HPLC a fost o provocare din mai multe motive. Așa cum se observă din Figura A1.1, 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*-tirosoolul și glicozidul lui, salidrozidul, sunt mult mai polare decât fenilpropanoidele: rosavinul, rosinul și rosarinul.

Tabelul 3.2. Timpul de retenție, aria picului și intensitatea absorbției 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 absorbție, mAU
Metilgalat	2,29	6,61	450
<i>p</i> -Tirosool	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

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 [35, 37, 72], ca și cei din Rusia [322] se caracterizează printr-un conținut bogat de principii active, precum *p*-tirosoolul, salidrozidul, rosavinul, rosinul și rosarinul.

3.1.4. Analiza RMN a *p*-tirosoolului și diacetatului de *p*-tirosool

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.

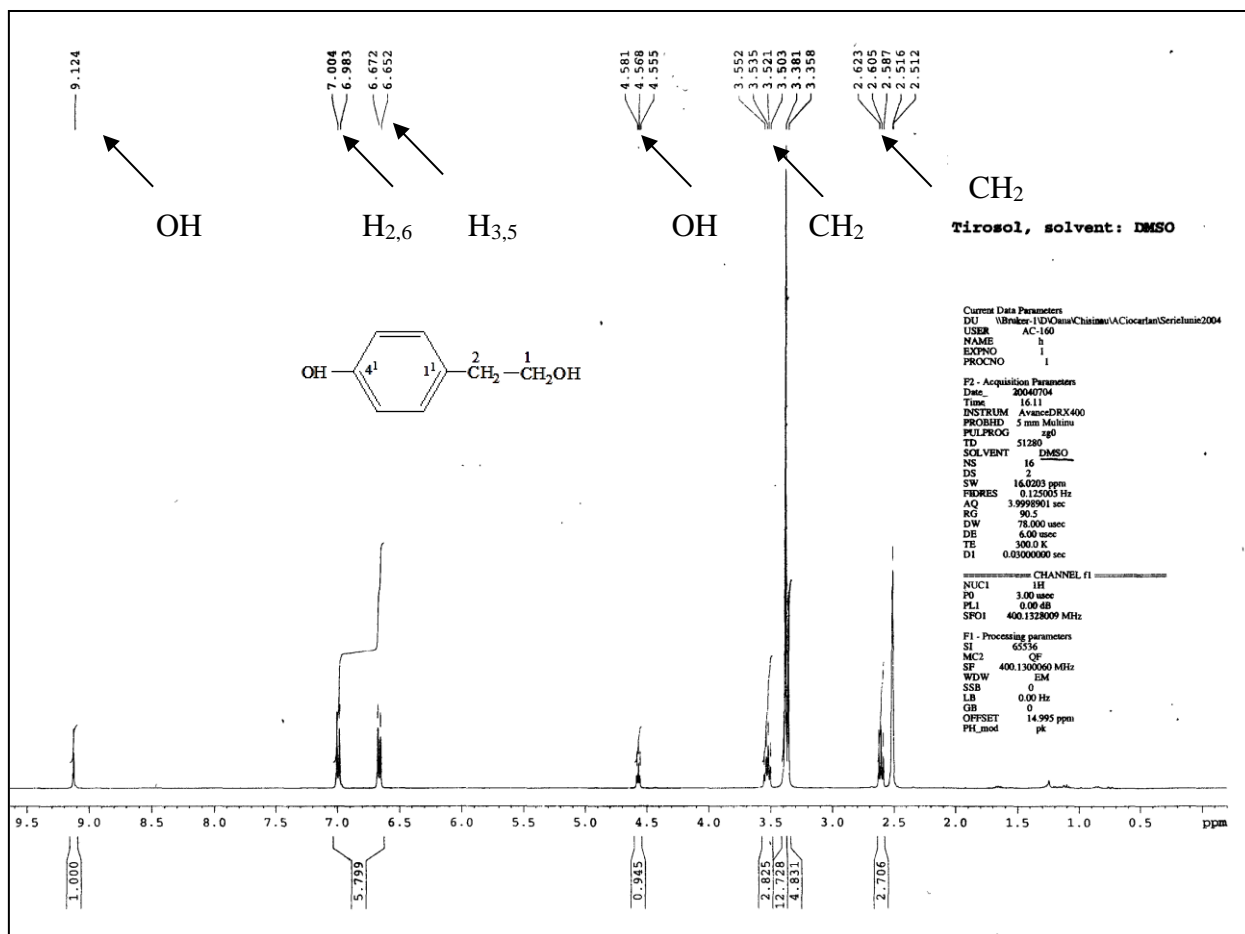


Fig. 3.3. Spectrul protonic al *p*-tirosoului.

În Figura 3.3 este prezentat spectrul ^1H RMN al *p*-tirosoului 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*-tirosool. Prin urmare, a fost validat *p*-tirosoolul atât după spectrul protonic (Figura 3.3), cât și după cel carbonic (Figura 3.4).

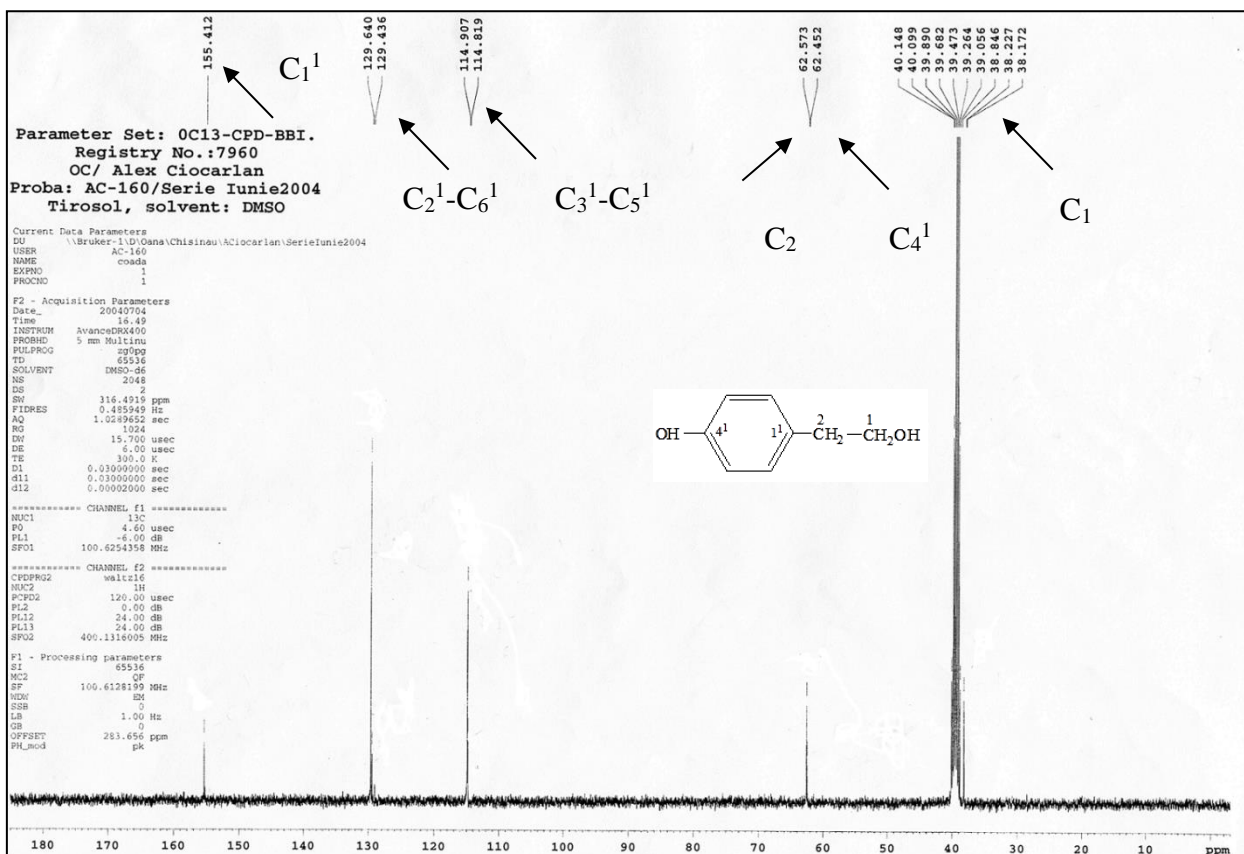


Fig. 3.4. Spectrul carbonic al *p*-tirozolului.

Ambele spectre au confirmat structura *p*-tirozolului prezent în extractele de *R. rosea*. Profilul spectrului RMN al protonilor de ^1H și atomilor de carbon ^{13}C al *p*-tirozolului coincide cu cel al compusului de referință și cu valorile indicate în literatura de specialitate [61, 62, 66, 148]. Valorile maximelor de adsorbție sugerează că componentul (2) din Figura 3.2 reprezintă *p*-tirozolul. Spectrul carbonic (Figura 3.4) include semnalele atomilor de carbon secundari C_1 și C_2 la 38,17 și 62,57 ppm, atomilor aromatici nesubstituiți $\text{C}_2^1\text{-C}_6^1$ (129,43 și 129,64 ppm) și $\text{C}_3^1\text{-C}_5^1$ (114,81 și 114,91 ppm) și ale celor substituiți C_1^1 la 155,41 ppm și C_4^1 la 62,45 ppm.

Ulterior, datele spectrale ale *p*-tirozolului au fost confirmate după acetilare și analiza RMN a formei acetilate, Figura 3.6 și 3.7. În spectrul ^1H RMN al diacetatului *p*-tirozolului (Figura 3.6) sunt prezente două grupări metil la 2,04 ppm și 2,29 ppm, fapt ce confirmă că ambele grupări hidroxil ale moleculei *p*-tirozolului au fost acetilate. Spectrul ^{13}C RMN confirmă prezența a două grupe acetat prin semnalele atomilor de carbon de la 20,97 ppm și 21,13 ppm și cele ale grupelor carbonil de la 169,57 ppm și 171,01 ppm (Figura 3.7).

Prezentarea structurii chimice determinate prin analiza RMN până și după acetilare este inclusă în Figura 3.5.

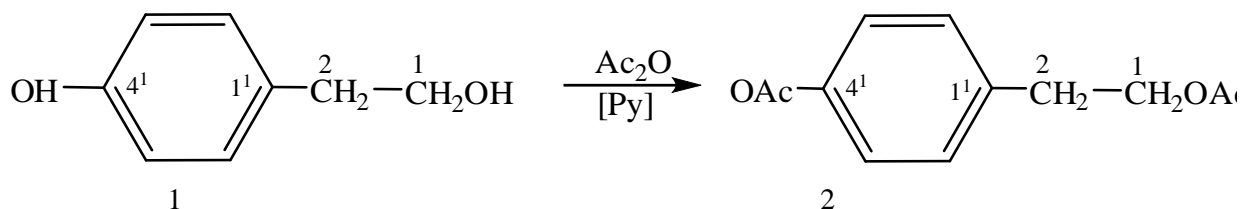


Figura 3.5. Schema transformării *p*-tirosoului în diacetat de *p*-tirozol.

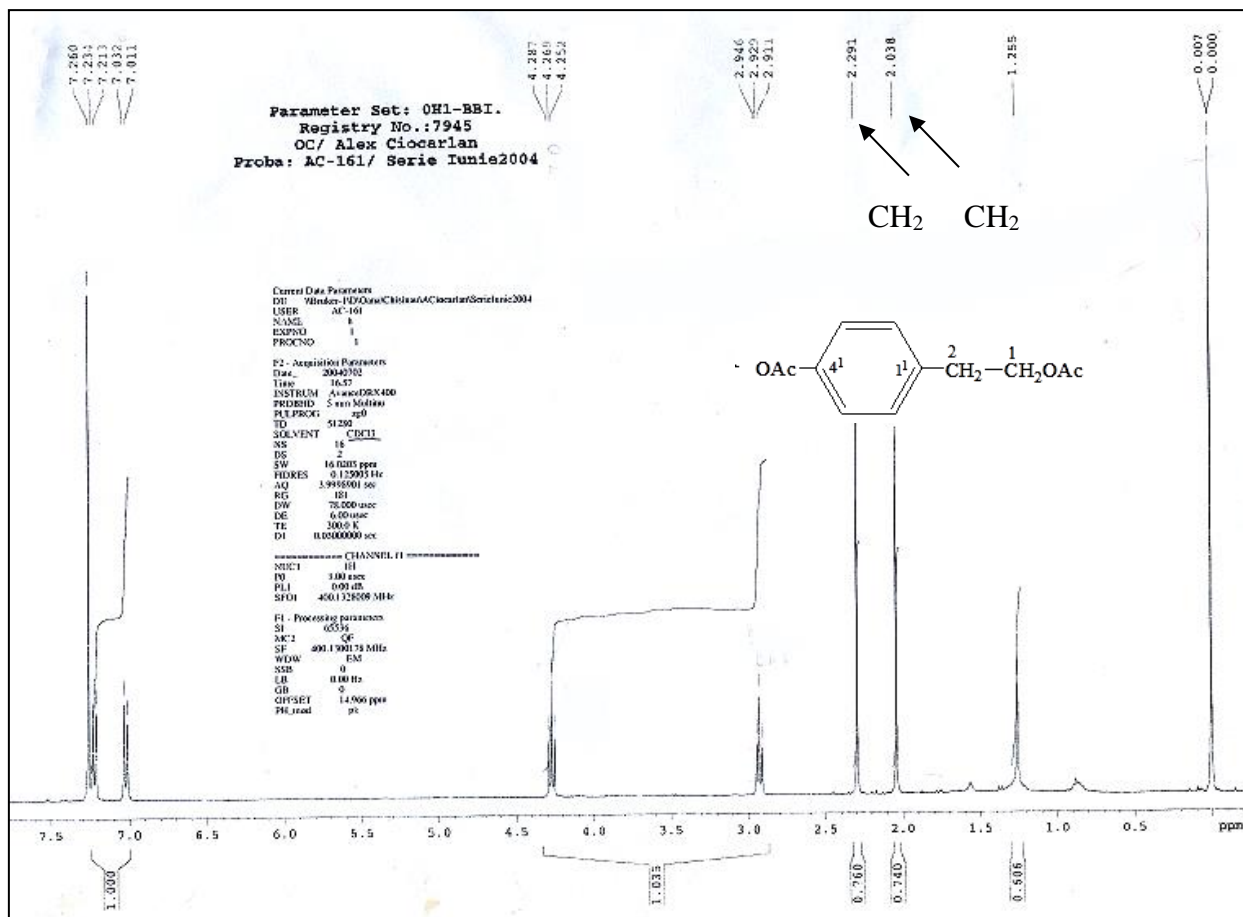


Fig. 3.6. Spectrul protonic al diacetatului de *p*-tirozol.

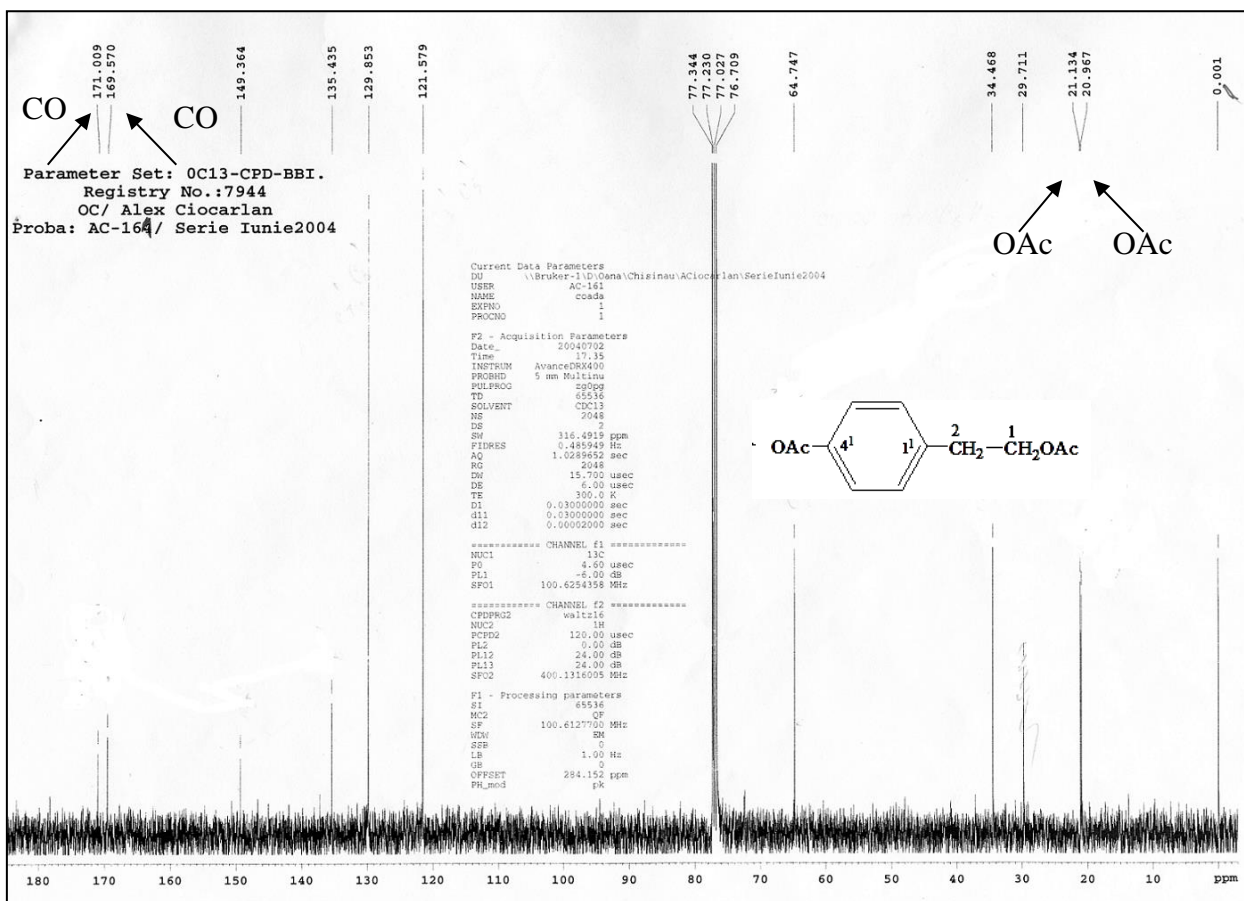


Fig. 3.7. Spectrul carbonic al diacetatului de *p*-tirosol.

Deci, utilizând metoda RMN, am confirmat că componentul din Figura 3.6 și 3.7 într-adevăr reprezintă *p*-tirosolul, iar caracteristicile de separare a *MS* prin metoda HPLC, efectuată de noi, corespund celor realizate de către alți autori [106, 215, 272].

3.1.5. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomi 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 [229].

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 suși extracției. Acest conținut este mai mare față de cel citat în rizomii plantelor din Nordul Finlandei, ce atinge valoarea de 0,027% [103] și comparabil cu cel menționat din rizomii de origine norvegiană, în care conținutul uleiului volatil constituie 0,04% [133]. Totodată, conținutul uleiului volatil în rizomii plantelor colectate în Carpați este mai mic decât cel raportat pentru rizomii din Altai [322], Bulgaria, China și India, care conțin 0,2%, 0,1% și, respectiv, 0,25% ulei volatil [88].

Cromatograma uleiului volatil din rizomi de *R. rosea*, obținută prin metoda HPLC, este prezentată în Figura 3.8. În figură sunt numerotați doar componenți confirmați prin comparare cu markerii autentici. Printre compușii detectați în uleiul volatil din rizomii de *R. rosea* din populația carpatină pot fi menționați linaloolul, geraniolul, timolul, cariofilena, *p*-cimenul, limonenul, alcool feniletic, carvacrolul și carvona.

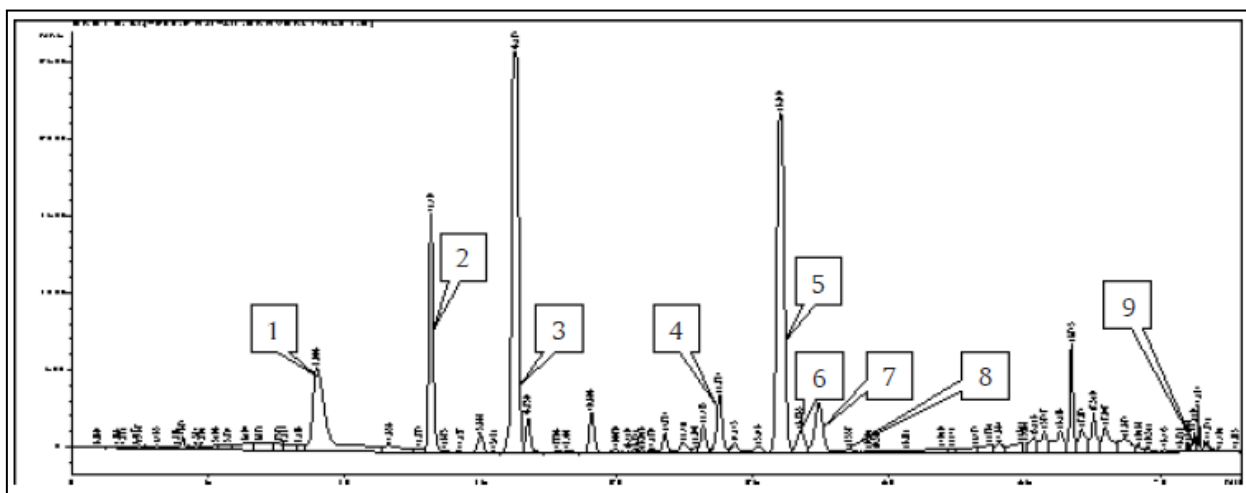


Fig. 3.8. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomi de *R. rosea*, detecție la λ_{\max} 195 nm. Separarea a fost efectuată pe o coloană de tip Zorbax XDB C-18 cu o coloană de protecție Extend C-18. 1 – limonen, 2 - alcool feniletic, 3 - *p*-cimen, 4 – carvona, 5 – geraniol, 6 – linalool, 7 – carvacrol, 8 – timol, 9 – cariofilenă. Sunt indicate doar componenții, care au fost identificați prin comparare cu markerii autentici.

Analiza cromatogramei prezentate în Figura 3.8 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 [50]. 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. Un studiu comparativ al uleiului volatil din rizomii de *R. rosea* din Bulgaria [270], de asemenea, a arătat că geraniolul este compusul majoritar și similar celui detectat în rizomii din Mongolia [243]. De menționat că în uleiul volatil de origine indiană alcoolul feniletic este cel mai important compus, iar linaloolul are valori mici [88]. În probele noastre acești compuși au fost detectați în concentrații relativ mici. De asemenea, în concentrații mici au fost detectați carvona, carvacrolul, timolul și cariofilena. Totodată, practic toți componenții detectați în rizomii populației carpatine

se regăsesc și în uleiul volatil extras din rizomii de origine finlandeză [133] și cei din Mongolia [243]. Timpul de retenție, aria relativă și intensitatea de absorbție a componentelor uleiului volatil sunt prezentate în Tabelul 3.3.

Tabelul 3.3. Timpul de retenție, aria picului și intensitatea absorbției compușilor aromatici din rizomi de *R. rosea* identificați prin metoda HPLC la λ_{\max} 195 nm, Fig. 3.8.

Compusul	Timpul de retenție, min	Aria picului, %	Intensitatea de absorbție, mAU
Limonen	13,18	7,73	1600
Alcool feniletic	13,67	0,11	25
<i>p</i> -Cimen	16,27	21,24	2500
Carvonă	23,78	2,64	300
Geraniol	26,02	19,97	2200
Linalool	26,76	1,38	150
Carvacrol	27,43	3,19	300
Timol	28,55	0,38	50
Cariofilenă	41,38	0,56	250

Rezultatele obținute confirmă datele privind compoziția uleiului volatil din rizomi de *R. rosea*, publicate și de alți autori [88, 133, 229, 270, 320], ceea ce încă odată confirmă apartenența probelor colectate speciei *R. rosea*.

3.1.6. 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 $[\alpha]_D^t$ 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 compuși 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 (Anexa 6).

Datele obținute oferă posibilitatea de a menționa că cei mai importanți compuși ai 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 [103] (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% [230], 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*.

3.2. Analiza metaboliților secundari în extractele din rizomi de *R. rosea* colectați în diferite masive ale Munților Carpați (România, Ucraina și Polonia)

Datele din literatura de specialitate demonstrează existența unei variabilități intraspecifice a conținutului de *MS* în rizomii plantelor de *R. rosea* din diferite habitate naturale. De exemplu, diferențele în conținutul de rosavin au atins 60% [7, 282, 323, 324]. Motivele cele mai importante pentru această diversitate pot fi factorii genetici și condițiile de creștere a plantelor. În cercetările efectuate, materia primă a fost obținută din trei populații provenite din diferite habitate: Munții Carpați din România, Ucraina și Polonia, care ulterior a fost analizată (Figura 3.9; 3.10 și 3.11) și comparată (Figura 3.12). Materia primă a fost evaluată utilizând metoda HPLC la patru lungimi de undă 205 nm, 220 nm, 254 nm și 330 nm. Calitatea rizomilor este diferită în ceea ce privește conținutul de *MS*. În baza ariei picurilor, prezentate în Figura 3.12, printr-o aproximare a cantităților relative ale componentilor, putem deduce că conținutul salidrozidului în rizomii din habitatele menționate este semnificativ diferit. În rizomii plantelor de *R. rosea* colectate în Carpații din Ucraina (Figura 3.10A) și Polonia (Figura 3.11A), conținutul salidrozidului este mai mic cu 22% și, respectiv, cu 80 % față de cel din Carpații din România (Figura 3.9A). De asemenea, putem remarca urme ale *p*-tirosolului – agliconul salidrozidului, în extractele din rizomii din Polonia (Figura 3.11B). Concentrația scăzută a *p*-tirosolului (Figura 3.12) sugerează că compusul funcționează în principal ca intermediar metabolic în biosinteza salidrozidului.

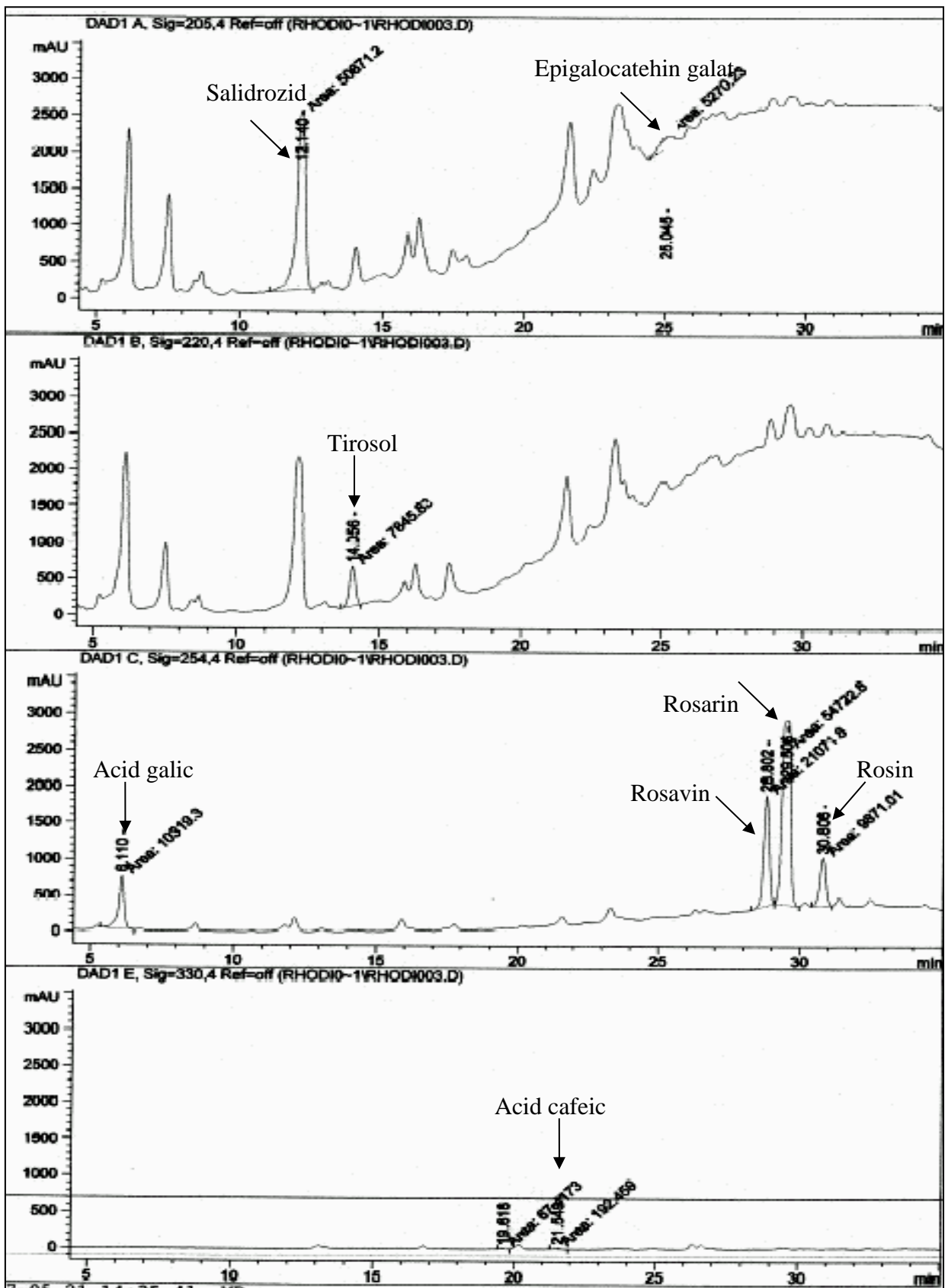


Fig. 3.9. Analiza HPLC a *metaboliților secundari* extrași din rizomii plantelor de *R. rosea* din flora spontană a Munților Carpați, România și detectați pentru lungimile de undă: A – 205 nm; B – 220 nm; C – 254 nm; D – 330 nm.

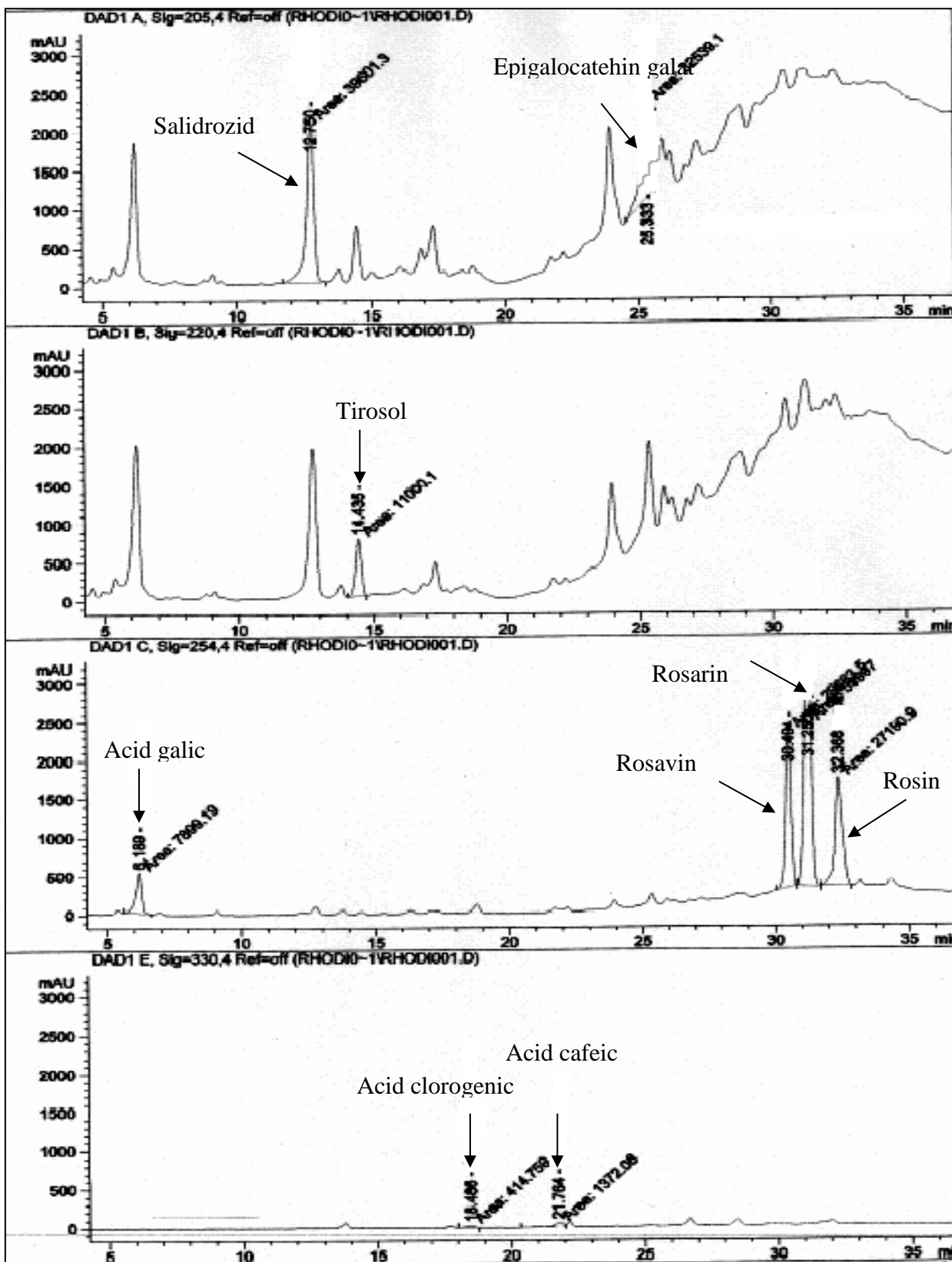


Fig. 3.10. Analiza HPLC a *metaboliților secundari* extrași din rizomii plantelor de *R. rosea* din flora spontană a Munților Carpați, Ucraina și detectați pentru lungimile de undă: A – 205 nm; B – 220 nm; C – 254 nm; D – 330 nm.

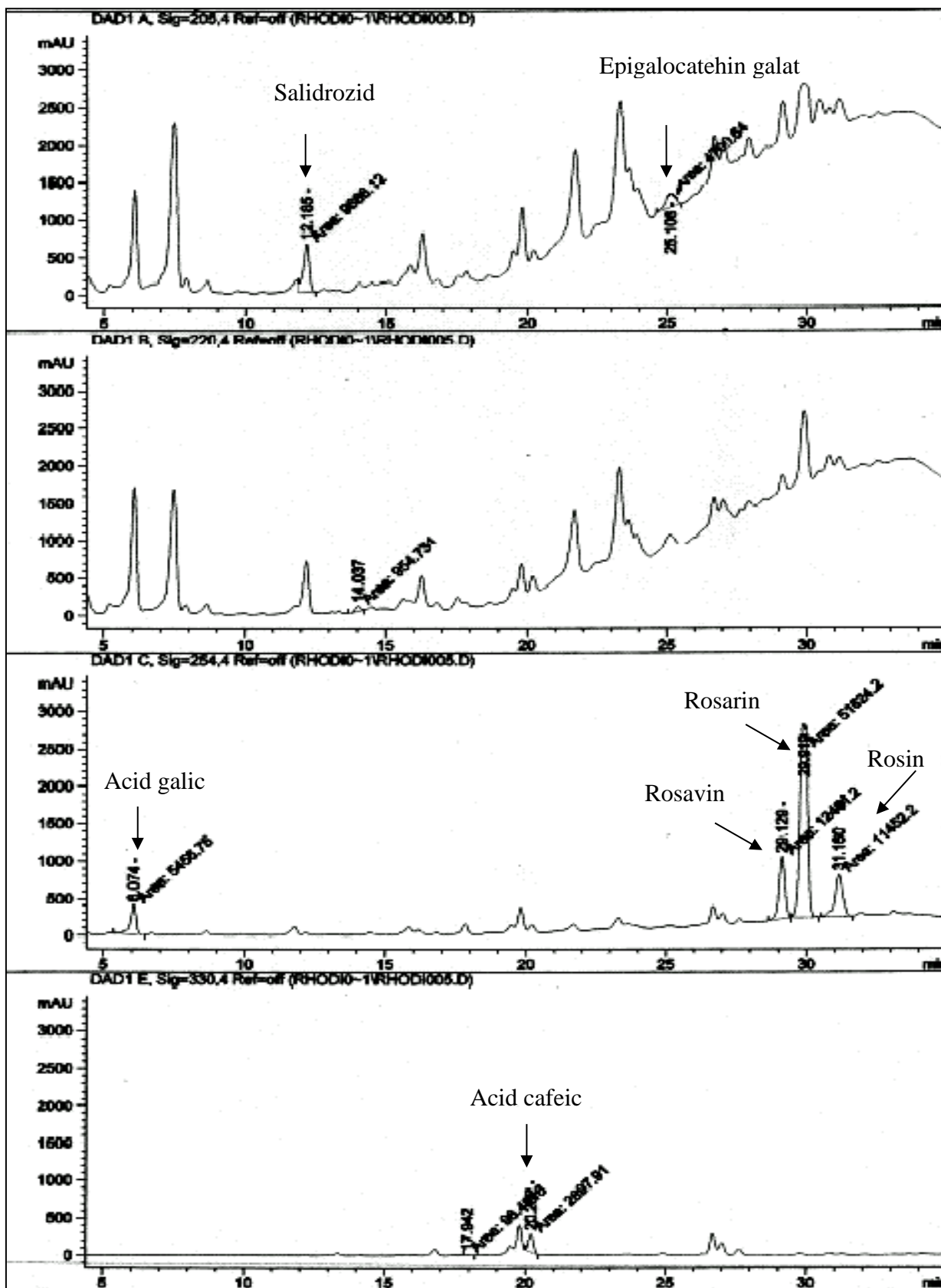


Fig. 3.11. Analiza HPLC a *metaboliților secundari* extrași din rizomii plantelor de *R. rosea* din flora spontană a Munților Carpați, Polonia și detectați pentru lungimile de undă: A – 205 nm; B – 220 nm; C – 254 nm; D – 330 nm.

Atât salidrozidul, cât și *p*-tirozolul reprezintă produsele aceleiași căi metabolice [173, 273]. Acest lucru indică faptul că resursele metabolice considerabile acumulate în biosinteza salidrozidului au fost inițial sub formă de *p*-tirozol, care ulterior au fost transformate în mod activ în salidrozid. De asemenea, concentrația scăzută a *p*-tirozolului și concentrația înaltă a salidrozidului sugerează că *p*-tirozolul are funcții limitate ca metabolit secundar [237]. De menționat, sunt și diferențele semnificative în concentrațiile fenilpropanoidelor. Acești compuși sunt biosintetizați prin aceeași cale metabolică și diferă numai prin unitatea de carbohidrat atașată, de exemplu, rosinul este precursorul de biosinteză a rosavinului.

Deși cele trei fenilpropanoide au căi de biosinteză similare, rosarinul a fost cel mai abundent component în toate loturile cercetate (Figura 3.12). Astfel, suma fenilpropanoidelor este mai mare cu 28% în rizomii plantelor din Ucraina (Figura 3.10C) și mai mică cu 12% în rizomii plantelor din Polonia (Figura 3.11C) față de cei din România (Figura 3.9C).

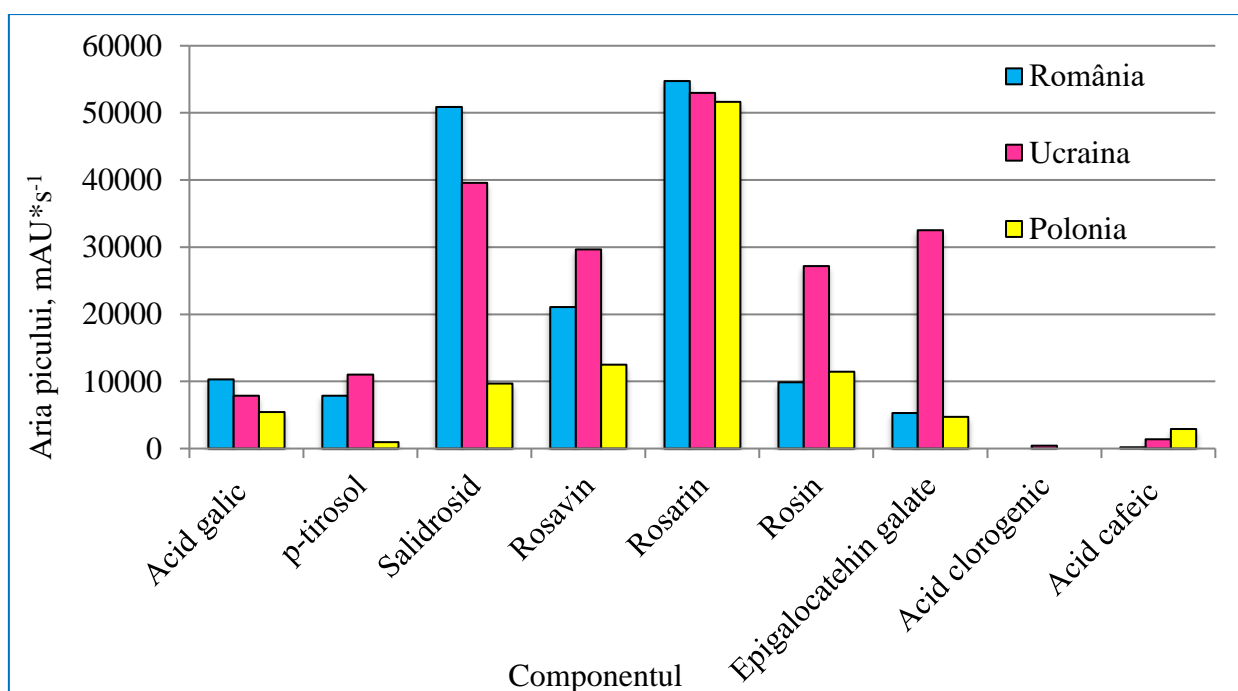


Fig. 3.12. Aria picurilor diferitor componente ai *metaboliților secundari* extrași din rizomii plantelor de *R. rosea* colectați în Carpații din România, Ucraina și Polonia și analizați prin cromatografia HPLC.

De asemenea au fost determinați și unii acizi fenolici, precum acidul galic, clorogenic și cafeic, ce se caracterizează printr-un conținut redus sau chiar lipsesc în unele probe (Figura 3.12).

Cercetări similare au fost efectuate în Nordul Norvegiei de către György [125] asupra plantelor colectate din zece habitate naturale cu utilizarea markerilor moleculari ISSR. Rezultatele cercetărilor au demonstrat că la nivelul speciilor se observă o variabilitate genetică ridicată, iar la nivelul populației - o variabilitate mai slabă. Prin urmare, analiza variației

moleculare a conținutului de glicozide a evidențiat că acumularea de *MS* în plantele de *R. rosea* este influențată doar de factorii de mediu [125]. Studiile efectuate de către cercetătorii din Polonia [221] confirmă rezultatele obținute de noi, care se caracterizează printr-un conținut mai redus al *MS* acumulați în rizomii plantelor de *R. rosea* față de cei din România și Ucraina.

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

Cultivarea plantelor de *R. rosea* în condiții *in vivo* reprezintă o cale ce ar putea asigura industria farmaceutică cu materie primă pentru a diminua impactul negativ al colectării excesive a plantelor din habitatele populațiilor naturale. Din literatura de specialitate se cunoaște că acumularea principiilor active în rizomii de *R. rosea* cultivați în Munții din provincia Alberta (Canada) sporește cu vârsta plantelor, atingând valoarea maximă la 4-5 ani. Această valoare se menține practic la același nivel până la vârsta de 7 ani, iar ulterior se manifestă tendința de scădere a conținutului de *MS* și a calității rizomilor [5]. Cercetări în acest domeniu au fost efectuate și de către cercetătorii din Rusia, Finlanda, Norvegia, Bulgaria, Polonia și China [104, 157, 221, 261, 282, 324]. După cum am menționat anterior, plantele de *R. rosea* cresc spontan și în Carpații din România [112] 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 (Figura A7.1).

Analiza calitativă a componentelor 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 [144]. 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 3.13).

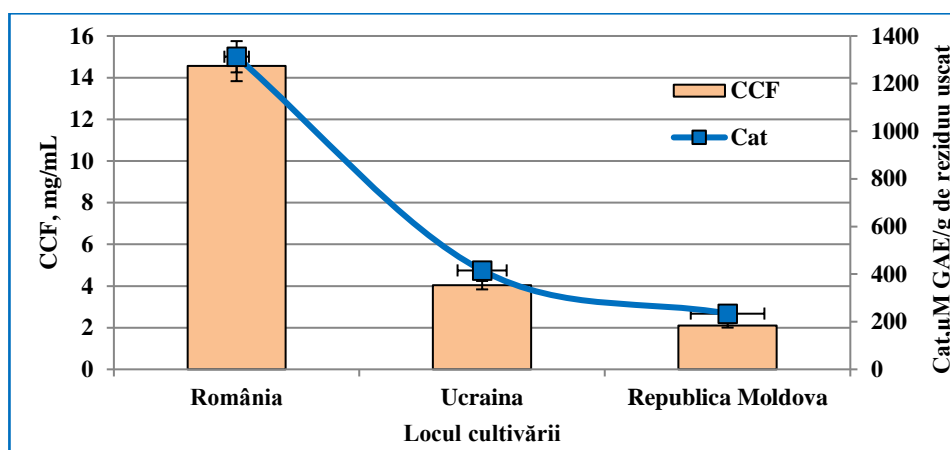


Fig. 3.13. Analiza compoziției metaboliților secundari ale extractelor din rizomii plantelor de *R. rosea* cultivate în condiții *in vivo*.

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 [32, 324], Polonia [221, 282], Bulgaria [217] etc. Trebuie remarcat faptul că nu numai prezența salidrozidului determină activitatea antioxidantă a extractelor din rizomii plantelor de *R. rosea*, ci și alte substanțe fenolice similare quercetinului [106, 144]. 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 [32].

Cultivarea plantelor de *R. rosea* în condiții de câmp este condiționată de probleme importante, și anume cheltuielile pentru cultivare relativ mari din cauza necesității obținerii și transplantării răsadului, perioada de 4-5 ani necesară pentru cultivarea de la plantare până la colectare. Suplimentar, pentru a asigura aprovizionarea constantă cu materie primă sunt necesare plantații noi în fiecare an. Din aceste cauze, plantațiile existente în prezent de cultivare sunt mici, iar costul producției este mare. Pe lângă toate acestea, nu este ușor să se obțină materie primă de o calitate uniformă din plantele spontane introduse direct în cultivare [32, 102]. Așadar, 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 [41, 43]. 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.

3.4. Concluzii la capitolul 3.

1. Datele analizei HPLC a extractelor din rizomii plantelor de *R. rosea* colectați în Munții Carpați, România, confirmă prezența *metaboliților secundari* 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.

2. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomii plantelor de *R. rosea* din populația carpatină confirmă prezența unor compuși terpenici caracteristici pentru această specie.

3. Analiza comparativă HPLC a extractelor din rizomii plantelor de *R. rosea* colectați din diferite habitate ale Munților Carpați confirmă prezența *metaboliților secundari*, care se caracterizează print-un conținut mai redus în rizomii colectați din Polonia față de cei din România și Ucraina.

4. 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, Republica Moldova, și Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, Ucraina, confirmă prezența *metaboliților secundari* 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*

Culturile de celulare vegetale reprezintă un instrument important pentru studiile fundamentale practice privind reglajul proceselor de biosinteză și acumulare a *MS* în plante [141, 150]. Metodele disponibile acestor biotehnologii includ inițierea culturilor dediferențiate (cultura calusului, suspensiilor celulare sau protoplastelor) și celor diferențiate (regenerarea plantei integre sau organului, precum lăstarii, rădăcinile, rădăcinile adventive etc.). Culturile diferențiate pot fi utile pentru studierea căilor de biosinteză specifice țesuturilor vegetale, care nu totdeauna sunt exprimate de către cultura suspensiei celulare. În schimb, culturile dediferențiate *in vitro* sunt mai convenabile pentru producerea pe scară largă a *MS* și pentru studiul proceselor celulare și moleculare, deoarece oferă avantajul unui sistem model simplificat pentru studiul proceselor de reglare a biosintezei și acumulării lor la plante [150, 226]. Culturile dediferențiate conțin populații de celule relativ omogene, permițând un acces rapid și uniform la nutriție, precursori, hormoni de creștere și compuși de semnalizare care influențează starea fiziologică a celulelor.

În prezent numărul publicațiilor privind introducerea în cultura *in vitro* a speciei *R. rosea* sunt limitate. Sistemul *in vitro* a culturii de *R. rosea* este utilizat în principal pentru procedeele de biotransformare a predecesorilor în scopul sporirii acumulării *MS* [122, 123, 124] sau pentru micropropagarea plantelor, prin intermediul cărora se vor putea restabili habitatele epuizate [165, 312]. Există un șir de factori care influențează inducerea culturii *in vitro* de *R. rosea*, inclusiv ecotipul plantei, tipul de explante, compoziția mediului nutritiv, iluminarea, temperatura și prezența precursorilor și elicitorilor [118, 295, 312]. În cercetările realizate de noi au fost trasate ambele obiective: elaborarea procedeelelor de micropropagare (1) și studiul influenței precursorilor, factorilor fizici și chimici asupra proliferării celulare și biosintezei *MS* caracteristici pentru *R. rosea* prin intermediul culturii *in vitro* (2).

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

Procesul de dediferențiere a culturii celulare este foarte complex și controlat de mai mulți factori, cum ar fi tipul și concentrația fitohormonilor, mediul nutritiv și faza de dezvoltare a explantului pe parcursul cultivării în condițiile *in vitro* [150]. Dintre cei mai importanți fitohormoni se consideră auxinele (ANA, AIA, AIB și 2,4-D), citokininele (BA, Kn, Zeatina, TDZ), ABA, giberelinele și etilena. Pentru optimizarea condițiilor de cultivare a calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*, creșterea a fost realizată pe mediul nutritiv Murashige-Skoog

[200] conținând diferiți fitohormoni în concentrații și raporturi diferite (Tabelul 4.1). Cea mai intensivă creștere a celulelor calusului de *R. rosea* s-a înregistrat pe mediul nutritiv ce conține fitohormonii BA și ANA 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 și 2,4-D 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 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. 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

Consistența calusului în toate variantele menționate în Tabelul 4.1 este friabilă. Calusul are culoare de la verde închisă (Fig. A8.1.A) până la gălbuie (Fig. A8.1.B). În unele variante calusul are nuanță roșiatică (Fig. A8.1.C). În timp ce culoarea verde se datorează conținutului înalt de clorofilă din celulele calusului, cea roșiatică denotă prezența în concentrații mai mari a antocienilor. Cercetări similare au fost descrise și de către alți autori [223, 242], care au introdus suplimentar Kn în mediul nutritiv. Acesta din urmă a și sporit acumularea antocienilor cu atât mai mult, cu cât concentrația Kn în mediul de cultivare este mai înaltă.

Utilizând calusul cu consistență friabilă a fost inițiată cultura agregatelor celulare în mediul lichid, lipsit de agar. Agregatele celulare cultivate în mediul nutritiv conținând BA aveau culoare verde deschisă (Fig. 8.2.A). Introducerea în mediul nutritiv a AIA a influențat starea agregatelor celulare, în ziua a 22-a de cultivare ele având culoarea verde-maronie (Fig. 8.2.B). Menționăm că cultura agregatelor celulare și-a păstrat structura compactă și volumul până la finele fazei

staționare (ziua a 20-a de cultivare). În condițiile de epuizare a nutrienților după finalizarea fazei staționare, agregatele celulare au început să se autolizeze, devenind friabile. Aceste caracteristici sunt asemănătoare cu cele ale agregatelor celulare de *R. sachalinensis* [146].

Datele incluse în Tabelul 4.1 sugerează că introducerea în mediul de cultivare a BA favorizează creșterea atât a culturii calusului, cât și a agregatelor celulare de *R. rosea*. Cercetări similare au fost efectuate și de către Tasheva [261] și Gyoergy [122], care au utilizat în mediul nutritiv 0,2 mg/L BA în combinație cu 0,1 mg/L AIA și, respectiv, 1,5 mg/L BA în combinație cu 0,5 mg/L ANA (la fel ca și în cercetările noastre) [33, 40]. Într-o serie de lucrări a fost demonstrat că inducerea și creșterea calusului este dependentă de ecotipul explantului [296, 312], de aceea raportul fitohormonilor din mediul de cultivare trebuie să fie apreciat în perioada de introducere a materialului biologic în mediul de cultură. De exemplu, inducerea calusului la ecotipurile de *R. rosea* din Uralul de Sud și Altai (Federația Rusă) a fost determinată de BA și AIA, concentrația cărora a variat între 0,1-0,2 mg/L [312]. În alte studii, la ecotipurile din Altai inducerea calusului a fost definită de concentrația BA de 10-15 ori mai mare în comparație cu ecotipul tibetan de *R. rosea* [295]. De menționat că în majoritatea cercetărilor a fost demonstrată influența benefică a BA asupra proceselor de proliferare celulară atât în cultura calusului, cât și în cea a agregatelor celulare. De asemenea, citokininele nu numai că stimulează diviziunea celulară, dar la fel rețineau senescența. Se presupune că ultimul efect se datorează reducerii concentrației de radicali liberi, care ar putea distruge integritatea membranelor celulare [302].

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.

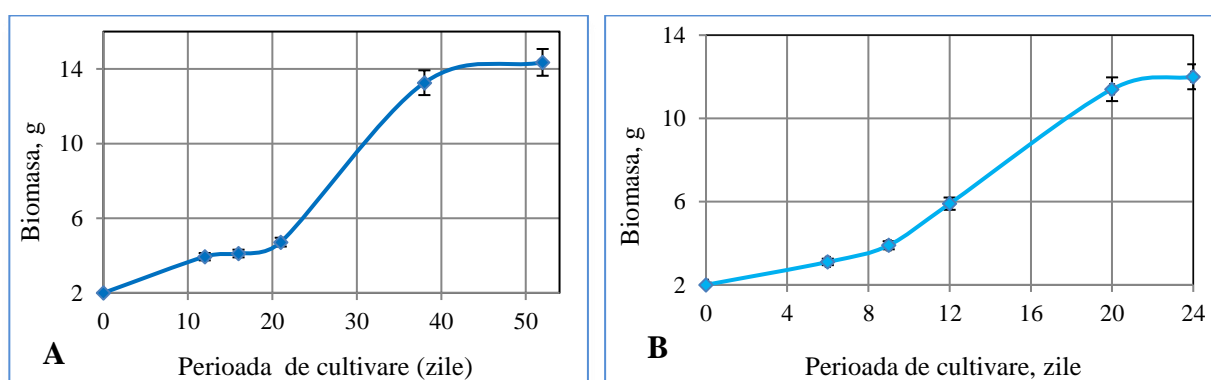


Fig. 4.1. Dinamica creșterii biomasei proaspete a calusului (A) și agregatelor celulare (B) de *R. rosea* în dependență de durata de cultivare.

În conformitate cu legăturile descrise pentru alte culturi [67, 184, 254], 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. Perioada de adaptare (faza *lag*), în timpul căreia celulele explantului se pregătesc pentru a se divide, este reprezentată printr-o creștere lentă a biomasei, care în condițiile create de noi pentru cultura calusului a durat 16 zile după transplantare, iar pentru cultura agregatelor celulare - 6 zile. Faza de creștere rapidă (*exponențială* numită și *logaritmică*) s-a manifestat pentru celulele calusului de la a 17-a până în ziua 37-a de la transplantare. În cultura agregatelor celulare această perioadă a durat doar 9 zile (de la a 7-a până la a 16-a zi). Faza menționată reprezintă perioada de divizare celulară rapidă. Din literatura de specialitate se cunoaște că în faza exponențială de creștere, *MS* se acumulează în cantități mici, deoarece precursorii lor, *MP*, sunt implicați în procesele de proliferare și acumulare a biomasei [225]. De asemenea, a fost demonstrat că biosinteza și acumularea *MS* din compușii primari se manifestă pronunțat în faza *staționară* de creștere [67, 184]. Faza *staționară* pentru cultura calusului a durat de la a 38-a până la a 50-a zi de cultivare, biomasa calusului rămânând constantă (Figura 4.1A), (chiar până la a 90-a zi de cultivare, datele nu sunt prezentate), [40]. În cultura agregatelor celulare faza *staționară* se instalează după 17 zile de cultivare (Figura 4.1B). În literatură se menționează că replicarea culturii trebuie să fie realizată înaintea trecerii ei la faza *staționară* de creștere, care se apreciază prin brunificarea culturii și pierderea viabilității celulare [254]. Ținând cont de aceasta, pentru menținerea culturii calusului și agregatelor celulare materialul pentru pasaj este necesar să fie prelevat în ziua 40-a și, respectiv, a 17-a, ceea ce corespunde perioadei timpurii a fazei *staționare* la ambele culturi [40]. Transferarea culturii pe un mediu proaspăt de cultivare la intervale regulate poate evita procesele de senescență, induse de reducerea conținutului de nutrienți și de acumularea în mediu a substanțelor toxice la perioade mai târzii de cultivare [254]. În așa fel, pentru menținerea calusului și agregatelor celulare sunt suficiente 40-45 zile și, respectiv, 20-22 zile de cultivare. Raportul masei uscate a calusului în faza *lag* și cea *logaritmică* față de cea umedă a fost relativ mai jos în comparație cu acest raport pentru faza *staționară* [40]. Aceasta demonstrează că în faza *staționară* are loc deshidratarea relativă a celulelor calusului, ceea ce ne indică despre acumularea masei uscate și, inclusiv, a *MS*.

Perioada de creștere după subcultivarea celulelor calusului și agregatelor celulare și până la a 50-a zi de cultivare a calusului și a 22-a zi de cultivare a agregatelor celulare a fost divizată în subfaze, în total delimitând șapte subfaze de creștere: faza *lag* timpurie (FLT_p), faza *lag* târzie (FLT), exponențială timpurie (FET_p), exponențială mijlocie (FEM), exponențială târzie (FET), staționară timpurie (FST_p) și faza *staționară* (FS) (Tabelul 4.2).

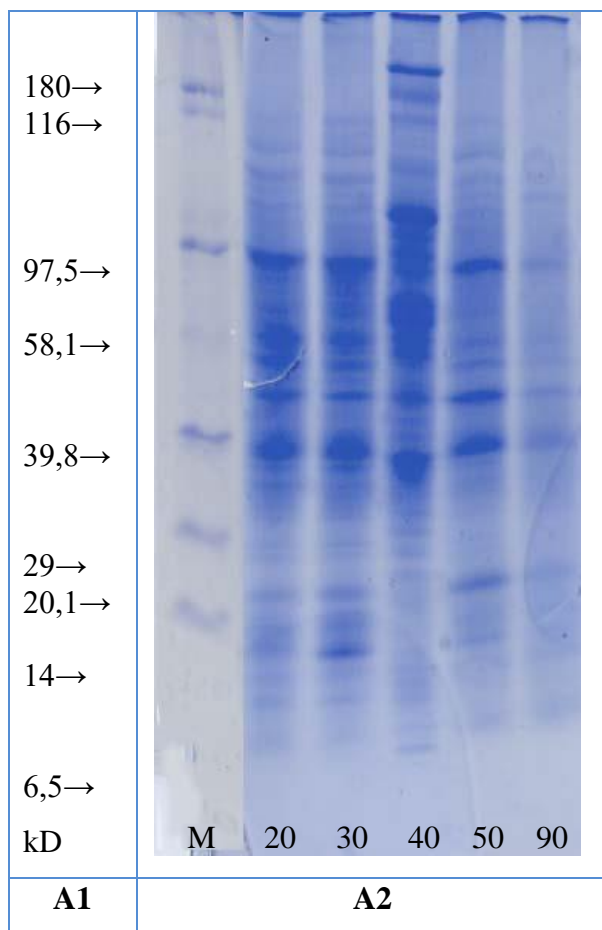
Tabelul 4.2. Delimitarea fazelor de creștere a calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* în baza cineticii de acumulare a biomasei

Explantetele	Fazele de creștere, zile						
	Faza lag		Faza exponențială			Faza staționară	
	Faza lag timpurie	Faza lag târzie	Faza exponențială timpurie	Faza exponențială mijlocie	Faza exponențială târzie	Faza staționară timpurie	Faza staționară
Calusul	0-11	12-16	17-21	22-34	35-37	38-39	40-45
Agregatele celulare	0-3	4-6	7-9	10-13	14-16	17-19	20-22

Prin urmare, realizând aceste delimitări ale subfazelor de creștere a devenit posibil de a determina specificul acțiunii factorilor fizici și chimici asupra creșterii și acumulării *MS* în biomasa culturilor în cercetările ulterioare. În literatura de specialitate există informație că expunerea culturilor *in vitro* la acțiunea factorilor de stres nespecifici în subfaza *exponențială* târzie poate duce la stimularea biosintezei și acumulării *MS* [225]. Influența diferitor factori fizici și chimici asupra acumulării *MS* la diferite faze de creștere poate asigura optimizarea condițiilor de cultivare *in vitro* pentru sporirea atât a biomasei, cât și a conținutului de *MS*. Condițiile în care se blochează creșterea activă a celulelor, ca regulă, simultan activează enzimele metabolismului secundar [225].

4.2. Spectrul polipeptidelor în extractele din celulele calusului de *R. rosea* la diferite faze de creștere

Datele din literatură relevă faptul, că expresia polipeptidelor variază în funcție de diferite etape de dezvoltare și de expresia diferențiată a genelor structurale [64]. Din aceste considerente, spectrul polipeptidelor poate servi ca markeri moleculari pentru evidențierea proceselor de defirențiere și derulare a potențialului organogen *in vitro* și *in vivo* [64, 168, 296]. Pentru identificarea modificărilor spectrului polipeptidelor, extrase din celulele calusului de *R. rosea* la diferite faze de creștere, a fost analizat spectrul polipeptidelor prin metoda electroforezei în gel de poliacrilamidă în prezența SDS. În Figura 4.2 este reprezentată fotografia electroforegramei polipeptidelor extrase din celulele calusului de *R. rosea* de diferită vârstă. În baza electroforegramei obținute putem menționa că profilul spectrului proteic se modifică substanțial la unele faze de creștere a calusului. Aceasta se referă în primul rând la spectrul polipeptidelor extrase din celulele calusului la vârsta de 40 zile. În aceste celule se acumulează la un nivel considerabil polipeptide noi cu masa moleculară relativă 146, 99, 95, 93, și 62 kD, conținutul componentului cu masa moleculară relativă 38 kD dublându-se. Putem remarca dispariția polipeptidelor cu MMR 41 și 25 kD. Mai târziu majoritatea componentelor menționate dispar.



În schimb apare componenta cu MMR 29, 8 kD. În extractele din calusul de 90 zile polipeptidele cu MMR mare practic dispar, ceea ce indică trecerea calusului la faza de declin (descompunere). În așa fel, analizând spectrul polipeptidelor din celulele calusului de *R. rosea* obținem informație suplimentară despre schimbarea stării celulelor calusului odată cu creșterea perioadei de cultivare și trecerea calusului de la o etapă de creștere la alta. Din punct de vedere practic, este important faptul că sfârșitul *fazei logaritmice* și începutul celei *staționare* este însoțit de sporirea complexității spectrului polipeptidic, fapt ce sugerează ideea despre schimbările în expresia genelor, ceea ce se manifestă în sporirea procentului masei uscate a biomasei și ar putea provoca acumularea *MS*, care după datele din literatura de specialitate se amplifică în această perioadă [296]. Dispariția polipeptidelor cu MMR mare la perioadele mai târzii de cultivare demonstrează agravarea proceselor proteolitice și degradarea celulelor calusului.

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

Radiația ultravioletă (*UV*) reprezintă un factor important pentru dezvoltarea plantelor, care în doze mari provoacă starea de stres. Indiferent de amploarea și starea impactului, iradierea cu

razele *UV* modifică procesele de creștere și dezvoltare a plantelor [211]. Se știe că durata expunerii și doza de răspuns sunt esențiale pentru reacțiile metabolice din celulele vegetale. Cercetările din acest domeniu au demonstrat acumularea *MS* în celulele și țesuturile plantelor cultivate după iradiere, în special, cu doze mici ale razelor *UV-B* (280-315 nm) și *UV-C* (200-280 nm) [238]. Dozele mari de radiații *UV-B* și *UV-C* induc modificări distructive în celulele organismului, inhibă creșterea, micșorează conținutul de substanțe de protecție nespecifică [211]. Totodată, Schreiner și colab. [238] au raportat că iradierea cu raze *UV*, în special *UV-B*, influențează favorabil acumularea *MS* ca substanțe de protecție. Cercetările efectuate de către Tasheva, privind iradierea calusului obținut din plantele de *R. rosea* de origine bulgară cu raze *UV* [264], au demonstrat că modificările în dinamica acumulării biomasei reprezintă un proces important pentru evaluarea sensibilității culturii *in vitro* la iradierea cu doze mici ale razelor *UV-B*. Acest parametru reflectă efectul cumulativ al perturbărilor minore în funcționalitatea culturii. Iradierea cu raze *UV-B*, de asemenea, a indicat reducerea acumulării biomasei în castraveți [166], spanac [3, 195] și fasole mung [3]. Cu toate acestea, 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 4.3).

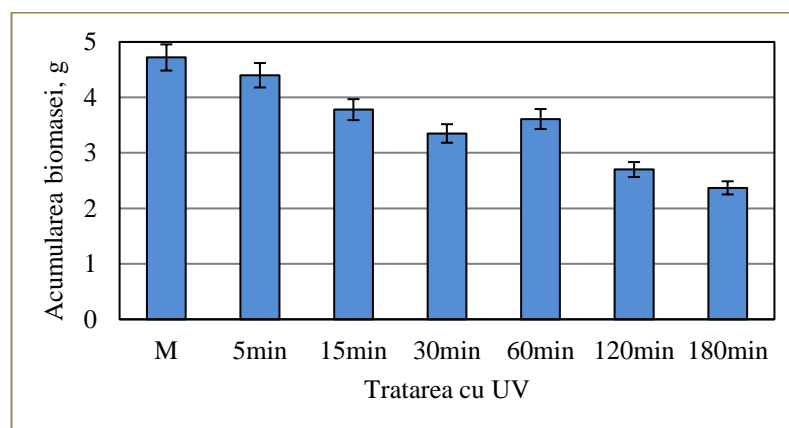


Fig. 4.3. Acumularea biomasei calusului de *R. rosea* tratat zilnic cu raze *UV-B* pe parcursul a 0 (martor-M), 5, 15, 30, 60, 120 și 180 min începând cu ziua a 12-a după inoculare și terminând cu a 30-a zi de cultivare.

Cu cât durata de acțiune a razelor *UV-B* asupra calusului este mai îndelungată, cu atât inhibarea creșterii biomasei calusului este mai profundă, iar culoarea calusului sugerează despre stoparea proceselor de proliferare (Fig. A9.1). Menționăm că sub acțiunea radiației *UV-B* calusul se decompactează și pierde culoarea verde. Aceste efecte se manifestă foarte evident deja în varianta

cu acțiune de scurtă durată a razelor *UV-B* (pe parcursul a 30 min). De aici rezultă că radiația *UV-B* reprezintă un factor ce frânează proliferarea celulelor calusului de *R. rosea*, ceea ce se manifestă atât prin diminuarea dinamicii de acumulare a biomasei, cât și prin schimbarea aspectului celulelor calusului.

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 4.4 și 4.5). 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 4.4). Analizând datele prezentate în Figura 4.5 menționăm tendința evidentă de sporire a activității 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 [38].

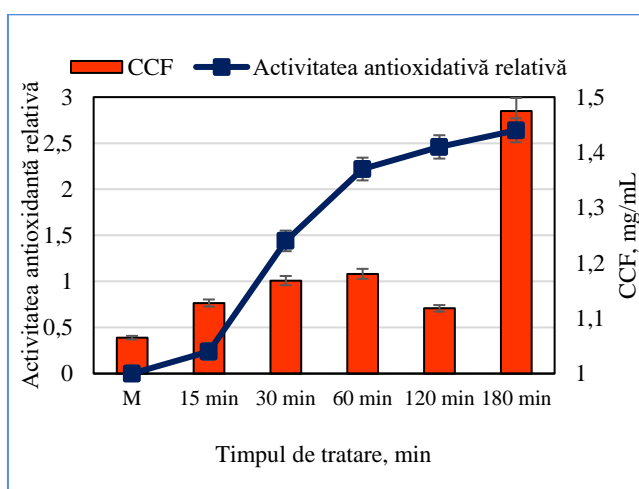


Fig. 4.4. Influența radiației *UV-B* pe parcursul a 0 (martor-M), 5, 15, 30, 60, 120 și 180 min, aplicate în ziua a 12-a de cultivare, asupra activității antioxidante relative și conținutului compușilor fenolici în extractele din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 30-a).

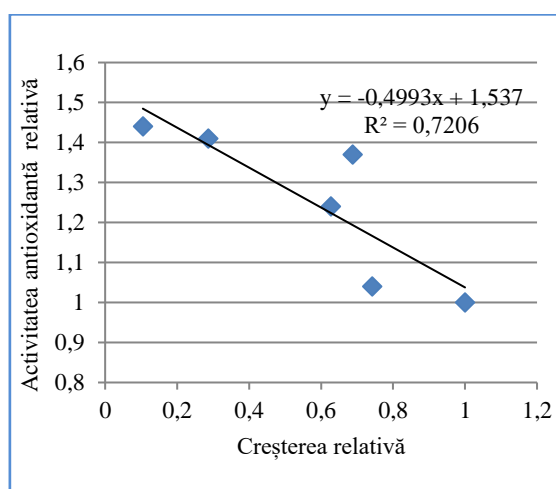


Fig. 4.5. Dependența dintre valorile activității antioxidante relative a extractelor și creșterea relativă a calusului de *R. rosea* tratat cu raze *UV-B* timp de 0 (martor-M), 5, 15, 30, 60, 120 și 180 min în ziua a 12-a de cultivare, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 30-a).

Luând în considerare faptul că diminuarea activității antioxidante relative se manifestă foarte pronunțat după atingerea creșterii relative a valorii de 0,6 (Figura 4.5), iar acest nivel de creștere relativă se observă la durata de expoziție cu radiația *UV-B* pe parcursul a 60 min, Figura

4.3, tragem concluzia că pentru acumularea unei cantități maxime de substanțe cu efecte antioxidante durată optimă de expoziție a calusului la raze UV-B este de 60 min. Extinderea duratei de expoziție duce la stagnarea creșterii biomasei calusului, Figura 4.3, de aceea aceste doze depășesc valorile optime privind activitatea antioxidantă totală a extractelor din biomasa calusului acumulată în aceste variante.

În așa fel, radiația UV reprezintă un factor important care influențează acumularea compușilor fenolici în celulele calusului de *R. rosea*. Cu toate acestea, atât conținutul compușilor fenolici, cât și capacitatea lor antioxidantă rămân mult mai joase în comparație cu parametrii caracteristici pentru extractele din rizomi de *R. rosea*, colectați din Munții Carpați.

4.4. Influența temperaturilor joase pozitive asupra creșterii biomasei calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*, precum și a parametrilor biochimici ai extractelor din biomasa acestora

Unul dintre principalii factori care determină posibilitatea existenței plantelor într-un anumit habitat este temperatura. Schimbările de temperatură provoacă modificări ale proceselor metabolice din celula vegetală, iar condițiile ce provoacă stresul pronunțat pot duce la deteriorarea sau chiar moartea plantelor. În dependență de specia plantelor, intervalul de temperaturi favorabile pentru creștere și dezvoltare este cuprins între 10 și 35°C. Temperaturile de 35°C și 5 – 4°C sunt considerate *temperaturile pragului critic* de tranziție de la condițiile favorabile la condițiile nefavorabile [309].

Mulți cercetători au examinat 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. Rezultatele aprecierii influenței temperaturilor de +4°C și +8°C pe parcursul a 3 și 6 ore asupra acumulării biomasei calusului de *R. rosea*, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, sunt prezentate pentru perioada de vară, Figura.4.6A și toamnă, Figura.4.6B. 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. Interesant este și faptul că expunerea la *temperaturi joase pozitive* a asigurat sporirea semnificativă asupra indicelui de creștere al calusului atât în perioada de vară, cât și în cea de toamnă. Totodată, valorile de sporire ale acestui indice au fost mai înalte în perioada de vară în comparație cu cele de toamnă.

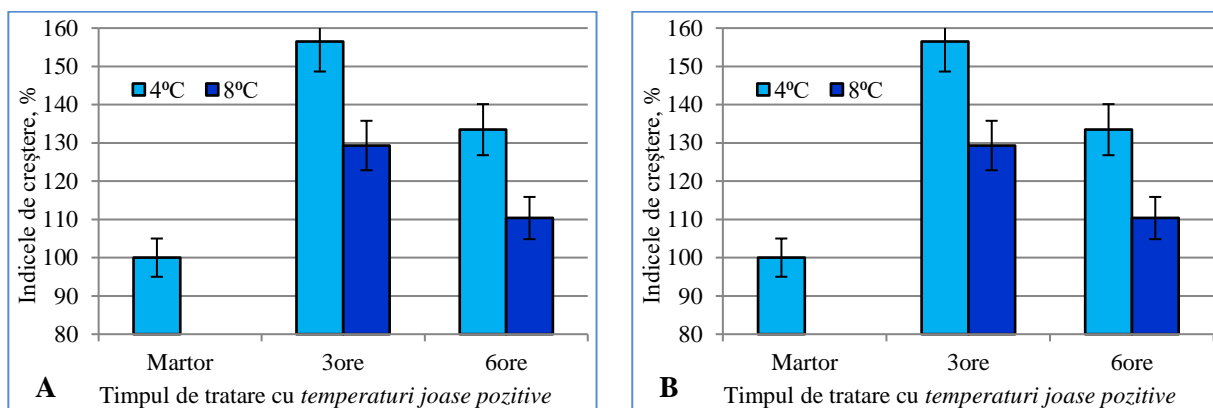


Fig.4.6. Influența temperaturilor de +4°C și +8°C pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, asupra acumulării biomasei calusului de *R. rosea* determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a) A (vara, luna iunie) și B (toamna, luna octombrie).

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. În cazul variantei experimentale cu temperatura de +4°C, pe parcursul a 3 și 6 ore, această valoare a atins un spor de 56% și, respectiv, 33,5% față de varianta martor (Figura 4.6.A, B). Din rezultatele obținute în cazul variantei experimentale cu temperatura de +8°C, această valoare a atins un spor de ≈36% și, respectiv, 27% față de varianta martor (Figura 4.6.A, B).

Cercetările efectuate au demonstrat că calusul de *R. rosea* cultivat timp îndelungat și supus ulterior tratării cu *temperaturi joase pozitive* (+4°C, +8°C) este bine adaptat la condițiile de cultivare *in vitro*. Aceasta ne relevă indicele de creștere, care este mai mare de 1,56 ori, în cazul variantei tratate cu temperatura de +4°C, pe parcursul a 3 ore, comparativ cu martorul. Indicele de creștere al culturilor celulare și țesuturilor cultivate *in vitro* este unul din factorii limitativi pentru implementarea în practică a acestora. Rezultatele obținute sugerează că în cazul dat calusul de *R. rosea* manifestă caracteristici de adaptare pentru supraviețuire, care ar putea fi evaluate ca un sistem de cultură model pentru speciile de aceeași natură. Aceste rezultate, în opinia noastră, sunt de interes practic în legătură cu problema sporirii creșterii biomasei atât a culturilor celulare, cât și a țesuturilor producătoare de compuși valoroși.

Este cunoscut faptul că modificările celulare induse de către oricare dintre temperaturile extreme (ridicate sau joase), includ răspunsul ce conduce la acumularea în exces a compușilor toxici, în special a *SRO* [192]. Plantele posedă diferite sisteme de apărare antioxidante pentru minimizarea efectelor nocive ale *SRO*.

Procesele care implică controlul concentrației *SRO* în celulele plantelor sunt asociate cu biosinteza și acumularea *MS* în ele, ceea ce reprezintă un interes deosebit pentru cultura *in vitro* de *R. rosea*. Printre *SRO*, o atenție deosebită a fost atrasă conținutului de H_2O_2 . În prezent este demonstrat că H_2O_2 participă la reglarea mai multor procese fiziologice, cum ar fi dobândirea rezistenței, consolidarea peretelui celular, senescența, producerea fitoalexinelor, fotosinteza, deschiderea stomatelor etc. [203, 300]. Multifuncționalitatea, pe de o parte, și pericolul prezenței în concentrații ridicate, pe de altă parte, impune controlul foarte strict al concentrației H_2O_2 în celulele vegetale. Producția activă a H_2O_2 în celulele vegetale este o condiție preliminară pentru creșterea, dezvoltarea normală și moartea celulelor [192]. Luând în considerare cele menționate, am realizat cercetări privind activitatea substanțelor oxidative în cultura *in vitro* de *R. rosea* supuse influenței *temperaturilor joase pozitive*.

Rezultatele aprecierii influenței temperaturii de $+4^\circ C$ pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului de H_2O_2 în calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a) (Figura 4.7) au relevat că conținutul minim al peroxidului de hidrogen a fost înregistrat în calusul cultivat în varianta martor (7,15 mM H_2O_2/g biomasă), care nu a fost tratat cu *temperaturi joase pozitive*, iar cea mai mare cantitate de H_2O_2 a fost determinată la varianta calusului tratat cu temperatura de $+4^\circ C$ pe parcursul a 3 ore (13,73 mM H_2O_2/g biomasă) și, respectiv, 6 ore (10,84 mM H_2O_2/g biomasă).

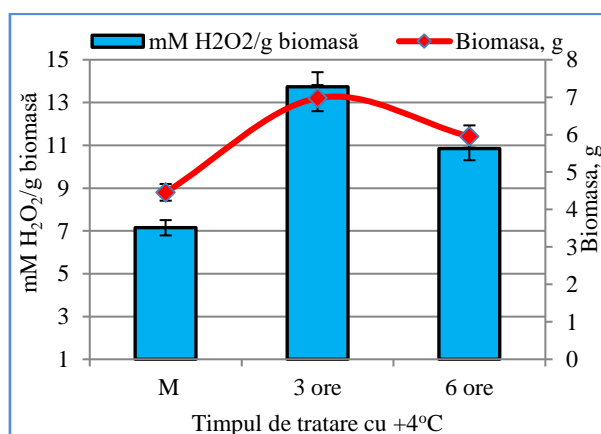


Fig.4.7. Influența temperaturii de $+4^\circ C$ pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra biomasei calusului și conținutului de H_2O_2 în extractele din celulele calusului de *R. rosea*, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

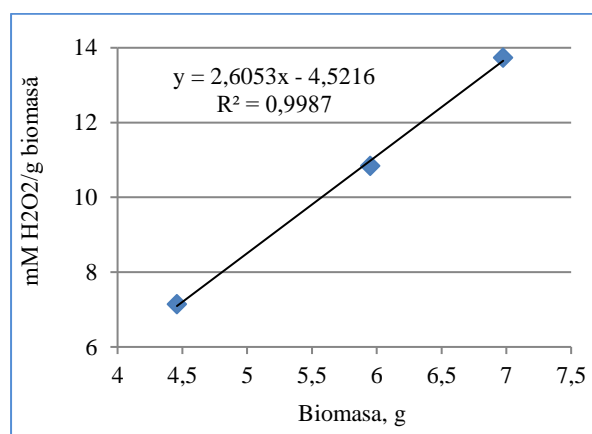


Fig.4.8. Dependența dintre valorile biomasei calusului și conținutului de H_2O_2 în extractele din celulele calusului de *R. rosea*, tratat cu temperatura de $+4^\circ C$ pe parcursul a 3 și 6 ore în ziua a 20-a de cultivare, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

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 4.7). 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 4.8). Din literatura de specialitate se știe că ciclurile metabolice se activează în celulele cu proliferare activă [253]. Aceasta duce la mărirea conținutului de peroxid de hidrogen, care iese de sub control și induce procesele ce asigură mărirea activității catalazelor care sunt necesare pentru degradarea lui [179]. Datele obținute demonstrează că totuși conținutul peroxidului în biomasa calusului este cu atât mai mare, cu cât acumularea biomasei este mai înaltă, deci și proliferarea celulelor este mai intensivă.

De aici rezultă că conținutul peroxidului în cultura calusului de *R. rosea* poate fi un indice al activității proceselor proliferative ale celulelor. În așa fel, putem concluda că șocul cu temperaturi joase pozitive activează procesele de proliferare ale celulelor, deci manifestă tendința de rejuvenilizare a celulelor calusului de *R. rosea*. Pentru a valida această viziune a fost necesar să apreciem activitatea PO și CAT ca indicatori ai proceselor de descompunere a peroxidului de hidrogen și a viabilității celulelor calusului. Totodată, este necesar să menționăm că CAT joacă un rol important în procesele de creștere și diferențiere a culturilor vegetale, iar activitatea lor ridicată ar putea corela cu procesul de proliferare în timpul inducerii activității lor [140].

Analizând valorile activității CAT în extractele din calusul de *R. rosea* după 40 de zile de cultivare (Figura 4.9A) observăm că maximum 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.

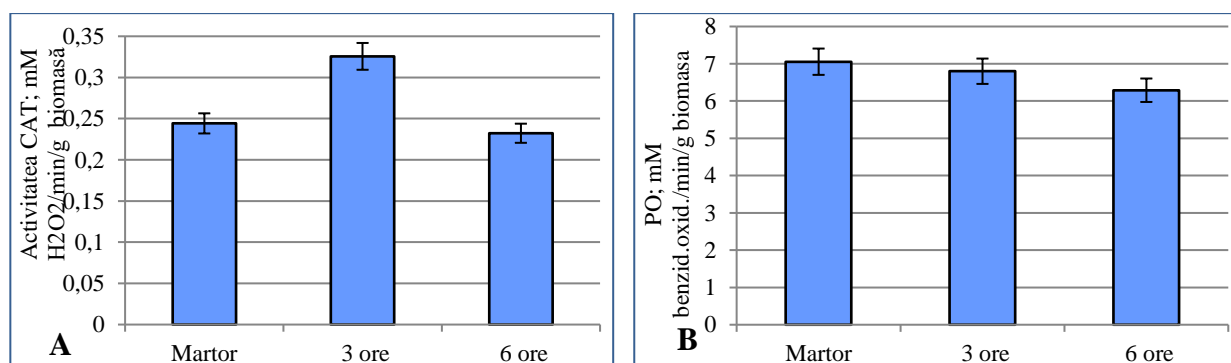


Fig.4.9. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra activității CAT (A) și PO (B) în extractele din calusul de *R. rosea* determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

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.

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 4.9A) 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 PO (Figura 4.9B) a fost înregistrată în extractele din calusul de *R. rosea* după 40 de zile de cultivare, de la 7,05 unități benxid.oxid./min/g biomasă la martor la 6,80 și 6,29 unități benxid.oxid./min/g biomasă în varianta expusă șocului cu temperatura de +4°C pe parcursul a 3 ore și, respectiv, 6 ore. Analiza activității enzimice 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 [210], participă nu numai la detoxifierea H₂O₂, dar și în alte procese importante pentru dividerea și diferențierea celulelor [210].

În acest context, activitatea mai mare sau la același nivel a principalelor enzime antioxidante extrase din calusul de *R. rosea*, concomitent cu conținutul de H₂O₂ este în concordanță cu rezultatele mai multor autori pe culturi de țesuturi ale diferitor specii de plante [255, 267, 301]. De asemenea, este cunoscut faptul că sub acțiunea stresului raportul enzimelor antioxidante se poate schimba în dependență de specia plantei [246].

Luând în considerare faptul că sub influența *temperaturilor joase pozitive* se manifestă tendința de rejuvenilizare a celulelor calusului de *R. rosea*, am determinat influența acestui factor asupra perioadei de intrare a culturii calusului în faza de senescență. Acest obiectiv a fost realizat prin determinarea viabilității celulelor calusului de *R. rosea* la etape diferite de cultivare. Testele de determinare a viabilității s-au bazat pe determinarea integrității membranei celulare, apreciind difuzia citoplasmatică a colorantului Metilen blue [12]. Acest procedeu este rapid și precis. Drept exemplu de determinare a viabilității celulelor calusului de *R. rosea* au servit probele prelevate în ziua a 20-a după aplicarea temperaturii de +4°C, pe parcursul a 3 ore (în total 40 zile de cultivare). Procentul celulelor moarte ale calusului de *R. rosea* expus șocului cu temperatura de +4°C pe parcursul a 3 ore este de 4 ori mai jos în comparație cu calusul din varianta martor, ceea ce demonstrează întârzierea trecerii la senescență a celulelor din varianta experimentală (Figura 4.10A). Acest efect benefic al șocului cu temperatura de +4°C a asigurat majorarea masei celulelor calusului cu 41% față de cea caracteristică pentru calusul din varianta martor (Figura 4.10B). Datele prezentate demonstrează indirect trecerea mai rapidă la senescență a celulelor calusului din varianta martor în comparație cu cele ale calusului care în *faza exponențială* au fost expuse șocului cu temperatura de +4°C.

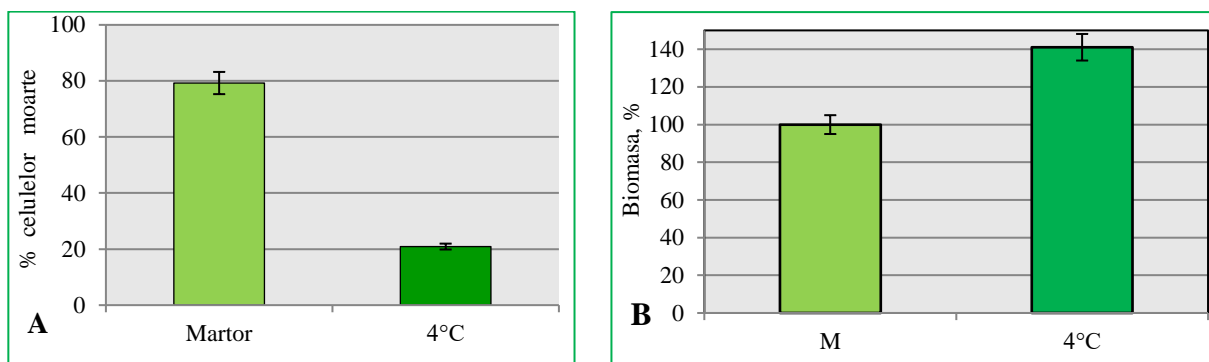


Fig.4.10. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra procentului de celule moarte (A) și acumularea biomasei (B) în calusul de *R. rosea* determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Un alt indice utilizat pentru a aprecia influența șocului cu temperaturi joase pozitive asupra fenomenului de menținere a viabilității celulelor calusului de *R. rosea* a fost analiza extractelor privind conținutul pigmentilor clorofilieni. Datorită implicării acestor pigmenți în procesul de fotosinteză și indirect în procesele de creștere, se presupune ca concentrația lor să fie mai mare în calusul cu un procent mai înalt de celule viabile. Luând în considerare aceasta, am determinat cantitatea de clorofilă *a* și *b*, cantitatea totală de pigmenți verzi (clorofila *a* + *b*) și conținutul carotenoidelor (Figura 4.11).

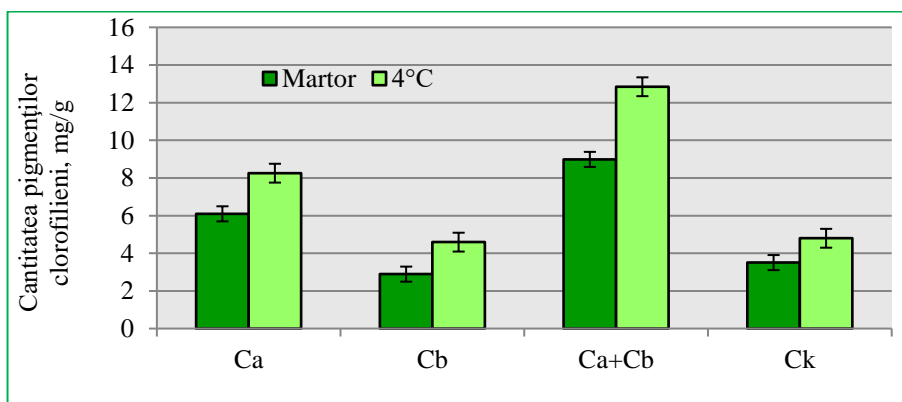


Fig. 4.11. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra cantității pigmentilor clorofilieni în calusul de *R. rosea* determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Extragerea pigmentilor asimilatori din calusul de *R. rosea*, după 40 zile de cultivare, ne indică că conținutul de clorofilă *a* în extractul calusului cultivat în varianta martor este relativ jos (6,09 mg/g de material vegetal proaspăt), iar în varianta experimentală (calusul expus la temperatura de +4°C pe parcursul a 3 ore) conținutul a crescut până la 8,25 mg/g, fapt ce demonstrează sporirea conținutului acestui pigment. Cantitatea înregistrată a marcat un spor cu 47% față de varianta martor. Aceeași tendință se observă și în cazul clorofilei *b*, cantității totale de

pigmenți verzi (clorofila *a* și *b*) și, respectiv, a carotenoidelor (Figura 4.11). În general aceste date atestă viziunea despre influența benefică a șocului cu *temperaturi joase pozitive*, aplicat asupra calusului de *R. rosea* în *faza exponențială* de creștere a lui.

Datele privind conținutul compușilor fenolici (CCF) și capacitatea antioxidantă totală (Cat) a extractelor din varianta martor și cea experimentală (Figura 4.12) indică că atât valorile conținutului compușilor fenolici (Figura 4.12A), cât și valorile capacității antioxidante totale (Figura 4.12B) a extractelor din calusul variantei experimentale au fost mai joase decât valorile caracteristice pentru varianta martor. Totodată, datele prezentate demonstrează că capacitatea antioxidantă totală corelează pozitiv cu conținutul compușilor fenolici.

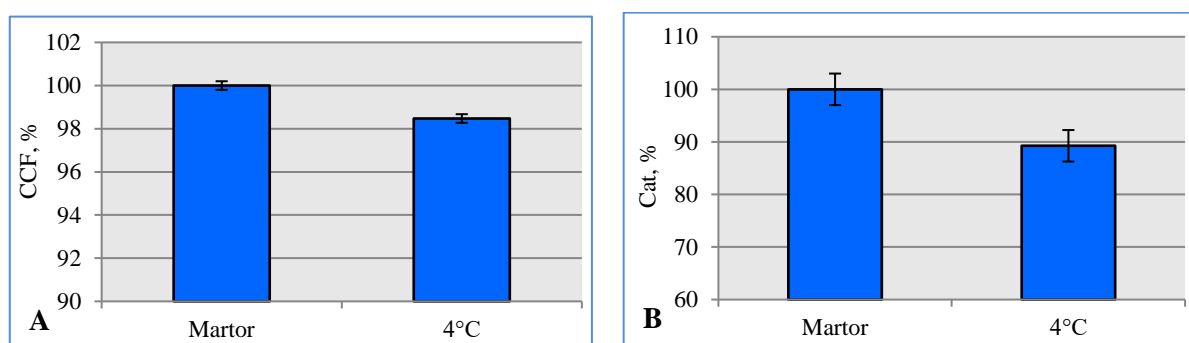


Fig.4.12. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului compușilor fenolici (CCF)(A) și capacității antioxidante totale (Cat) (B) în extractele calusului de *R. rosea* determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Datele cantitative privind conținutul total de flavonoide (CTF) în calusul de *R. rosea* în dependență de aplicarea temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore (Figura 4.13) indică că valorile conținutului total de flavonoide a scăzut semnificativ în comparație cu valorile variantei martor. În așa fel, aceste date susțin viziunea că șocul cu *temperaturi joase pozitive* reține trecerea la senescență a celulelor calusului, trecere care deseori este însoțită de acumularea compușilor fenolici și a flavonoidelor [18].

În concluzie, deși calusul reprezintă un țesut dediferențiat, tratarea lui cu *temperaturi joase pozitive* determină fenomenul de reținere a trecerii culturii calusului de *R. rosea* de la *faza exponențială* de creștere la cea *staționară*, ceea ce asigură sporirea acumulării biomasei totale.

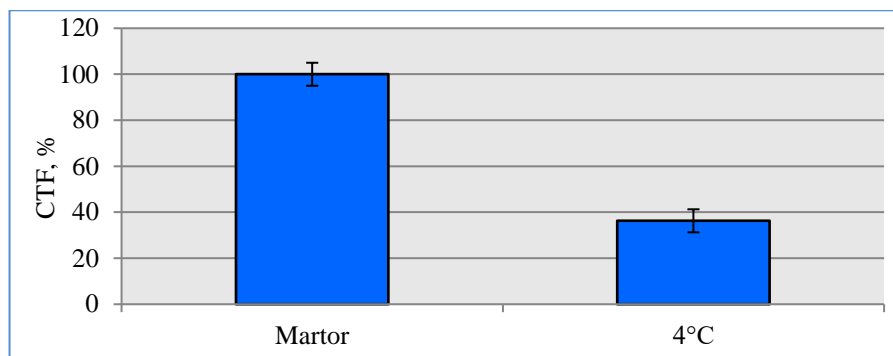


Fig.4.13. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului total de flavonoide (CTF) în extractele calusului de *R. rosea* determinat la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Aceste efecte benefice ale șocului cu *temperaturi joase pozitive* sunt asociate cu sporirea conținutului pigmentilor implicați în procesul de fotosinteză și cu tendința de diminuare a conținutului componentilor ce determină potențialul oxido-reducător al celulelor în perioada de trecere la senescență [18]. Aceasta sugerează că prin combinarea rațională a factorilor caracteristici pentru condițiile naturale de creștere a speciei *R. rosea* (variația temperaturii și a activității razelor ultraviolete) este posibil de a influența creșterea și acumularea *MS* în biomasa plantelor de *R. rosea* cultivate în condiții *in vivo*. De aici rezultă că sporirea randamentului de obținere a *MS* în cultura *in vitro* de *R. rosea* poate fi realizată prin combinarea rațională a expozițiilor la *temperaturi joase pozitive* și *radiații UV*.

4.5. Influența temperaturilor negative asupra parametrilor fiziologici ai calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*, precum și a parametrilor biochimici ai extractelor din biomasa acestora

Din literatura de specialitate este cunoscut faptul că suspensiile celulare sunt capabile să se aclimeze la frig și să dezvolte o toleranță mai mare la îngheț [202]. Temperatura joasă afectează în mod diferit funcțiile celulelor plantelor și structura lor. Ea poate provoca leziuni celulare și moartea celulelor sau plantelor. În unele condiții, la plantele expuse temperaturilor joase se ajustează metabolismul celular, sporește rezistența plantelor la temperaturile de îngheț [174]. În condiții naturale de înaltă altitudine, pe perioada vegetației plantele de *R. rosea* sunt deseori supuse influenței temperaturilor joase și chiar negative.

Anterior a fost demonstrat că după aplicarea *temperaturilor joase pozitive*, valoarea procentuală a indicelui de creștere a calusului de *R. rosea* la etapa de trecere în *faza staționară* înregistrează o majorare a acestor valori peste 40% față de varianta martor. De asemenea, luând în considerare că habitatele naturale ale plantelor de *R. rosea* L. constituie zonele cu condiții

climaterice dure și accidentale, fiind expuse diferitor condiții de stres, inclusiv la temperaturi extreme, ne-am propus să determinăm rezistența și la acțiunea diverselor temperaturi negative a celulelor calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*. Acest obiectiv a putut fi realizat prin determinarea influenței temperaturilor negative asupra acumulării biomasei și a viabilității celulare a calusului și agregatelor celulare *R. rosea*.

Cercetările noastre au vizat în primul rând determinarea valorilor temperaturilor negative, la care celulele calusului și agregatelor celulare non-embriogene răspund la acțiunea factorului termic sporind toleranța la ger și totodată demonstrând viabilitate celulară cu 50% mai mare față de mator. Evaluând supraviețuirea celulelor, după acțiunea cu temperaturi negative (-8°C, -12°C, 14°C și -16°C) timp de 8 ore, a fost determinată rezistența lor la acțiunea șocului condiționat de temperaturile menționate. Viabilitatea celulelor a fost exprimată în % față de mator (celule ale calusului care nu au fost supuse congelării). Datele privind acțiunea temperaturilor negative asupra viabilității celulelor (%) și acumulării biomasei calusului de *R. rosea* pe mediul solid sunt prezentate în Figurile 4.14 și 4.15. Din Figura A9.2 se poate observa că odată cu diminuarea temperaturii de expunere la șocul cu temperaturi negative, culoarea verde a calusului devine tot mai slab evidentă. Cantitativ această legitate se manifestă în datele prezentate în Figura 4.14. Diminuarea temperaturii negative a șocului a dus la sporirea liniară a nivelului de celule moarte de la circa 24% în varianta mator până la 89% de celule în calusul prealabil expus șocului cu -14°C. Dacă după expoziția la -4°C au supraviețuit 67% dintre celule, după expoziția la -8°C au supraviețuit doar 52% de celule.

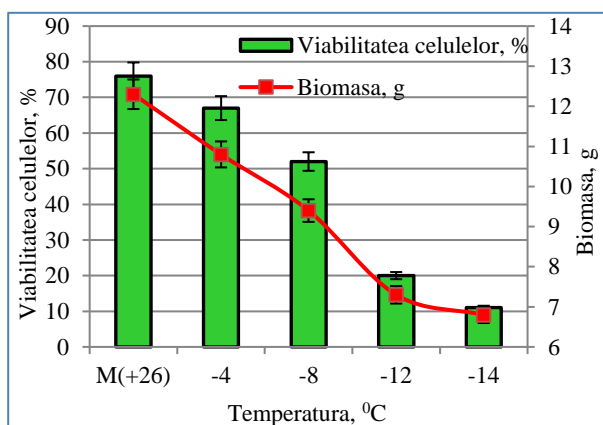


Fig.4.14. Influența temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, asupra viabilității celulelor și acumulării biomasei calusului de *R. rosea*, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

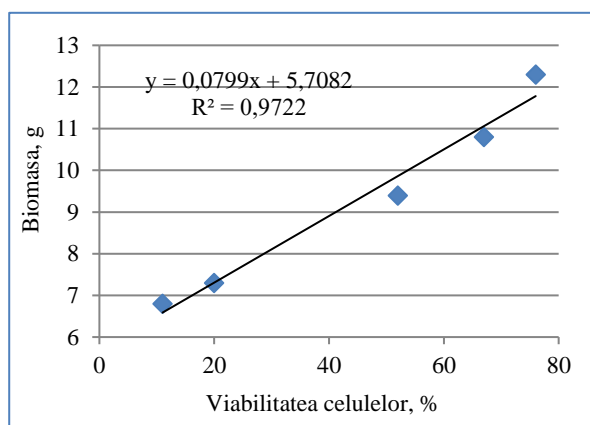


Fig. 4.15. Dependența dintre valorile biomasei și cele ale viabilității celulelor calusului de *R. rosea*, tratat cu temperaturi negative pe parcursul a 8 ore în ziua a 20-a de cultivare, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Diminuarea temperaturii de expoziție până la -12°C și -14°C a cauzat amplificarea proceselor distructive și diminuarea procentului celulelor viabile până la 20% și, respectiv, 11%. Prin urmare, temperatura la care a survenit pieirea a 50% din numărul total de celule este de aproximativ -8°C . Diminuarea procentului de celule vii odată cu diminuarea temperaturii negative de expoziție a cauzat micșorarea și mai semnificativă a acumulării de biomasă, Figura 4.14. Biomasa calusului s-a micșorat de la 12,3 g (martor) până la 10,8 și 7,3 g în varianta calusului obținut după expunerea la -4°C și -12°C , respectiv. Valorile menționate constituie diminuarea raportului biomasei calusului în variantele respective față de cele martor cu 12 și 41%.

După cum a fost menționat mai sus, calusul de *R. rosea*, supus acțiunii temperaturilor negative, a înregistrat atât micșorarea viabilității celulelor, cât și a indicelui de creștere a biomasei. Compararea legităților schimbării acestor valori (Figura 4.15) demonstrează existența unei corelații pozitive dintre biomasă și indicele de viabilitate, coeficientul de corelație fiind $R = 0,9722$. În așa fel, putem concluziona că sporirea procentului de celule viabile cu o unitate duce la creșterea biomasei finale a calusului cu 0,0799 g. De aici rezultă că diviziunea celulelor calusului în condițiile create artificial este limitată.

Cercetări similare privind acțiunea temperaturilor negative asupra viabilității celulelor și acumulării biomasei au fost efectuate și cu agregatele celulare de *R. rosea* cultivate în mediu lichid. Datele obținute sunt prezentate în Figurile 4.16 și A9.3. Menționăm, că ca și în cazul culturii calusului de *R. rosea* pe mediu solid, temperaturile negative au cauzat efecte deteriorative. De exemplu, în varianta experimentală după expunerea la -12°C și -14°C , masa agregatelor celulare din mediul nutritiv lichid s-a micșorat față de cea a masei din varianta martor cu 2,8 g și, respectiv, 3,1 g, ceea ce constituie diminuarea cu 24 % și 27% față de martor. Viabilitatea celulelor după expunerea la șocul cu temperatura de -12°C - -14°C a scăzut de la 79% în varianta martor până la 19% și, respectiv, 16% în variantele experimentale.

Dacă după expoziția calusului la -8°C au supraviețuit doar 52% de celule, în cazul expunerii în varianta experimentală a agregatelor celulare de *R. rosea* la -8°C , am observat că valoarea viabilității celulelor este de 68%. Aceasta sugerează că toleranța la ger a agregatelor celulare este mai înaltă decât cea a celulelor calusului, ceea ce indică exact ca și în cazul acțiunii radiației ionizante că toleranța la factorul de stres este cu atât mai înaltă, cu cât gradul de organizare a sistemului biologic este mai jos (regula Bergonie-Tribondeau) [306]. Aceste rezultate ne demonstrează că temperaturile letale pentru cultura agregatelor celulare pot fi considerate valorile mai joase de -12°C .

Dependența biomasei calusului de procentul celulelor viabile la sfârșitul perioadei de cultivare a agregatelor celulare (Figura 4.17) ne demonstrează că diminuarea biomasei agregatelor

celulare este direct proporțională cu micșorarea celulelor viabile, coeficientul de corelație fiind $R=0,9434$.

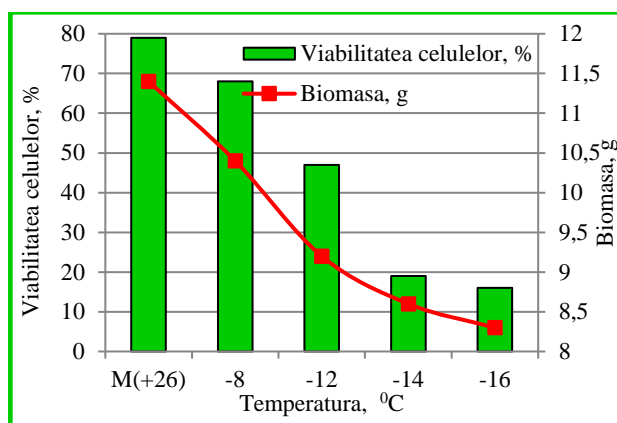


Fig. 4.16. Influența temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 12-a de cultivare, asupra viabilității celulelor și acumulării biomasei agregatelor celulare de *R. rosea*, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).

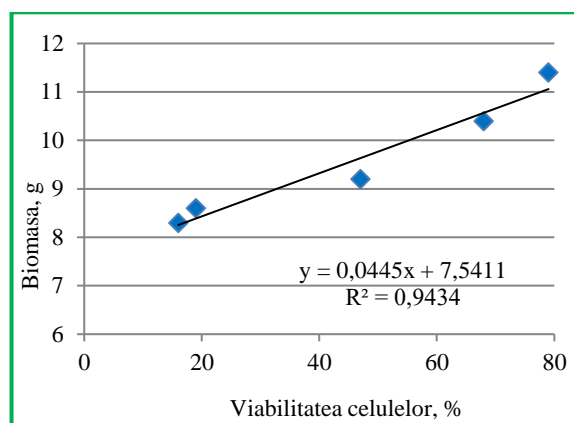


Fig. 4.17. Dependența dintre valorile biomasei și cele ale viabilității celulelor agregatelor celulare de *R. rosea*, tratate cu temperaturi negative pe parcursul a 8 ore în ziua a 12-a de cultivare, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).

Cum era de așteptat, unghiul de înclinație a acestei dependențe pentru agregatele celulare este egal cu 0,0445 (Figura 4.17). El este mai mic în comparație cu cel caracteristic pentru celulele calusului 0,0799 (Figura 4.15). Aceasta și mai mult dovedește că celulele agregatelor celulare sunt mai tolerante la ger în comparație cu cele ale calusului.

Se cunoaște că acțiunea asupra plantelor cu temperaturi negative, doza cărora este moderată, poate asigura aclimatizarea lor [145]. Acestea se caracterizează prin rezistență sporită față de temperaturile negative, care altfel ar fi fost letale [121, 260]. Formarea mecanismelor de adaptare la temperaturi joase implică diverse niveluri ale metabolismului celular, starea membranelor, modificări în expresia genelor, ceea ce duce la acumularea în celule a proteinelor de stres și a compușilor osmo- și crioprotectori [145]. Aceste modificări sunt menite să asigure organismul vegetal nu numai să supraviețuiască condițiilor nefavorabile, dar și să revină la funcționarea normală după ce temperatura ambiantă atinge optimul necesar. De asemenea, este cunoscut că nivelul de toleranță manifestat de o anumită plantă depinde de specia, țesutul sau tipul celulelor supuse stresului [260]. Prin urmare, rezultatele obținute demonstrează că celulele agregatelor celulare sunt mai rezistente la acțiunea temperaturilor negative, tolerând temperaturi cu circa 4°C mai joase în comparație cu celulele calusului. Aceasta sugerează despre tendința de diminuare a rezistenței la ger odată cu sporirea gradului de complexitate al relațiilor dintre celulele calusului în comparație cu cele ale agregatelor celulare.

Pe parcursul cultivării atât a culturii calusului, cât și a agregatelor celulare de *R. rosea*, a fost vizual remarcată micșorarea intensității culorii verzui sau chiar brunificarea explantelor în variantele experimentale față de cele martor. Luând în considerare aceasta, am determinat conținutul pigmentilor *clorofilieni* și *carotinoidelor* în materialul cercetat. Rezultatele obținute (Tabelele 4.3 și 4.4) demonstrează că conținutul pigmentilor fotosintetici extrași din biomasa calusului din varianta martor l-a depășit pe cel caracteristic pentru variantele experimentale (cu expunere la temperaturi negative). De exemplu, concentrația de clorofilă *a* în calusul (mediul solid) din varianta martor era 1,27 mg/g de masă proaspătă, iar în celulele calusului tratat cu temperaturi negative de -4°C și -8°C – 1,19 și, respectiv, 1,04 mg/g (cu 6 și 18% mai puțin decât în varianta martor) de material vegetal proaspăt.

Tabelul 4.3. Influența temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în celulele calusului de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Parametrii aparatului fotosintetic	Variantele			
	+26°C	-4°C	-8°C	-12°C
Clorofila <i>a</i> , mg/g	1,27±0,10	1,19±0,13	1,04±0,3	0,48±0,10
Clorofila <i>b</i> , mg/g	0,75±0,04	0,64±0,11	0,55±0,2	0,17±0,20
Suma totală (<i>a+b</i>)	2,02±0,24	1,83±0,12	1,59±0,6	0,65±0,16
Raportul <i>a/b</i>	1,7	1,85	1,89	2,82
Carotenoidele <i>c</i> , mg/g	1,14±0,02	1,22±0,21	1,39±0,3	0,20±0,05

Totodată, am observat că conținutul de clorofilă *b* în calusul acestor variante s-a micșorat față de conținutul din celulele calusului din varianta martor cu 14% (expunere la -4°C) și, respectiv, 26% (expunere la -8°C). Concomitent conținutul carotenoidelor în variantele experimentale menționate s-a majorat cu 7 și, respectiv, cu 30%. Așadar, nivelul relativ scăzut al modificării conținutului pigmentilor fotosintetici după expunerea la -4°C sugerează că calusul de *R. rosea* tolerează expunerea la această temperatură, dar expunerea la temperaturi de -8°C și mai joase sunt dăunătoare. Șocul efectuat cu temperatura de -14°C a avut urmări grave atât asupra conținutului de pigmenți fotosintetici, Tabelul 4.3, cât și asupra acumulării biomasei calusului, Figura 4.14 și 4.15, fenomene ce sunt asociate cu necroza celulelor calusului. În așa fel, devine clar că calusul tolerează șocul cu temperaturi negative mai înalte de -4°C, fiind deteriorat de șocul cu temperatură negativă de -12°C.

Cercetări similare privind acțiunea temperaturilor negative asupra agregatelor celulare, Tabelul 4.4 au demonstrat că, la fel ca și în cazul culturii calusului de *R. rosea* pe mediu solid, temperaturile negative deteriorează celulele agregatelor celulare. De exemplu, concentrația de clorofilă *a* în agregatele celulare din varianta martor este de 2,42 mg/g de masă proaspătă, iar în

celulele agregatelor tratate cu temperaturi negative de -8°C și -12°C – 2,27 și, respectiv, 2,05 mg/g (cu 6 și 15% mai puțin decât în varianta martor) de material vegetal proaspăt. Conținutul de clorofilă *b* în celulele agregatelor acestor variante s-a micșorat față de conținutul din celulele din varianta martor cu 15% (expunere la -8°C) și respectiv 28% (expunere la -12°C). De asemenea, ca și în cazul calusului, conținutul carotenoidelor în variantele experimentale ale agregatelor s-a majorat cu 4 și, respectiv, cu 9%. Dacă comparăm celulele calusului cu cele ale agregatelor celulare expuse la -8°C , observăm că conținutul de clorofilă *a* în cele ale calusului s-a micșorat cu 18%, iar în cele ale agregatelor celulare numai cu 6%. Totodată, remarcăm că și conținutul clorofilei *b* s-a micșorat cu 26% în celulele calusului față de 15% în celulele agregatelor. Nivelul relativ scăzut al modificării conținutului pigmentilor fotosintetici după expunerea la -8°C , sugerează că agregatele celulare de *R. rosea* tolerează expunerea la această temperatură, dar expunerea la temperaturi de -14°C și mai joase sunt degradante sau chiar letale (Figura 4.16).

Tabelul 4.4. Influența acțiunii temperaturilor negative pe parcursul a 8 ore, aplicate în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în agregatele celulare de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).

Parametrii aparatului fotosintetic	Variantele			
	$+26^{\circ}\text{C}$	-8°C	-12°C	-14°C
Clorofila <i>a</i> , mg/g	2,42±0,15	2,27±0,31	2,05±0,17	0,84±0,30
Clorofila <i>b</i> , mg/g	1,26±0,11	1,07±0,10	0,91±0,2	0,35±0,20
Suma totală (<i>a+b</i>)	3,68±0,29	3,34±0,12	2,96±0,1	1,19±0,61
Raportul <i>a/b</i>	1,9	2,12	2,25	2,4
Carotenoidele <i>c</i> , mg/g	1,64±0,11	1,71±0,20	1,79±0,2	0,48±0,30

Prin urmare, aceste rezultate demonstrează acțiunea deteriorativă a temperaturilor negative în funcționarea aparatului fotosintetic, întrucât se cunoaște [2] că pigmentii clorofilieni (clorofila *a* și *b*) sunt implicați direct în procesul de fotosinteză și indirect în procesul de proliferare. Autorii Georgieva și Lichtenthaler [110] au demonstrat că temperaturile scăzute afectează nu numai cantitatea de pigmenti, dar și mărimea și forma celulelor fotosintetice și, în consecință, procesul de fotosinteză. De asemenea, observăm că a crescut ușor conținutul carotenoidelor, ceea ce indică un posibil rol de protecție împotriva stresului oxidativ. Se cunoaște că carotenoidele pot acționa ca antioxidanți, ce includ protecția membranelor împotriva deteriorării radicalilor liberi, iar conținutul lor crește sub acțiunea temperaturilor scăzute. Variațiile în anatomia, fiziologia și morfologia celulelor reflectă adaptabilitatea plantelor la modificările de temperatură [154].

În literatura de specialitate practic nu există rapoarte privind acțiunea temperaturilor negative asupra culturii celulare de *R. rosea in vitro* și *in vivo*. Cercetările efectuate au demonstrat că atât conținutul de clorofilă *a* și *b*, cât și al carotenoidelor este influențat de acțiunea

temperaturilor negative, lucru confirmat și de către Carter și Knapp [52]. De asemenea, cultura celulară de *R. rosea* a înregistrat atât micșorarea viabilității celulelor, cât și a indicelui de creștere a biomasei. Cultura calusului tolerează șocul cu temperaturi negative mai înalte de -4°C , fiind deteriorat de șocul cu temperatură negativă de -14°C . Agregatele celulare sunt mai rezistente la acțiunea temperaturilor negative cu -4°C în comparație cu celulele calusului, ceea ce indică despre tendința de diminuare a rezistenței la ger odată cu sporirea gradului de complexitate a sistemelor biologice.

4.6. Influența reglatorului natural de creștere *Reglalg* asupra parametrilor fiziologici ai calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*, precum și a parametrilor biochimici ai extractelor din biomasa acestora

Spre deosebire de fitohormoni, reglatorii 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 [73, 74]. În acest context, cea mai mare atenție este îndreptată spre obținerea *RNC* complecși, creați pe bază de materie primă naturală, care includ fitohormoni, vitamine, aminoacizi, acizi grași, precum și o gamă largă de metaboliți secundari [74, 113]. Printre *RNC* cu perspectivă pentru utilizare atât în condiții *in vivo* [73, 74, 85], cât și *in vitro* [16, 47, 55, 56, 57, 58, 292], se numără și preparatul *Reglalg*, certificat pentru aplicare în agricultura Republicii Moldova [13]. Scopul acestor cercetări a fost de a determina posibilitatea utilizării preparatului *Reglalg* în vederea sporirii biomasei calusului și agregatelor celulare în cultura *in vitro* de *R. rosea* L.

Analiza comparativă a rezultatelor cultivării celulelor calusului de *R. rosea* pe mediul **MS** solid și în mediu lichid a demonstrat că pe parcursul a 40 zile în vasele de 150 mL, conținând 40 mL de mediu nutritiv solid, se acumulează 8-10 g de masă proaspătă a calusului, atunci când în mediul lichid, doar pe parcursul a 20 zile se acumulează 10-12 g de agregate celulare. De aici rezultă că viteza de proliferare a celulelor de *R. rosea* în mediul lichid este de cel puțin două ori mai înaltă în comparație cu cea pe mediul solid.

Datele privind influența preparatului *Reglalg* asupra indicelui de creștere (în %) a culturii de *R. rosea* pe mediul solid și lichid sunt prezentate în Figura 4.18 (biomasa calusului) și 4.19 (biomasa agregatelor celulare). Din datele prezentate în Figura 4.18 putem observa că introducerea *Reglalgului* în mediul de cultură a influențat benefic acumularea biomasei calusului în toate variantele experimentale, atingând valoarea maximă la introducerea *Reglalgului* în mediul nutritiv în raport de 1/1000 [46]. Masa calusului la această variantă experimentală a depășit masa din

varianta martor cu 38% [47]. La această diluție a *Reglalgului* cu mediul nutritiv lichid, Figura 4.19, la fel s-a manifestat la maximum sporirea biomasei agregatelor celulare față de martor (cu 22%).

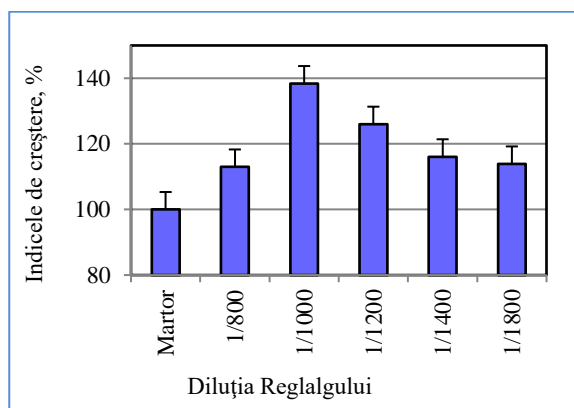


Fig.4.18. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1800, aplicat în ziua a 20-a de cultivare, asupra indicelui de creștere a calusului de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

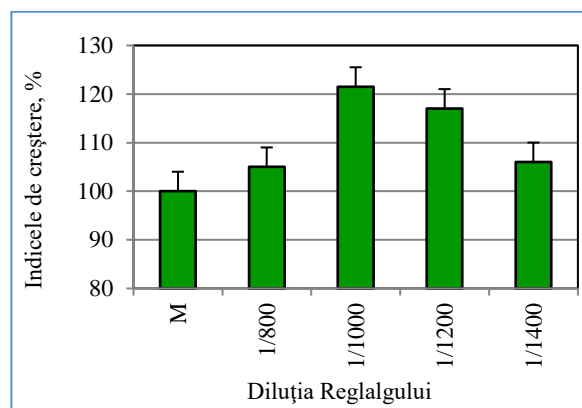


Fig.4.19. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1400, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra indicelui de creștere a agregatelor celulare de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).

Prin urmare, s-a stabilit că acumularea biomasei culturii calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* L. a fost maximală la diluția *Reglalgului* cu mediul nutritiv în raport de 1/1000. Rezultatele prezentate demonstrează că introducerea *RNC Reglalg* în mediul solid și lichid influențează benefic proliferarea celulelor de *R. rosea*, efectul final depinzând de concentrația preparatului în mediul de cultură. Trecerea culturii *in vitro* la faza staționară, realizată în mediul lichid (cultura agregatelor celulare), a fost practic de două ori mai rapidă în comparație cu cea pe mediul solid (cultura calusului).

În rezultatul determinării conținutului pigmentilor clorofilieni și carotinoizilor în materialul cercetat (Tabelele 4.5 și 4.6) observăm că conținutul pigmentilor asimilatori în variantele experimentale a demonstrat o tendință de creștere, dar a atins valori maxime în varianta cu introducerea *Reglalgului* în mediul de cultură în raport de 1/1000. De exemplu, concentrația de clorofilă *a* în calusul (mediul solid) din varianta martor este 1,27 mg/g de masă proaspătă, iar în celule calusului cultivat pe mediul suplimentat cu *Reglalg* în diluția 1/1000 – 2,44 mg/g (cu 92% mai mult decât în varianta martor) de material vegetal proaspăt. Totodată, observăm că în această variantă conținutul de clorofilă *b* a sporit doar cu 50%, iar cantitatea totală de pigmenți clorofilieni (clorofila *a+b*) – cu 76% față de conținutul din celulele calusului din varianta martor [49]. Aceste rezultate demonstrează acțiunea benefică a *Reglalgului* în funcționarea aparatului fotosintetic.

Din literatura de specialitate se știe [268] că în cadrul unei specii de plante, sub acțiunea diferitor factori, așa ca faza de creștere, iluminarea, diverse condiții de stres, se schimbă atât

cantitatea totală de pigmenți, cât și raportul dintre ei. În baza cercetărilor efectuate, putem menționa faptul că în variantele de cultivare a calusului în prezența *Reglalgului* raportul dintre conținutul de clorofilă *a* și clorofilă *b* a fost mai mare decât în celulele calusului din varianta martor, sporind de la 1,7 până la 2,17 (variantele *Reglalg* 1/1000), Tabelul 4.5. Comparând datele din literatură cu rezultatele obținute, menționăm că raportul dintre clorofila *a* și *b* caracteristic pentru calusul de *R. rosea* se încadrează în limitele obișnuite pentru culturile calusului la diferite specii de plante [274]. Acest raport poate servi ca indicator important privind adaptarea celulelor calusului de *R. rosea* la mediului de cultivare suplimentat cu *Reglalg*. El poate reprezenta legătura dintre acumularea pigmentilor clorofilieni și a biomasei calusului.

Tabelul 4.5. Influența preparatului *Reglalg* în diferite concentrații, aplicat în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în celulele calusului de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Parametrii aparatului fotosintetic	Variantele					
	Martor	1/800	1/1000	1/1200	1/1400	1/1800
Clorofila <i>a</i> , mg/g	1,27±0,1	1,87±0,19	2,44±0,3	2,29±0,1	1,95±0,2	1,63±0,1
Clorofila <i>b</i> , mg/g	0,75±0,04	1,07±0,1	1,13±0,2	1,08±0,2	1,04±0,1	0,85±0,02
Suma totală (<i>a+b</i>)	2,02±0,24	2,94±0,12	3,57±0,6	3,37±0,16	3,14±0,2	2,49±0,4
Raportul <i>a/b</i>	1,7	1,75	2,17	2,12	1,9	1,9
Carotenoidele <i>c</i> , mg/g	1,14±0,02	1,52±0,2	1,74±0,3	1,27±0,05	1,13±0,03	0,94±0,13
Raportul (<i>a+b</i>)/ <i>c</i>	1,8	1,9	2,0	2,6	2,77	2,6

După cum a fost menționat mai sus, în calusul de *R. rosea*, cultivat pe mediul nutritiv solid suplinit cu *Reglalg*, s-a înregistrat majorarea conținutului relativ de clorofilă *a*. Compararea valorilor acestui indice cu valorile acumulării biomasei (Figura 4.20) demonstrează relația strânsă între acești indici, coeficientul de regresie fiind egal cu 0,9115.

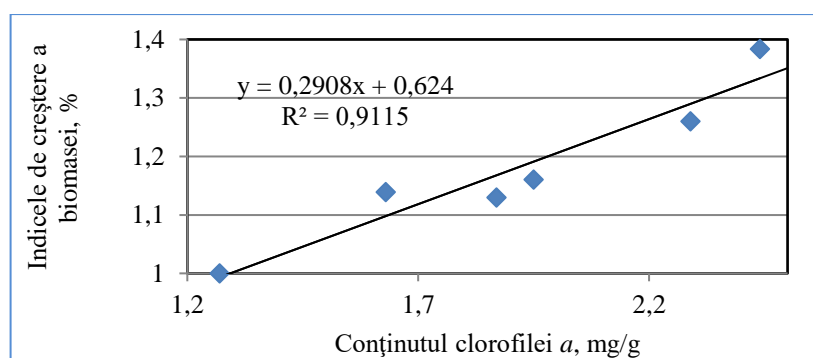


Fig. 4.20. Relația dintre valorile indicelui de creștere a biomasei și cele ale conținutului de clorofilă *a* în celulele calusului de *R. rosea*, tratat cu diferite concentrații ale preparatului *Reglalg* în ziua a 20-a de cultivare, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Menționăm că majorarea conținutului de clorofilă în calusul de *R. rosea* cultivat în prezența *Reglalgului* corelează și cu procesul de biosinteză a flavonoidelor și a compușilor fenolici în cloroplastele culturii calusului [55, 56]. Legăturile pozitive între conținutul de clorofilă și cel al polifenolilor, flavonoidelor și antocienilor au fost menționate și de către Xu F.[292].

Analizând datele prezentate în Tabelul 4.5 observăm că introducerea *Reglalgului* în mediul de cultivare a asigurat nu numai creșterea conținutului clorofilei *a* și *b*, dar și al carotenoidelor. Ultimele joacă un rol important în procesele de fotosinteză și în sistemul de protejare, în special previne fotooxidarea distructivă a clorofilei și a altor substanțe active (citocromi, peroxidaze, catalase, pigmenți flavonoidici, vitamine B₁₂, E, K) [107, 142]. Carotenoidele au fost recunoscute ca una dintre cele mai abundente grupe de lipide solubile antioxidante din celulele vegetale [107]. Determinarea cantitativă a carotenoidelor din calusul de *R. rosea* (Tabelul 4.5) a demonstrat că cea mai mică valoare a acestui indice se observă în varianta martor (1,14 mg/g substanță proaspătă), iar cea mai mare valoare se manifestă în celulele calusului cultivat în prezența *Reglalgului* diluat cu mediul de cultură în raport de 1/1000. Cantitatea carotenoidelor înregistrată în această variantă este de 1,74 mg/g de material vegetal proaspăt, marcând un spor de 52,76%, comparativ cu varianta martor.

Dacă analizăm raportul clorofila (*a+b*)/carotenoide, observăm că el variază de la 1,78 la calusul din varianta martor până 2,77 în varianta *Reglalg* diluat cu mediul de cultură în raport de 1/1000. Raportul dintre suma clorofilelor și carotenoidelor este un indicator al stării de “*maturare*” a culturii. Valorile scăzute ale acestui raport indică senescența și deteriorarea aparatului fotosintetic al țesutului vegetal [274]. Așadar, studiind influența preparatului *Reglalg* asupra acumulării clorofilei *a*, *b*, sumei totale a clorofilei *a* și *b* și, respectiv, a carotenoidelor în calusul de *R. rosea* la a 40-a zi de la inoculare (Tabelul 4.4), putem remarca că cele mai ridicate valori au fost înregistrate în varianta cu diluția 1/1000. Prin urmare, introducerea preparatului *Reglalg* în mediul de cultivare asigură sporirea acumulării *pigmenților fotosintetici* în celulele calusului de *R. rosea* și totodată frânează senescența și menține viabilitatea celulelor pe o perioadă de cultivare mai îndelungată.

Cercetări similare privind influența *Reglalgului* asupra pigmenților clorofilieni și a carotenoidelor au fost efectuate și cu agregatele celulare de *R. rosea* cultivate în mediu lichid (Tabelul 4.6). Analizând datele incluse în tabelul respectiv observăm că la fel ca și în cazul culturii calusului de *R. rosea* pe mediu solid, preparatul *Reglalg* diluat cu mediul de cultură în raport de 1/1000 a influențat cel mai pronunțat acumularea clorofilei *a*, *b*, sumei totale a clorofilei *a* și *b* și a carotenoidelor în agregatele celulare.

Tabelul 4.6. Influența preparatului *Reglalg* în diferite concentrații, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului pigmentilor fotosintetici în celulele agregatelor celulare de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a de cultivare).

Parametrii aparatului fotosintetic	Variantele				
	M	1/800	1/1000	1/1200	1/1400
Clorofila <i>a</i> , mg/g	2,42±0,15	2,77±0,2	3,75±0,3	3,52±0,2	3,29±0,17
Clorofila <i>b</i> , mg/g	1,26±0,11	1,67±0,15	1,91±0,14	1,8±0,2	1,58±0,19
Suma totală (<i>a+b</i>)	3,68±0,29	4,44±0,35	5,66±0,41	5,32±0,19	4,87±0,37
Raportul <i>a/b</i>	1,9	1,7	1,9	1,9	2,0
Raportul (<i>a+b</i>)/ <i>c</i>	2,2	2,8	2,9	2,9	2,7
Carotenoidele <i>c</i> , mg/g	1,64±0,11	1,56±0,05	1,98±0,1	1,84±0,17	1,78±0,19

Este cunoscut faptul [316] că clorofila *b* exercită ecranarea clorofilei *a*, astfel menținând activitatea fotosintetică în condiții naturale și mai ales la iluminare puternică. În cercetările efectuate, în varianta optimă de influență a *Reglalgului*, s-a observat creșterea conținutului de clorofilă *b* atât în agregatele celulare, cât și în celulele calusului de *R. rosea*. Totodată, raportul dintre conținutul clorofilei *a* și *b* în celulele agregatelor celulare a rămas practic neschimbat, pe când în celule calusului acest raport s-a mărit. De aici rezultă că sporirea acumulării biomasei calusului pe parcursul a 40 zile de cultivare sub influența *Reglalgului* a dus la creșterea raportului dintre celulele din interiorul calusului față de cele din exterior (doar ultimele conțin clorofilă), ele fiind mai intensiv iluminate. În cultura agregatelor celulare practic toate celulele conțin clorofilă și, datorită agitării continue, sunt uniform și alternativ iluminate, de aceea mai puțin supuse stresului fotooxidativ. În afară de aceasta, durata cultivării agregatelor celulare este de două ori mai mică decât cea a calusului. Prin urmare la sfârșitul perioadei de cultivare celulele agregatelor rămân juvenile și viabile, ceea ce le deosebește de celulele calusului. Cele menționate, probabil, au influențat acumularea mai semnificativă a clorofilei *b* în celulele agregatelor în comparație cu celulele calusului.

După cum a fost menționat mai sus, în agregatele celulare de *R. rosea*, cultivate pe mediul nutritiv **MS** lichid suplinit cu *RNC Reglalg*, a fost înregistrată majorarea conținutului relativ de clorofilă *b*. Totodată, din Figura 4.21 observăm că conținutul clorofilei *a* este direct proporțional cu sporirea biomasei agregatelor celulare. Cum era de așteptat, unghiul de înclinație a acestei dependențe pentru agregatele celulare (0,2395, vezi Figura 4.21) este mai mic în comparație cu cel caracteristic pentru celulele calusului (0,2908, vezi Figura 4.20).

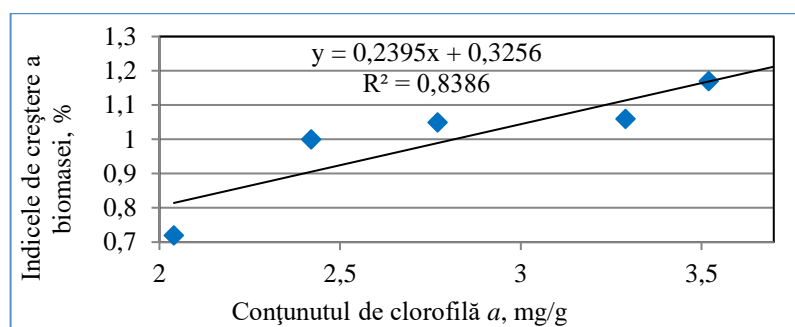


Fig. 4.21 Dependența dintre valorile indicelui de creștere a biomasei și cele ale conținutului de clorofilă *a* în agregatele celulare de *R. rosea*, tratate cu diferite concentrații ale preparatului *Reglalg* în ziua a 12-a de cultivare și determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).

Așadar, calusul și agregatele celulare de *R. rosea*, cultivate pe mediul nutritiv **MS** suplimentat cu *Reglalg*, manifestă capacitatea de a spori creșterea biomasei, dar conținutul relativ de clorofilă *a* a fost mai înalt în agregatele celulare. Aceasta înseamnă că aplicarea preparatului *Reglalg* influențează benefic creșterea biomasei și acumularea clorofilei, ceea ce confirmă datele anterioare despre acțiunea benefică a *Reglalgului* asupra acumulării *MS* [49, 55, 56, 57, 58]. În complex, aceste date sunt în concordanță cu informațiile care sugerează că clorofila este implicată în formarea precursorilor de sinteză a *MS* [209], intermediari sau inițiatori ai ciclului shikimic de biosinteză a *MS*. De aici rezultă că biosinteza și acumularea clorofilei în celulele de *R. rosea* cultivate *in vitro* reprezintă un fenomen important ce contribuie sau asigură sporirea randamentului acumulării substanțelor biologic active în condițiile *in vitro*.

4.6.1. Influența regulatorului natural de creștere *Reglalg* asupra potențialului oxidoreducător al extractelor din celulele calusului de *R. rosea*

După cum a fost demonstrat în experimentele precedente, aplicarea preparatului *Reglalg* în mediul de cultivare asigură sporirea acumulării biomasei calusului de *R. rosea*, eficacitatea maximă a preparatului fiind atinsă la diluția acestuia cu mediul de cultivare în raport de 1/1000. Datele privind CCF și capacitatea antioxidantă totală (Cat) a extractelor din varianta martor și cele experimentale (Figura 4.22), demonstrează, că atât valorile CCF, cât și valorile 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%.

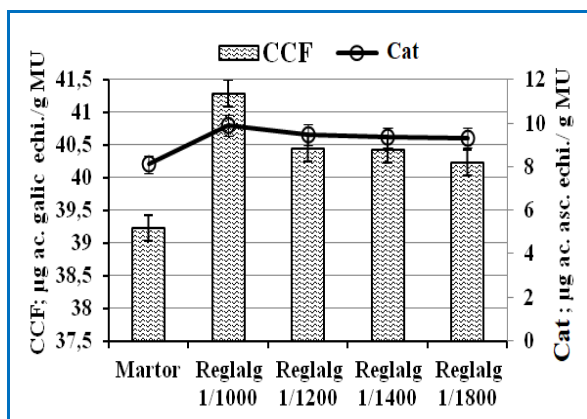


Fig. 4.22. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1800, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului compușilor fenolici (CCF) și capacității antioxidante totale (Cat) în extractele din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

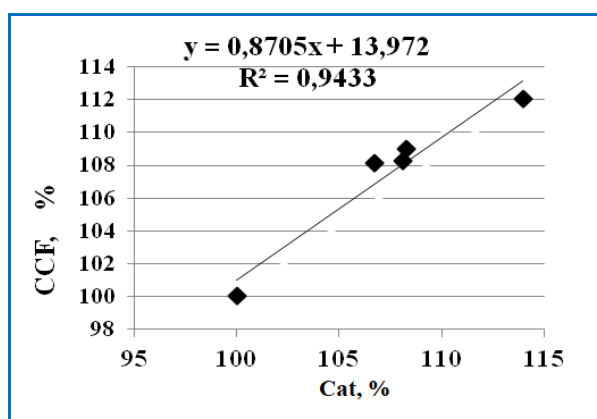


Fig. 4.23. Dependența dintre valorile conținutului compușilor fenolici (CCF) și capacitatea antioxidantă totală (Cat) a extractelor etanolice din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Totodată, datele prezentate în Figura 4.23 demonstrează faptul că Cat corelează pozitiv cu CCF. Luând în considerare influența benefică a *Reglalgului* asupra acumulării biomasei calusului de *R. rosea* [47], putem spune că aplicarea preparatului în mediul de cultivare acționează 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.

După cum a fost menționat anterior, MS din plante de *R. rosea* reprezintă compuși fenolici, care în natură manifestă diferite proprietăți fiziologice, inclusiv capacitatea antioxidantă [118]. În dependență de component ea se desfășoară în mod diferit [118, 151, 214]. Evaluarea Cat a extractelor etanolice din biomasa calusului de *R. rosea* în varianta martor și variantele experimentale a demonstrat (Figura 4.22 și 4.23), că modificările Cat corelează cu CCF în extractele din calusul de *R. rosea*. Aceasta sugerează, că stimularea creșterii biomasei sub influența *Reglalgului*, demonstrată anterior [47], poate avea loc datorită sporirii potențialului oxidoreducător al 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) [68, 206, 258]. A fost stabilit că PFO în plante este localizată în membranele tilacoidelor cloroplastelor în stare latentă sau activă. Enzima latentă poate fi activată prin diferite moduri, inclusiv prin tratarea cu diferite substanțe [94]. Membranele tilacoidelor, ce conțin pigmenți clorofilieni, reprezintă structurile principale de localizare a proceselor de fotosinteză. Ele depind de un șir de factori exogeni și endogeni, inclusiv de componența nutritivă a mediului de creștere și dezvoltare. Aceasta presupune implicarea PFO

în procesele ce se desfășoară în cloroplaste. 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 4.24), 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* 1/1400. După cum a fost menționat mai sus, valoarea indicilor de acumulare a biomasei calusului, precum și a CCF (Figura 4.18 și 4.22), de asemenea, a fost cea mai înaltă pentru varianta cu aplicarea diluției de 1/1000 a preparatului *Reglalg*.

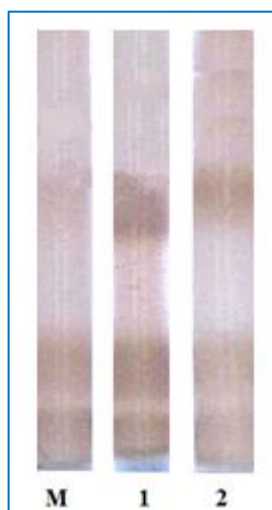


Fig. 4.24. Separarea formelor izoenzimatic ale PFO din extractele calusului de *R. rosea* cultivat pe mediu MS: M-martor; 1 și 2 - mediul MS suplimentat cu preparatul *Reglalg* diluat în raport de /1000 și 1/1400.

În așa fel, influența benefică a preparatului *Reglalg* asupra creșterii biomasei calusului de *R. rosea* este asociată cu stimularea activității unor componenți ai PFO implicați în metabolismul substanțelor secundare din celule [297] și cu acumularea mai activă a componenților 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 *SRO*, inclusiv $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ și 1O_2 . În celulele și țesuturile vegetale aceste *SRO* se formează nu numai în condiții de stres, dar și în cele optimale de creștere [236].

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 4.25). Aceasta este o diferență esențială dacă comparăm datele acțiunii *Reglalgului* asupra CTF și asupra CCF (Figura 4.22 și 4.25).

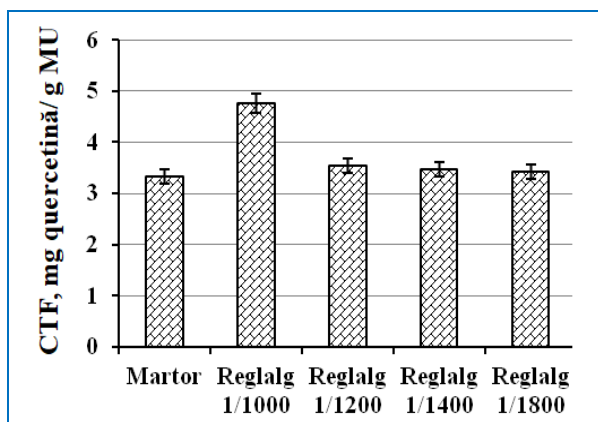


Fig. 4.25. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1800, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului total de flavonoide în extractele din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

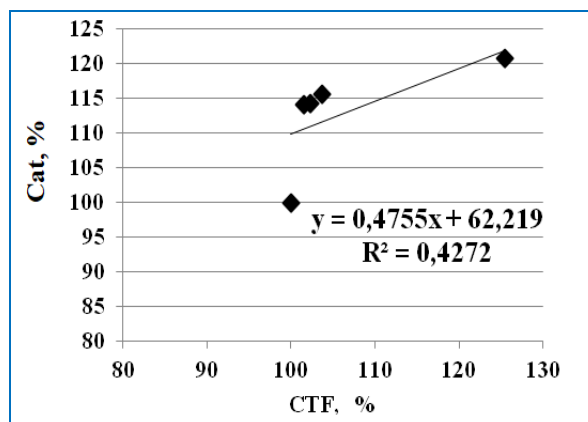


Fig. 4.26. Dependența dintre valorile conținutului total de flavonoide (CTF) și ale capacității antioxidante totale (Cat) a extractelor etanolice din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Anume din această cauză nu se manifestă o corelație semnificativă dintre CTF și Cat a extractelor (Figura 4.26). 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 confirmă rolul antioxidant al flavonoidelor la plante prin aceea, că conținutul lor sporește în perioada expunerii plantelor la diferiți factori de stres [219, 286, 289]. 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 [289]. Se presupune că în modificarea balanței redox sunt implicate și flavonoidele prin reglajul activității metabolismului lor [265]. 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 [231].

Metabolismul compușilor fenolici implică un șir de enzime, inclusiv peroxidaza (PO) [68, 258]. PO este considerată un marker molecular al creșterii și dezvoltării culturii țesuturilor vegetale [167], iar apariția unor izoenzime ale PO a fost stabilită în procesul organogenezei [206, 258] și diferențierii tisulare [51]. Rezultatele cercetărilor efectuate susțin cele menționate (Figura 4.27).

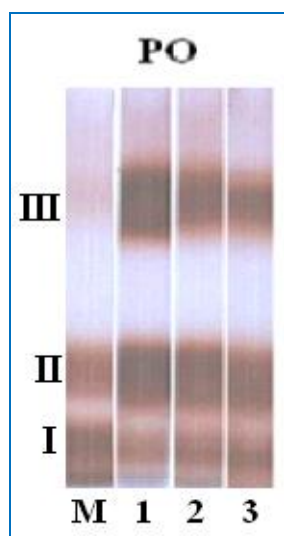


Fig.4.27. Separarea formelor izoenzimice ale PO a extractelor din calusul de *R. rosea* în vârstă de 32 zile, cultivat pe mediu MS: M-martor și suplimentat cu preparatul *Reglalg* diluat în raport de 1/1000(1), 1/1200(2) și 1/1400(3) cu mediul MS; I, II și III – zonele de localizare a izoformelor PO.

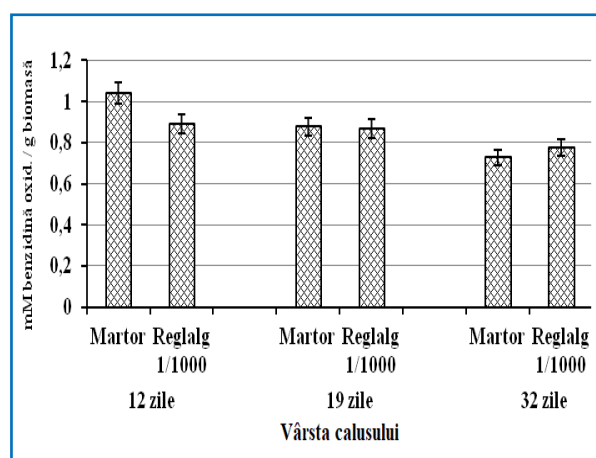


Fig. 4.28. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/1000 asupra activității PO din calusul de *R. rosea* de diferită vârstă.

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 vârstă de 12 zile, pe când în cele extrase din calusul de 19 și, respectiv, 32 zile activitatea enzimatică diminuează (Figura 4.28). Cu toate că deosebirile dintre varianta martor și cea experimentală sunt ne semnificative, spectrul PO din extractele calusului din varianta martor și cele experimentale diferă semnificativ (Figura 4.27). La varianta martor componentul III al 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 [47]. Schimbarea activității componentului III al PO demonstrează că efectul aplicării *Reglalgului* corelează pozitiv cu acumularea biomasei calusului [47, 58]. Prin urmare, pentru sporirea acumulării biomasei calusului și a CCF și CTF (Figura 4.22 și 4.25), cel mai benefic mediu de cultivare a calusului de *R. rosea* s-a demonstrat a fi mediul nutritiv suplimentat cu preparatul *Reglalg* în raport de 1/1000.

Procesele de proliferare a celulelor calusului sunt însoțite de producerea *SRO*, excesul cărora creează condiții de stres în mediul celular, ceea ce inițiază acumularea prolinei [132]. Datele

prezentate în Figura 4.29 demonstrează că în calusul variantei martor, fără suplimentarea cu preparatul *Reglalg*, conținutul prolinei este mai înalt comparativ cu variantele experimentale.

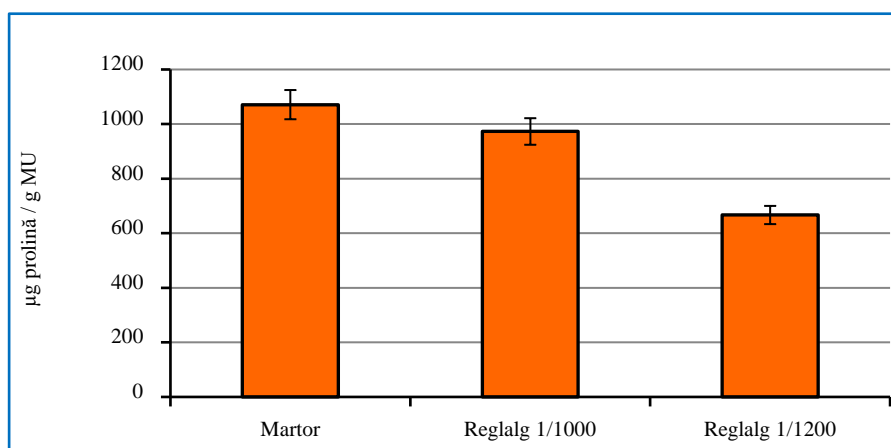


Fig. 4.29. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/1000 și 1/1200, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului de prolină în extractele din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 32-a).

Este stabilit că nivelul *SRO* în țesuturile plantelor în stare de proliferare activă este mai înalt, iar acumularea prolinei la sporirea producerii *SRO* crește [132]. În experimentele efectuate, datorită influenței benefice a preparatului *Reglalg* asupra CCF și a proprietăților lor antioxidante (Figura 4.22), observăm că, deși proliferarea calusului în varianta experimentală sporește, conținutul prolinei, dimpotrivă, scade. Acest fenomen susține concepția că conținutul prolinei în celulele plantei corelează negativ cu potențialul oxido-reducător, care la rândul lui este influențat de compoziția fenolilor și activitatea enzimelor, implicate în determinarea nivelului acestui potențial.

Astfel, datele obținute demonstrează că aplicarea preparatului *Reglalg* influențează benefic creșterea calusului de *R. rosea*, sporește calitatea biomasei datorită stimulării proceselor de acumulare a fenolilor și flavonoidelor.

4.7. Testarea influenței combinate a factorilor fizici și chimici asupra acumulării metaboliților secundari în calusul de *R. rosea*

Rezultatele cercetărilor, prezentate mai sus oferă posibilitatea de a concluziona că acumularea *MS* și a substanțelor antioxidante în celulele calusului de *R. rosea*, cultivat pe mediu solid, poate fi mărită sub influența radiației *UV*, temperaturii joase pozitive și a reglatorilor naturali de creștere. Este cunoscut faptul că alcoolul cinamic (*AC*) este un precursor al biosintezei rosavinului și rosinului [122, 123]. De aceea, în cercetări el a fost testat ca elicitor, fiind introdus în mediul de cultivare a calusului de *R. rosea*. Influența *AC* asupra acumulării compușilor fenolici în calusul de *R. rosea* a fost cercetată prin introducerea separată în mediul de cultivare a precursorului și în combinație cu acțiunea razelor *UV* sau temperaturii joase pozitive. În mediul

de cultivare a calusului a fost adăugat AC în concentrația de 2 și 4 mM. Având în vedere rezultatele cercetărilor expuse în p.4.3 și 4.4, calusul de *R. rosea* a fost iradiat cu UV timp de 60 min și expus la temperaturi joase pozitive pe parcursul a 30 min. Datele sumare privind rezultatele acestor cercetări sunt prezentate în Tabelul 4.7.

Tabelul 4.7. Activitatea antioxidantă și conținutul compușilor fenolici în extractele din calusul de *R. rosea* supus tratării în ziua a 20-a cu radiație UV, temperaturi joase pozitive și după introducerea în mediul de cultivare a alcoolului cinamic, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Denumirea probei	Activitatea antioxidantă relativă	Conținutul compușilor fenolici, mg/mL
Martor	1,00	0,39
<i>Temperaturi joase pozitive</i>	0,72	0,36
UV	0,93	0,4
2mM AC	0,90	0,23
2mM AC, UV	1,07	0,35
2mM AC, temperaturi joase pozitive	0,99	0,23
4mM AC	0,91	0,27
4mM AC, UV	1,32	0,40
4mM AC, temperaturi joase pozitive	0,85	0,23

Este important să menționăm, că introducerea separată a AC în mediul de cultivare a calusului nu a influențat benefic activitatea antioxidantă a extractelor din calus și CCF din extract. Activitatea antioxidantă și CCF în extractele din calus, în mediul căruia s-a adăugat AC în concentrație de 2 și 4 mM, s-au micșorat cu 7, 9% și, respectiv, cu 40, 30%. La fel nu a fost efectivă administrarea combinată a AC și a temperaturii joase pozitive. Activitatea antioxidantă din varianta 2 mM AC în combinație cu aplicarea șocului cu temperaturi joase a rămas la nivelul martorului, iar sporirea concentrației AC până la 4 mM a cauzat chiar diminuarea valorii acestui parametru cu 15% față de valoarea caracteristică pentru varianta martor. În ambele variante CCF s-a micșorat cu 40%. Însă aplicarea în ansamblu a AC în combinație cu expoziția la radiația UV a stimulat acumularea substanțelor antioxidante și a CCF. Expoziția calusului de *R. rosea* la temperaturi joase pozitive aparte nu influențează acumularea substanțelor antioxidante (informația în p.4.4), dar expoziția cu radiație UV relevă clar tendința de stimulare a acumulării substanțelor antioxidante.

Mai mult ca atât, efect sinergic bine pronunțat demonstrează administrarea concomitentă a AC, temperaturii joase pozitive și a radiației UV. Prin urmare, administrarea concomitentă a factorilor fizici care acționează periodic în condiții naturale (radiația UV) asupra plantelor de *R. rosea*, influențează benefic și asupra acumulării MS în celulele calusului de *R. rosea*.

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

În literatura de specialitate există informație care demonstrează că în unele cazuri acumularea MS se efectuează mai eficient în mediu lichid în comparație cu cea caracteristică pentru mediul solid [99, 122, 123, 164]. Ținând cont de aceasta, în experimentele efectuate au fost realizate cercetări privind influența acestor factori atât asupra culturii calusului, cât și a agregatelor celulare de *R. rosea* cultivate în mediu lichid (Fig. A10.1).

Rezultatele extragerii componentelor activi din calusul și agregatele celulare de *R. rosea* prezentate în Tabelul 4.8, relevă datele privind cantitatea substanțelor extrase în diferiți solvenți din calusul cultivat pe mediu solid (conținând agar) și în mediu lichid (lipsit de agar). Din rezultatele expuse în tabelul respectiv rezultă că celulele calusului cultivate pe mediul solid diferă substanțial de cele cultivate pe mediul lichid în ceea ce privește conținutul și componența substanțelor extractibile.

Tabelul 4.8. Caracteristica parametrilor de extragere din biomasa calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* a substanțelor extractibile în hexan și metanol, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a și, respectiv, a 20-a).

Proba	Masa probei, g	Extractul în hexan (HE)		Extractul în metanol (ME)		Masa non extractibilă, g
		Greutatea, g	Productivitatea, %	Greutatea, g	Productivitatea, %	
Calus	0,5622	0,0053	0,27	0,0357	6,35	0,5260
Agregate celulare	0,1517	0,0024	0,12	0,0464	30,59	0,1054

Conținutul total al substanțelor extrase din masa celulară obținută pe mediul lichid este de aproximativ de cinci ori mai înalt în comparație cu cel din biomasa calusului. Totodată, conținutul substanțelor extractibile cu proprietăți lipofile (extrase în hexan) este mai înalt în celulele calusului. În așa fel, conținutul substanțelor de origine fenolică (extrase în metanol) este substanțial mai înalt în agregatele celulare, cultivate în mediul lichid. Având în vedere faptul că anume principiile active ale speciei *R. rosea* sunt în primul rând reprezentate de substanțele fenolice, devine clară prioritatea cultivării calusului pe mediu lichid.

Studiul biotehnologic de transformare a metaboliților în cultura celulară de *R. rosea in vitro* este foarte important să se determine factorii care influențează acumularea principiilor active (salidrozidul și rosavinul). Cercetări similare pentru specia *R. rosea* au fost efectuate în Finlanda [122, 123], Polonia [164] etc. Investigațiile au demonstrat că adăugarea unor precursori conduce la sporirea acumulării principiilor active în celulele cultivate *in vitro*. Optimizarea mediului

nutritiv prin reducerea concentrației de zaharoză de la 30 la 20 g/L a dus la sporirea de 2-3 ori a biomasei agregatelor celulare, dar nu a fost sintetizat nici un component identic salidrozidului [263]. De asemenea, nu a fost sintetizat nici rosavinul, atunci când zaharoza a fost singura sursă de carbon. Dar, în urma introducerii a 10 g de glucoză în schimbul a 10 g de zaharoză, conținutul glicozidelor alcoolului cinamic a crescut dublu [123, 124]. Și invers, adăugarea de glucoză simultan cu tirosolul, de asemenea, nu a avut nici un efect pozitiv asupra producerii salidrozidului, comparativ cu introducerea singurei surse de tirosol [123, 124]. Luând în considerare aceste rezultate, de asemenea am testat introducerea în mediul de cultivare lichid pe lângă 20 g/L de zaharoză și câte 10 g/L de glucoză. Mediul nutritiv din varianta martor conține doar 30 g/L zaharoză. De asemenea a fost testată influența introducerii în aceste medii a AC. Concentrația finală a AC în mediul de cultivare a fost de 1, 2 și 4 mM. Datele despre influența concentrațiilor de AC asupra acumulării biomasei celulare sunt prezentate pe Figura 4.30.

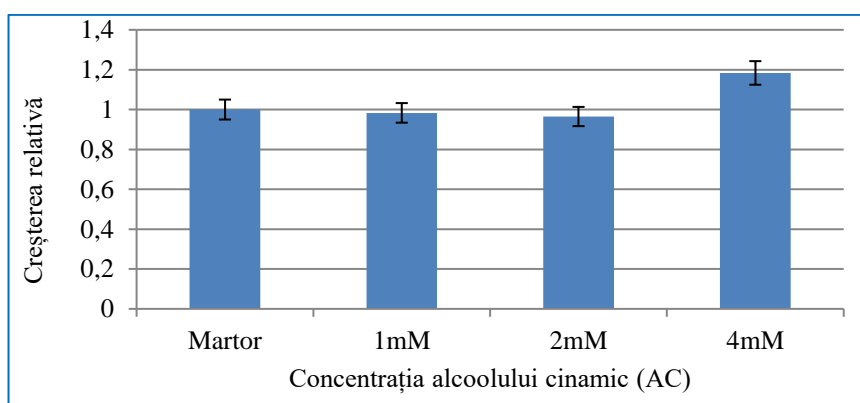


Fig. 4.30. Influența diferitor concentrații ale alcoolului cinamic în mediul MS, aplicate în ziua a 10-a de cultivare, asupra creșterii relative a agregatelor celulare de *R. rosea*, la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).

Rezultatele obținute demonstrează că în concentrații mici AC nu influențează semnificativ creșterea masei celulare. Doar în concentrația de 4 mM masa agregatelor celulare depășește valorile caracteristice pentru varianta martor, Figura 4.30. Culoarea agregatelor celulare a fost un indicator suplimentar pentru determinarea viabilității celulelor. La etapele inițiale de cultivare celulele agregatelor celulare aveau culoare verzuie. Spre sfârșitul cultivării s-a manifestat degradarea celulară, confirmată prin brunificarea celulelor și tulburarea mediului lichid, Figura A10.2. De asemenea, menționăm că fenomenele de degradare au fost inițiate mai timpuriu la celulele calusului cultivat în mediul ce conține AC în concentrație de 4 mM.

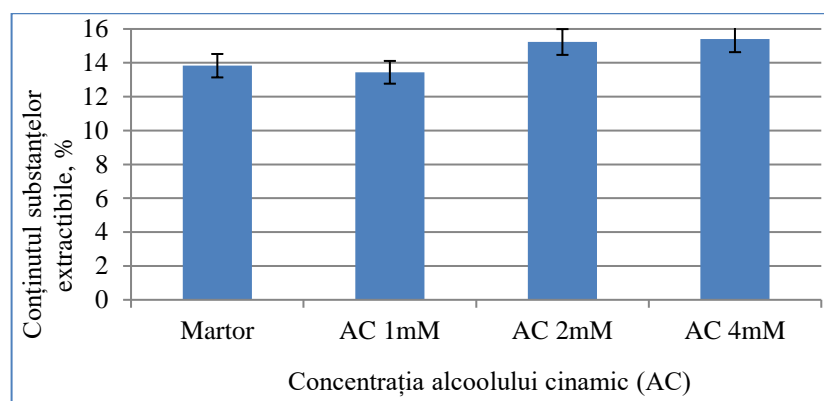


Fig. 4.31. Conținutul substanțelor extractibile în metanol din agregatele celulare de *R. rosea* obținute în medii cu diferite concentrații ale alcoolului cinamic la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 20-a).

Analizând datele prezentate în Figura 4.31, putem menționa că conținutul substanțelor extractibile în metanol din variantele agregatelor celulare, cultivate în prezența AC, a fost mai mare față de varianta martor. Aceasta sugerează ideea că AC influențează benefic acumularea MS în celulele agregatelor celulare de *R. rosea*.

4.8.1. Analiza HPLC a metaboliților secundari din extractele agregatelor celulare de *R. rosea* supuse expoziției radiației UV, temperaturilor joase pozitive și precursorului alcoolului cinamic

Extractele obținute anterior au fost supuse analizei prin cromatografia HPLC. Detecția a fost realizată cu matrice de diode la 254 și 276 nm. Datele obținute au demonstrat că spectrul metaboliților extrași din celulele agregatelor celulare este foarte sărac. Numai extractul din celulele calusului în varianta unde mediul de cultivare conține 2 mM AC a demonstrat prezența salidrozidului și rosavinului, Figura 4.32 A și B. Menționăm că salidrozidul are timpul de retenție 2,32 min, iar rosavinul 10,80 min. Aceste date demonstrează că AC în concentrații specifice poate stimula biosinteza și acumularea rosavinului în agregatele celulare, cultivate în mediu lichid.

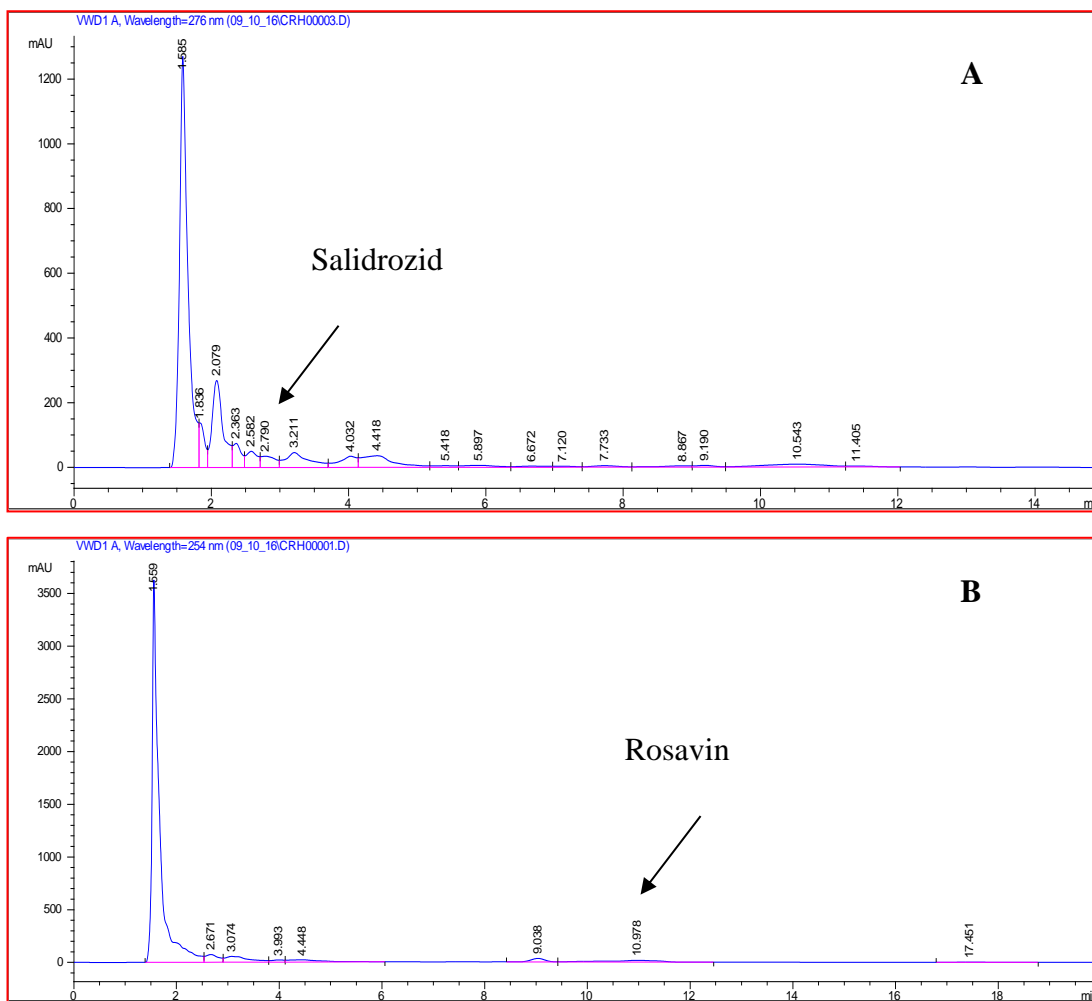


Fig. 4.32. Analiza HPLC a metabolizilor secundari extrași din agregatele celulare de *R. rosea* cultivate pe mediul nutritiv conținând 2 mM de alcool cinamic și detectați la lungimile de undă 274 nm (A) și 254 nm (B).

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)). 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 4.33, care conține 13 semnale bine definite.

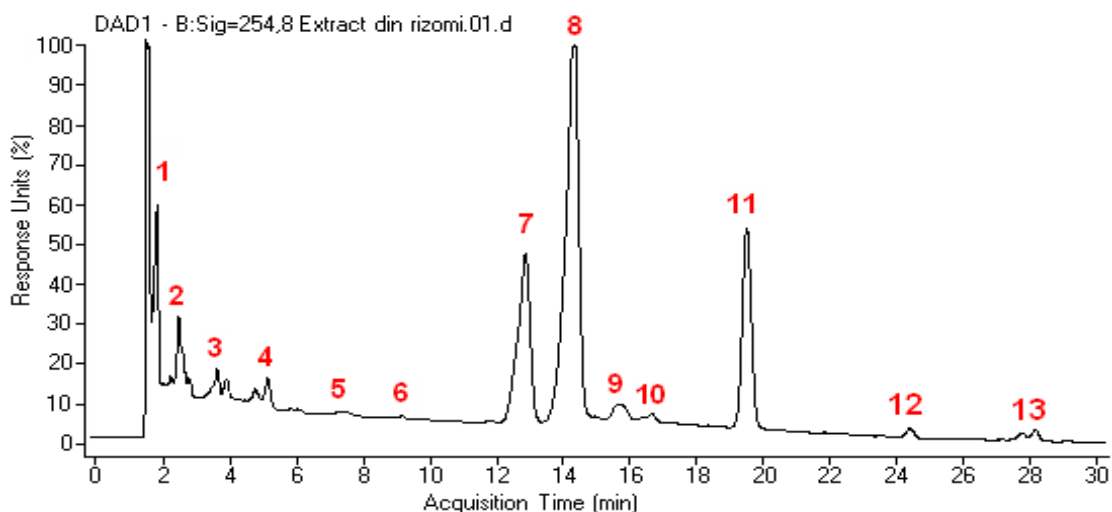


Fig. 4.33. Analiza HPLC-ESI-MS a metabolizilor secundari extrași din rizomii de *R. rosea* și detectați la lungimea de undă 254 nm. Separarea a fost efectuată pe coloana cromatografică cu fază inversă (Agilent 300 Extended C₁₈, 4.6 x 150 mm, 5 μm). 1 – acid galic; 2 – salidrozin; 3,4 – 4-metoxi-cinamil-(6'-O-α-arabinopiranozil)-O-β-glucopiranozidă; 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 ai probelor martor și din spectrele de masă (MS) s-a reușit atribuirea semnalelor următorilor compuși: **1** – acid galic (Rt=1,8 min, m/z=169, [M-H]⁻), **2** – salidrozin (Rt=2,5 min, m/z=299 [M-H]⁻, m/z=345 [M-HCOO]⁻, m/z=599 [2M-H]⁻), **3,4** – 4-metoxi-cinamil-(6'-O-α-arabinopiranozil)-O-β-glucopiranozidă (Rt=4,2 și 5,1 min, m/z=457 [M-H]⁻, m/z=915 [2M-H]⁻), **5,6** – derivați de tipul compușilor **3,4** (Rt=8,9 min, m/z=491 și 10,2 min m/z=269, 711), **7** – rosarin (Rt=12,8 min, m/z=473 [M-HCOO]⁻, m/z=855 [2M-H]⁻), **8** – rosavin (Rt=14,2 min, m/z=427 [M-H]⁻, m/z=473 [M-HCOO]⁻, m/z=855 [2M-H]⁻), **9** – cinamil-(6'-O-β-xilopiranozil)-O-β-glucopiranozidă (Rt=14,6 min, m/z=427 [M-H]⁻, m/z=473 [M-HCOO]⁻, m/z=855 [2M-H]⁻), **10** – rosiridin (Rt=16,2 min, m/z=377 [M-HCOO]⁻, m/z=663 [2M-H]⁻), **11** – derivați de tipul compușilor **3,4** (Rt=19,3 min, m/z=469 [M-H]⁻, m/z=939 [2M-H]⁻), **12, 13** – derivați de tipul compușilor **3,4** (Rt=24,3 și 28,2 min, m/z=173, 287, 455).

Cromatogramele extractelor din probele de agregate celulare de *R. rosea*, supuse expoziției radiației UV, temperaturilor joase pozitive și precursorului AC sunt prezentate în Figura 4.34 (cromatogramele A, B, C și D).

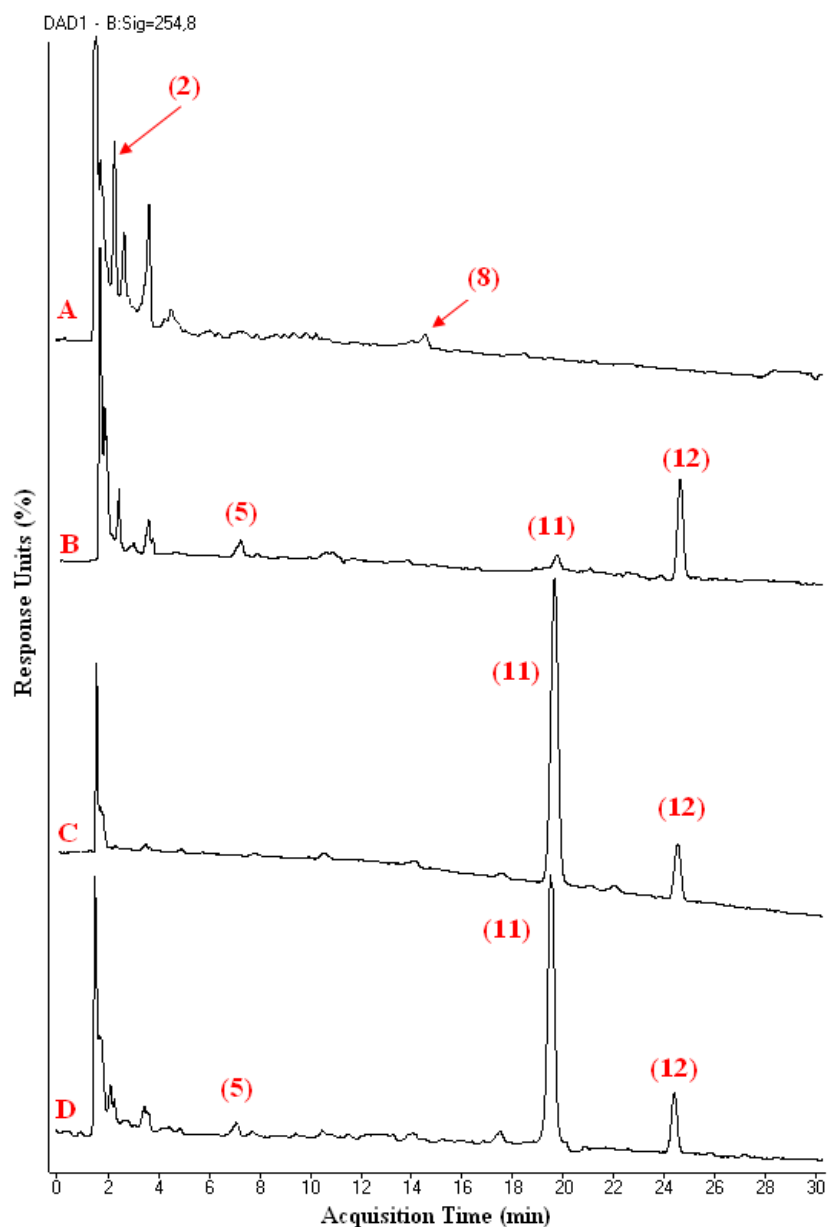


Fig. 4.34. Analiza HPLC-ESI-MS a metabolizilor secundari extrași din agregatele celulare de *R. rosea*: unde A – proba martor, B – proba supusă radiației UV, C – proba supusă temperaturii joase, D – proba supusă acțiunii radiației UV, temperaturii joase și alcoolului cinamic. 2 – salidrozyd; 3,4 - 4-metoxi-cinamil-(6'-O- α -arabinopiranozil)-O- β -glucopiranozidă; 5,6 – derivați de tipul compușilor 3,4; 8 – rosavin; 11, 12– derivați de tipul compușilor 3,4.

Din Figura 4.34 se poate observa că în cromatograma extractului din agregatele celulare – proba martor (Figura 4.34A), este prezent un număr mai mic de semnale și cu o intensitate mai redusă în comparație cu extractul din rizomi (Figura 4.33). Este importantă însă prezența compușilor caracteristici speciei *R. rosea*, salidrozydul **1** și rosavinul **8**. Influența temperaturii joase pozitive și prezența AC în mediul de cultură a agregatelor celulare (Figura 4.34C), a favorizat acumularea atât a salidrozydului și rosavinului, cât și a altor componenți, cum ar fi **11**, **12** cu

$m/z=469$ și 455 , care conform spectrului de masă pot fi derivați de tipul 4-metoxi-cinamil-(6'-O- α -arabinopiranozil)-O- β -glucopiranozidă.

Influența radiației *UV* în combinație cu prezența *AC* în mediul de cultivare a influențat și mai pronunțat compoziția biochimică a culturii agregatelor celulare (Figura 4.34B). A apărut componentul **5** cu $m/z=491$ derivat din aceeași categorie cu componenții **11** și **12**. Combinația influenței celor trei factori: *AC*, radiația *UV* și *temperatura joasă pozitivă* (Figura 4.34D) a favorizat acumularea tuturor compușilor apăruiți și în celelalte probe. Este evidentă intensitatea sporită a componentului **11** în comparație cu ceilalți.

Datele expuse în acest capitol 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 [229]. 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 biotehologică 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*.

4.9. Concluzii la capitolul 4

1. Proliferarea optimă a celulelor calusului de *R. rosea* pe mediu Murashige-Skoog solid și lichid are loc în cazul menținerii concentrației de BA și ANA la nivelul 1,5 mg/L și, respectiv, 0,5 mg/L, raportul dintre concentrațiile acestor componenți fiind de 3:1.

2. Creșterea calusului și agregatelor celulare reprezintă o curbă sigmoidă cu trei faze distincte: faza *lag*, *logaritmă*, *staționară*. Inițierea fazei *staționare* poate fi marcată prin analiza spectrului polipeptidelor, care devine mai bogat. Sfârșitul fazei *staționare* este însoțită de degradarea polipeptidelor cu masă moleculară relativ înaltă și apariția unor componenți cu masă moleculară relativă joasă.

3. Radiația *UV* reprezintă un factor important care influențează benefic acumularea compușilor fenolici în celulele calusului de *R. rosea*. Cu toate acestea, atât conținutul compușilor fenolici, cât și capacitatea lor antioxidantă în extractele din biomasa colectată *in vitro* rămân mult mai joase în comparație cu parametrii caracteristici pentru extractele din rizomi plantelor de *R. rosea*, colectați din Munții Carpați.

4. Tratarea calusului de *R. rosea* cu *temperaturi joase pozitive* determină fenomenul de rejuvenilizare a celulelor prin stimularea acumulării biomasei și activitatea mai joasă a valorilor parametrilor componenților ce caracterizează potențialul oxido-reducător. Aceasta indică faptul, că termoperiodismul zilnic și sezonier reprezintă un factor important care determină creșterea plantei și acumularea *metaboliților secundari* în rizomi. Sporirea randamentului de obținere a *metaboliților secundari* în cultura *in vitro* de *R. rosea* poate fi realizată prin combinarea rațională a expozițiilor la *temperaturi joase pozitive* și radiații UV, ceea ce la fel sugerează despre influența specifică a acestor factori caracteristici pentru zonele montane asupra plantelor spontane de *R. rosea*.

5. Agregatele celulare supraviețuiesc expoziției la temperaturi cu 4°C mai joase în comparație cu celulele calusului, ceea ce confirmă legea lui Bergonie și Tribondeau privind diminuarea rezistenței față de factorii de stres a sistemelor biologice cu grad mai înalt de complexitate.

6. Expoziția calusului de *R. rosea* la *temperaturi joase pozitive* și în prezența *alcoolului cinamic* nu influențează semnificativ acumularea compușilor fenolici în celulele calusului. Cultivarea calusului de *R. rosea* în prezența *alcoolului cinamic* în combinație cu expoziția la *temperatură joasă* și la radiație UV induce în particular acumularea fenolilor și, în general, a substanțelor antioxidante în celulele calusului.

7. Introducerea *RNC Reglalg* în mediul Murashige-Skoog de cultivare a influențat benefic proliferarea atât a calusului, cât și a agregatelor celulare de *R. rosea*, efectul final diferit în dependență de concentrația preparatului în mediul de cultură. Acțiunea benefică a introducerii preparatului *Reglalg* în mediul de cultură se manifestă și prin majorarea conținutului de clorofilă, care, la rândul lui, asigură acumularea *metaboliților secundari* în condiții *in vitro*, precum conținutul compușilor fenolici, inclusiv al flavonoidelor.

8. Influența benefică a preparatului *Reglalg* se manifestă și asupra proceselor antioxidante în extractele din celule calusului de *R. rosea* prin sporirea conținutului compușilor fenolici, precum și prin intensificarea activității unor izoforme ale peroxidazei, ceea ce contribuie la accelerarea restabilirii potențialului oxido-reducător în celule calusului.

9. Datele obținute au demonstrat că *temperaturile joase pozitive* și radiația UV sunt factorii importanți, ce determină acumularea *metaboliților secundari* în celulele agregatelor celulare de *R. rosea*. Utilizarea acestor factori, în combinație cu introducerea în mediul de cultivare a *alcoolului cinamic* și a *Reglalgului* asigură extinderea componenței și a conținutului de *metaboliți secundari* în cultura *in vitro* de *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 [35, 37, 50, 70, 71, 72], 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 [41, 43].

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 asociate cu creșterea capacității antioxidante a extractelor din biomasa obținută *in vitro* [38, 42, 44, 48].

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 Regalg 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 [45, 46, 47, 49, 53, 55, 56, 57, 58].

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) [33, 38, 40].

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 Regalg* 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. ADLER, L.S. The ecological significance of toxic nectar. In: *Oikos*. 2000, 91, pp. 409-420. ISSN 1600-0706. Disponibil: [DOI: 10.1034/j.1600-0706.2000.910301.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.910301.x)
2. AGHAEI, A., MORADI, F., ZARE-MAVIAN, H., ZARINKAMAR, F., POUR-IRANDOOST, H., SHARIFI, P. Physiological responses of tow rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. In: *Afr. J. Biotechnol.* 2011, nr 10(39), pp. 7617-7621. ISSN: 1684-5315. Disponibil: [DOI:10.5897/AJB11.069](https://doi.org/10.5897/AJB11.069)
3. AGRAWAL, S.B., RATHORE, D., SINGH, A. Combined effects of enhanced ultraviolet-B radiation and mineral nutrients on growth, biomass accumulation and yield characteristics of two cultivars of *Vigna radiata* L. In: *J. Environ. Biol.* 2006, vol. 27, pp. 55-60. ISSN 2394-0379. Disponibil: http://www.jeb.co.in/journal_issues/200601_jan06/paper_10.pdf
4. ALAM, MA., SUBHAN, N., HOSSAIN, H., HOSSAIN, M., REZA, HM., RAHMAN, MM., ULLAH, MO. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. In: *Nutr Metab.* 2016, nr 13(27). ISSN 1743-7075. Disponibil: [DOI: 10.1186/s12986-016-0080-3](https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3)
5. ALBERTA *RHODIOLA ROSEA* GROWERS ORGANIZATION (ARRGO). Disponibil: <https://arrgo.ca/>
6. ALI, Z., FRONCZEK, F., KHAN, I. Phenylalkanoids and Monoterpene Analogues from the Roots of *Rhodiola rosea*. In: *Planta Medica*. 2008, nr 74(2), pp. 78–181. ISSN 1439-0221. Disponibil: [DOI: 10.1055/s-2008-1034288](https://doi.org/10.1055/s-2008-1034288)
7. ALTANTSETSEG, K., PRZYBYŁ, J.L., WĘGLARZ, Z., GESZPRYCH, A. Content of biologically active compounds in roseroot (*Rhodiola* sp.) raw material of different derivation. In: *Herba Pol.* 2007, nr 53 (4), pp. 20–26. ISSN 0018-0599. Disponibil: <http://herbapolonica.pl/magazines-files/9696267-3.pdf>
8. ALVAREZ, M.A. Plants for Health: From Secondary Metabolites to Molecular Farming. In: *Plant Biotechnology for Health*. Springer, Cham, 2014, 161 p. ISBN 978-3-319-05771-2. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-3-319-05771-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05771-2)
9. ANTOGNONI, F., ZHENG, S., PAGNUCCO, C., BARALDI, R., POLI, F., BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. In: *Fitoterapia*. 2007, nr 78, pp. 345–352. ISSN 1873-6971. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.fitote.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.02.001)
10. APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. In: *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004, nr 55, pp. 373–399. ISSN 1545-2123. Disponibil: [DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701)

11. ARENDT, P., POLLIER, J., CALLEWAERT, N., CALLEWAERT, N., GOOSSENS, A. Synthetic biology for production of natural and new-to-nature terpenoids in photosynthetic organisms. In: *Plant Journal*. 2016, V. 87 (1), pp. 16-37. ISSN 1365-313X. Disponibil: [DOI: 10.1111/tpj.13138](https://doi.org/10.1111/tpj.13138)
12. ASSAYS FOR CELL VIABILITY, PROLIFERATION AND FUNCTION. Section 15 in The Molecular Probes® Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Johnson I., Spence M. T. Z., editors. 11th ed. 2010, pp. 655–708. ISBN 978-0-9829279-1-5. Disponibil: <https://www.thermofisher.com/md/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
13. AUTORIZAȚIE AA Nr.0448 pentru aplicarea preparatului Reglalg la tratarea semințelor înainte de semănat în Republica Moldova, 2003.
14. 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. Disponibil: [DOI: 10.1002/bmc.1198](https://doi.org/10.1002/bmc.1198)
15. AZMIR, J., ZAIDUL, I.S.M., RAHMAN, M.M., SHARIF, K.M., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M.H.A., GHAFOOR, K., NORULAINI N.A.N. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. In: *J. Food. Engr.* 2013, nr 117, pp. 426-436. ISSN 0260-8774. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014)
16. BAI, Y., BI, H., ZHUANG, Y. et al. Production of solidoside in metabolically engineered *Escherichia coli*. In: *Sci Rep.* 2014, 4: 6640. ISSN 2045-2322. Disponibil: [DOI: 10.1038/srep06640](https://doi.org/10.1038/srep06640).
17. BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A., WURTELE, E.S., BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. In: *Science*. 1985, 228(4704), pp. 1154-1160. ISSN 1095-9203. Disponibil: [DOI: 10.1126/science.3890182](https://doi.org/10.1126/science.3890182)
18. BALOUCHI, Z., PEYVAST, G.A., GHASEMNEZHAD, M., SAADATIAN, M. Changes of antioxidant compounds of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) during storage at low and high temperatures. South-west. In: *J. Hortic. Biol. Environ.* 2011, 2, pp. 193-212. ISSN 2068-7958. Disponibil: <http://www.biozoojournals.ro/swjhbe/v2n2/07.swjhbe.v2n2.Balouchi.pdf>
19. BALUNAS, M.J., AND KINGHORN, A.D. Drug Discovery from Medicinal Plants. In: *Life Sciences*. 2005, 78 (5), pp. 431-41. ISSN 1879-0631. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.lfs.2005.09.012](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012)

20. BATES, L., WALDREN, R.P., TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. In: *Plant Soil*. 1973, vol. 39, pp. 205-207. ISSN 1573-5036. Disponibil: [DOI: 10.1007/BF00018060](https://doi.org/10.1007/BF00018060)
21. BEERS, R.F., SIZER W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase . In: *J. Biol. Chem.* 1952, vol. 195, pp.133-140. ISSN 1083-351X. Disponibil: <http://www.jbc.org/content/195/1/133.full.pdf>
22. BENTLEY, R. The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. In: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1990, nr 25(5), pp. 307–84. ISSN 1549-7798. Disponibil: [DOI: 10.3109/10409239009090615](https://doi.org/10.3109/10409239009090615)
23. BERGER, R.G. Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Heidelberg. Springer. 2007, 648 p. ISBN 978-3-540-49338-9. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-3-540-49339-6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6)
24. BINDER, B.Y.K., PEEBLES, C.A.M., SHANKS, J.V., SAN, K.Y. The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. In: *Biotechnology Progress*. 2009, nr 25(3), pp. 861–865. ISSN 1520-6033. Disponibil: [DOI: 10.1002/btpr.97](https://doi.org/10.1002/btpr.97)
25. BLANKENSHIP, RE. Early Evolution of Photosynthesis. In: *Plant Physiology*. 2010, vol. 154 nr 2, pp. 434-438. ISSN 1532-2548. Disponibil: [DOI: 10.1104/pp.110.161687](https://doi.org/10.1104/pp.110.161687)
26. BORAH, JC. Shikimic acid: a highly prospective molecule in pharmaceutical industry. In: *Current Science*. 2015, vol. 109, nr 9, pp. 1672-1679. ISSN 0011-3891. Disponibil: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer>
27. BORGES, C.V., MINATEL, I.O., GOMEZ-GOMEZ, H.A., LIMA, G.P.P. Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. In *Medicinal Plants and Environmental Challenges* 2017, pp. 259–277. ISBN 978-3-319-68717-9. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-3-319-68717-9_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_15)
28. BOURGAUD, F., GRAVOT,A., MILESI, S., GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. In: *Plant Sci*. 2001, nr 161, pp. 839–851. ISSN 0168-9452. Disponibil: [DOI: 10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
29. BROECKLING, CD., HUHMANN, DV., FARAG, MA., SMITH, JT., MAY, GD., MENDES, P., DIXON, RA., SUMNER, LW. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. In: *J Exp Bot*. 2005, nr 56(410), pp. 323–336. ISSN 1460-2431. Disponibil: [DOI:10.1093/jxb/eri058](https://doi.org/10.1093/jxb/eri058)
30. BROWN, R.P., GERBARG, P.L., RAMAZANOV, Z., *Rhodiola rosea*: a phytomedicinal overview. In: *Herbal Gram*. 2002, 56, pp. 40–52. Disponibil: <http://cms.herbalgram.org/herbalgram/issue56/article2333.html?ts=1552391011&signature>

31. BUCHWALD, W., MORDALSKI, R., KUCHARSKI, WA., GRYSZCZYŃSKA, A., ADAMCZAK, A. Effect of fertilization on roseroot (*Rhodiola rosea* L.) yield and content of active compounds. In: *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2015, nr 14(2), pp. 109–121. ISSN 1644-0692. Disponibil: <http://www.acta.media.pl/pl/full/7/2015/.pdf>
32. 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. Disponibil: [DOI:10.1007/BF02508414](https://doi.org/10.1007/BF02508414)
33. CĂLUGĂRU, T., MALINOC, A. Cultura *in vitro*, conservarea și restabilirea resurselor naturale de *Rhodiola rosea* L. In: *Conferința Tinerilor Cercetători din Moldova*. Chișinău, 2004, pp. 36. ISBN 9975-9525-3-4.
34. 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*, Chișinău, 2004, pp. 76-81. ISBN 9975-9814-0-2.
35. 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.
36. CĂLUCĂRU, Tatiana, DELEAN, Tatiana, DASCALIUC, Alexandru. *Procedeu de micropropagare a plantelor de Rhodiola rosea L. in vitro*. Brevet de invenție 3375 (13) G2, A01H 4/00 (2006.01) A01H 5/04 (2006.01) A01H 5/06(2006.01). Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit: a 2007 0082. Data depozit: 2007.02.23. Data publicării: 2007.08.31. In: BOPI. 2007, nr. 8, pp. 32-33. Disponibil: http://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_04_2015.pdf
37. CĂLUGĂRU, T., IVANOVA, R., RALEA, T., CIOCARLAN, A., MROZIKIEWICZ, R.M., KRAJEWSKA-PATAN, A., TKACHENKO, A., DASCALIUC, A. Perspectives of cultivation *Rhodiola rosea* L. for medicinal use. In: *Herba Polonica. 12th International Congress of Polish Herbal Committee*, May 24-25, Poland, Poznań. 2007, nr 53(2), pp. 138. ISSN 0018-0599. Disponibil: <http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/336747-Conference%20Proceedings.pdf>
38. CALUGARU, 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.
39. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Micropropagarea plantelor de *Rhodiola rosea* L. *in vitro*. In: *Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor. Materialele Conferinței*

Naționale cu participare Internațională, 9-10 octombrie, Chișinău, 2008, pp. 290-293. ISBN: 978-9975-78-667-6.

40. 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.
41. 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. 52-52. ISBN 978-973-640-677-5. <http://botanica.uaic.ro/docs/Brosura2011.pdf>
42. 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., Teze. 21 iunie 2011: Chișinău*, pp. 129. ISSN 978-9975-78-994-3.
43. CALUGARU-SPATARU, T., PARIU, I.A., DASCALIUC, A. Problems of introduction golden root (*Rhodiola rosea* L.) in agriculture. In: *Досягнення і проблеми Генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. Присвячено:100-річчю від дня народження Й.А. Рапопорта*. Київ, 2012, vol. 3, pp. 588-593. ISBN 978-966-171-567-6. Disponibil: http://utgis.org.ua/images/pdf/dosiagnennia/2012_V3.pdf
44. CALUGARU-SPATARU T., SILION M., CIOCARLAN A., DASCALIUC A. Study of biotransformation compounds in callus culture of *Rhodiola rosea* specie. Agronomy Series of Scientific Research. In: *Lucrări șt. Univ. de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”*. Seria Agronomie. 2013, vol. 56 nr 2, pp. 57-60. ISSN 1454-7414. Disponibil: [http://www.revagrois.ro/PDF/2013-2/paper/2013-56\(2\)_09-en.pdf](http://www.revagrois.ro/PDF/2013-2/paper/2013-56(2)_09-en.pdf)
45. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Cinetica creșterii calusului de *Rhodiola rosea* L. sub acțiunea regulatorilor de creștere naturali. In: *Biotehnologii avansate – realizări și perspective: simpozion naț. cu participare intern. Ch.*, 24-25 oct., 2013, p. 15. ISBN 987-9975-56-111-2.
46. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Effects of Natural Growth Regulator *Reglalg* on the *Rhodiola rosea* L. callus growth rate. In: *Journal of Botany*. Chisinau. 2015, vol. VII., nr. 1(10), pp. 5-9. ISSN 1857-095X. Disponibil: http://www.gradinabotanica.asm.md/sites/default/files/revista_botanica2015.pdf
47. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, 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. Disponibil: http://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_04_2015.pdf
48. 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. Disponibil: <http://bsl.asm.md/article/id/37175>
 49. 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. Disponibil: <http://bsl.asm.md/article/id/52247>
 50. 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 Acad. de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2017, nr. 3(333), pp. 76-83. ISSN 1857-064X. Disponibil: <http://bsl.asm.md/article/id/57334>
 51. CARRILLO-CASTAÑEDA, G., MATA, A. Succession of esterase and peroxidase isozymes associated with the in vitro Sugarcane tissue dedifferentiation and shoot induction. In: *Biotechn. Aplicada*, 2000, vol. 17, pp. 225-230. ISSN 0684-4551. Disponibil: <https://pdfs.semanticscholar.org/1059/42494e0501ac5d7e1ca98570966ffe27f660.pdf>
 52. CARTER, G.A., KNAPP, A.K. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. In: *American Journal of Botany*. 2001, nr 88, pp. 677-684. ISSN 1537-2197. Disponibil: [DOI:10.2307/2657068](https://doi.org/10.2307/2657068)
 53. 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: mater. conf. șt. intern.*, 23-24 oct. 2014. Ed. V-a. Ch., 2014, pp. 48-52. ISBN 978-9975-56-194-5.
 54. 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. Disponibil: https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file
 55. 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. Disponibil: <http://bsl.asm.md/article/id/47017>
 56. 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 science in the dialogue of generations: "Connections between universities, Academia and Business Community"* Murch 25, 2016, Ch., pp. 160. ISBN 978-9975-933-78-0.
57. CAUȘ, M., CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., DASCALIUC, A. Influența regulatorului natural de creștere *Reglalg* asupra cantității și calității biomasei calusului de *Rhodiola rosea* L. cultivat *in vitro*. In: *Simpozionul național cu participare internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”*, ediția IV-a, 03-04 octombrie 2016, Chișinău, pp. 23. CZU 577.21+631.147(063)(082)=135.1=161.1=111.
 58. 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, pp. 71. ISBN 978-9975-4182-1-8.
 59. CHANG, T.H., HSIEH, F.L., KO, T.P. et al. Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. In: *Plant Cell*. 2010, vol. 22, nr 2, pp. 454-67. ISSN 1532-298X. Disponibil: [DOI: 10.1105/tpc.109.071738](https://doi.org/10.1105/tpc.109.071738)
 60. CHEN, SL., YU, H., LUO, HM., WU, Q., LI, CF., STEINMETZ, A. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress and prospects. In: *Chin Med*. 2016a, vol. 11, pp. 1–10. ISSN 1749-8546. Disponibil: [DOI: 10.1186/s13020-016-0108-7](https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7)
 61. CHOE, KI., KWON. JH, PARK, KH., OH, MH., KIM, MH., KIM, HH., CHO, SH., CHUNG, EK., HA, SY., LEE, MW. The anti-oxidant and anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. In: *Molecules* 2012; vol. 17, pp. 11484-94. ISSN 1420-3049. Disponibil: [DOI: 10.3390/molecules19033173](https://doi.org/10.3390/molecules19033173)
 62. CHUNG, D., KIM, SY., AHN, JH. Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*. In: *Sci Rep*. 2017, nr 7: 2578. ISSN 2045-2322. Disponibil: [DOI: 10.1038/s41598-017-02042-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-02042-2)
 63. CLEWER, A.G., SCARISBRICK, D.H. Practical Statistics and Experimental Design for Plant and Crop Science. John Wiley and Sons, Chichester. 2001, 332. p. ISBN 978-0-471-89909-9.
 64. CORREIA, S., VINHAS, R., MANADAS, B., LOURENÇO, A. S., VERÍSSIMO, P., & CANHOTO, J. M. Comparative proteomic analysis of auxin-induced embryogenic and nonembryogenic tissues of the Solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). In: *Journal of Proteome Research*. 2012, vol. 11, nr 3, pp. 1666–1675. ISSN 1535-3907. Disponibil: [DOI: 10.1021/pr200856w](https://doi.org/10.1021/pr200856w)
 65. CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., AND LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B.B. Buchanan, W.

Gruissem, and R.L. Jones, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), 2000, pp. 1250–1318. ISBN 0943088372.

Disponibil: <http://science.lecture.ub.ac.id/files/2012/04/plant-biosynthesis1.pdf>

66. CUI, JL. Potential of the endophytic fungus *Phialocephala fortinii* Rac56 found in *Rhodiola* plants to produce salidroside and p-Tyrosol. In: *Molecule*. 2016, 21(4), p. 502. ISSN 1420-3049. Disponibil: [DOI: 10.3390/molecules21040502](https://doi.org/10.3390/molecules21040502)
67. CUSIDO, R.M., PALAZON, J., BONFILL, M., NAVIA-OSORIO, A., MORALES, C., PIÑOL, M.T. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. In: *Biotechnol. Prog.* 2002, vol. 18, pp. 418–423. ISSN 1520-6033. Disponibil: [DOI: 10.1021/bp0101583](https://doi.org/10.1021/bp0101583)
68. CZECH-KOZLOWSKA, M., KRZYWATSKI, Z. Phenolic compounds and the polyphenoloxidase and peroxidase activity in callus tissue culture-pathogen combination of red raspberry and *Didymella applanata* (Niessl) sacssl.) Sacc. In: *Phytopath. Z.*, 1984, vol.109, pp. 176-182. ISSN 0031-9481. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1439-0434.1984.tb00704.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1984.tb00704.x)
69. DASKALYUK, A.P. Dormancy Release, Germination, and Electrolyte Leakage from Apple Embryos during Stratification in the Presence of Sucrose. In: *Russian J. Plant Physiol.*, 2002. vol. 49. nr. 5, pp. 700-705. ISSN 1608-3407. Disponibil: [DOI: 10.1023/A:1020209522938](https://doi.org/10.1023/A:1020209522938)
70. 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
71. DASCALIUC, A., CIOCÂRLAN, A., ABRAMOV, V., CĂLUGĂRU, T., NICOLESCU, A., COSTAN, O., DELEANU, C. Biochemical analysis of *Rhodiola rosea* roots. XXIX Conferința Internațională de Chimie, România, Căciulata, 4-6 octombrie, 2006, pp.71. ISBN 973-973-750-049-6.
72. DASCALIUC, A., CĂLUGĂRU-SPĂTARU, 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. Disponibil: http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/1687607-02_Chemical.pdf
73. DASCALIUC, A., VOINEAC, V., RALEA, T. Rolul regulatorilor naturali de creștere în agricultura organică. In: *Conferința științifico-practică internațională*. Chișinău, 2011, pp. 297-303. ISBN 978- 9975-64-221-7.

74. 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.
75. DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. In: *Ann. New York Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, nr 2, pp. 404 – 427. ISSN 1749-6632. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x)
76. DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, R.; ANDRADE, L. N.; DOS REIS BARRETO DE OLIVEIRA, R.; DE SOUSA, DP. A. Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. In: *Molecules*. 2014, vol. 19, pp. 1459–1480. ISSN 1420-3049. Disponibil: [DOI: 10.3390/molecules19021459](https://doi.org/10.3390/molecules19021459)
77. DE MARTINO, L., MANCINI, E., DE ALMEIDA, LFR., DE FEO, V. The antigerminative activity of twenty-seven monoterpenes. In: *Molecules*. 2010; 15, pp. 6630–7. ISSN 1420-3049. Disponibil: [DOI: 10.3390/molecules15096630](https://doi.org/10.3390/molecules15096630)
78. DELGODA, R., MURRAY, J.E. Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. In: *Badal S., Delgoda R., editors. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. 2017, pp. 93–100. ISBN 978-0-12-802104-0. Disponibil: [DOI: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00051-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00051-2)
79. DEWICK, PM. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*, Wiley. 2009. 550 p. ISBN: 978-0-470-74168-9. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.024](https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.024)
80. DICOSMO, F, MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. In: *Biotechnol Adv.* 1995, nr 13(3), pp. 425–53. ISSN 1873-1899. Disponibil: <https://eurekamag.com/pdf/002/002672448.pdf>
81. DIXON, RA., CHOUDHARY, AD., DALKIN, K. et al. Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In: *Stafford HA, Ibrahim RK (eds) Phenolic metabolism in plants*. Springer, Boston. 1992, pp. 91–138. ISBN 978-1-4615-3430-3. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-1-4615-3430-3_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3430-3_4)
82. DIXON, RA. Natural products and plant disease resistance. In: *Nature*. 2001, nr 411, pp. 843–847. ISSN 1476-4687. Disponibil: [DOI: 10.1038/35081178](https://doi.org/10.1038/35081178)
83. DORNENBURG, H., KNORR, D. Semicontinuous processes for anthraquinone production with immobilized *Cruciata glabra* cell cultures in a three-phase system. In: *J Biotechnol.* 1999, nr 50, p. 55–62. ISSN 0168-1656. Disponibil: [DOI: 10.1016/0168-1656\(96\)01549-0](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01549-0)
84. DE BOCK, K., EIJNDE, BO., RAMAEKERS, M., HESPEL, P. Acute *Rhodiola rosea* L. intake can improve endurance exercise performance. In: *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2004, nr 14, pp. 298–307. ISSN 1543-2742. Disponibil: [DOI: 10.1123/ijsnem.14.3.298](https://doi.org/10.1123/ijsnem.14.3.298)

85. DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. In: *J Scientia Horticulturae*. 2015, vol. 196, nr 30, pp. 3–14. ISSN 0304-4238. DOI: [10.1016/j.scienta.2015.09.021](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021)
86. ELAMEEN, E., KLEMSDAL, S.S., DRAGLAND, S., FJELLHEIM, S., ROGNL, I.O. Genetic diversity in a germplasm collection of roseroot (*Rhodiola rosea*) in Norway studied by AFPL. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 2008, nr 36, pp. 706-15. ISSN 1842-4309. ISSN 0305-1978. Disponibil: [10.1016/j.bse.2008.07.009](https://doi.org/10.1016/j.bse.2008.07.009)
87. EL-SEEDI H.R., EL-SAID A.M.A., KHALIFA S.A.M., GORANSSON F.L.U., BOHLIN L., BORG-KARLSON K.A., VERPOORTE R. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. In: *J. Agric. Food Chem.* 2012, nr 60, pp. 10877–10895. ISSN 1520-5118. Disponibil: DOI: [10.1021/jf301807g](https://doi.org/10.1021/jf301807g)
88. 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 . Disponibil: DOI: [10.4103/0973-1296.71782](https://doi.org/10.4103/0973-1296.71782)
89. FACCHINI,P.J., DELUCA,V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. In: *Plant J.* 2008, nr 54, pp. 763–84. ISSN 1365-313X. Disponibil: DOI: [10.1111/j.1365-313X.2008.03438.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03438.x)
90. FARMACOPEIA EUROPEANA, 2001, P. 3, P. 105. Disponibil: www.ema.europa.eu
91. FERRER, JL., AUSTIN, MB., STEWART, CJR., NOEL, JP. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. In: *Plant Physiol. Biochem.* 2008, vol. 46 nr 3, pp. 356–370. ISSN 1873-2690. Disponibil: DOI: [10.1016/j.plaphy.2007.12.009](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.009)
92. FETT-NETO, AG., MELANSON, SJ., NICHOLSON, SA., PENNINGTON, JJ., DICOSMO, F. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. In: *Biotechnol Bioeng.* 1994, nr 44(8), pp. 967-71. ISSN 1097-0290. Disponibil: DOI:[10.1002/bit.260440813](https://doi.org/10.1002/bit.260440813)
93. FETT-NETO, AG., DICOSMO, F. Production of paclitaxel and related taxoids in cell cultures of *Taxus cuspidata*: perspectives for industrial applications. In: *DiCosmo F, Misawa M (eds) Plant cell culture: secondary metabolism toward industrial application. CRC Press, New York*, 1996, pp. 139–166. ISBN 9780849351358.
94. FLURKEY, W. H. *In vitro* biosynthesis of *Vicia faba* polyphenoloxidase. In: *Plant Physiol*, 1985, vol. 79, nr 2, pp. 564-567. ISSN 1532-2548. Disponibil: DOI: [10.1104/pp.79.2.564](https://doi.org/10.1104/pp.79.2.564)
95. FOREMAN, J., DEMIDCHIK, V., BOTHWELL, JH., MYLONA, P., MIEDEMA, H., TORRES, MA., LINSTED, P., COSTA, S., BROWNLEE, C., JONES, JD., DAVIES, JM., DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth.

- In: *Nature*. 2003, 422(6930), pp. 442-6. ISSN 1476-4687. Disponibil: [DOI:10.1038/nature01485](https://doi.org/10.1038/nature01485)
96. FOYER, C.H., NOCTOR, G. Comprehensive Invited Review. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. In: *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009, vol. 11, (4), pp. 861-933. ISSN 1557-7716. Disponibil: [DOI: 10.1089/ars.2008.2177](https://doi.org/10.1089/ars.2008.2177)
97. FURMANOWA, M., OLEDZKA, H., MICHALSKA, M., SOKOLNICKA, I., RADOMSKA, D. XXII. *Rhodiola rosea* L. (Roseroot): *In vitro* Regeneration and the Biological Activity of Roots. In: *Bajaj Y.P.S., (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 33, Medicinal and Aromatic Plants VIII*, Springer, Heidelberg, 1995, pp. 412–426. ISBN 978-3-662-08612-4. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-3-662-08612-4_23](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08612-4_23)
98. FURMANOWA, M., SKOPINSKA-ROZEWSKA, E., ROGALA, E., HARTWICH, M. *Rhodiola rosea in vitro* culture: phytochemical analysis and antioxidant action. In: *Soc Bot Pol*. 1998, vol. 67, nr 1, pp. 69–73. ISSN 2083-9480. Disponibil: [DOI: 10.5586/asbp.1998.009](https://doi.org/10.5586/asbp.1998.009)
99. FURMANOWA, M., HARTWICH, M., ALFERMANN, A. W., KOŹMIŃSKI, W., OLEJNIK, M. Rosavin as a product of glycosylation by *Rhodiola rosea* (rose root) cell cultures. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1999, vol. 56, nr 2, pp. 105-110. ISSN 1573-5044. Disponibil: [DOI: 10.1023/A:1006232023274](https://doi.org/10.1023/A:1006232023274)
100. FURMANOWA, M., KEDZIA, B., HARTWICH, M., KOZOWSKI, J., KRAJEWSKA-PATAN, A., MSCISZ, A., JANKOWIAK, J. Phytochemical and pharmacological properties of *Rhodiola rosea* L. In: *Herba Pol*. 1999, vol. 45, nr 2, pp. 108-113. ISSN 0018-0599.
101. GALAMBOSI, B. *Rhodiola rosea* L. from wild collection to field production. In: *Medicinal Plant Conservation*. 2005, vol. 11, pp. 31–35. ISSN 1430-953X. Disponibil: <http://cmsdata.iucn.org/downloads/mpc11.pdf>
102. GALAMBOSI, B. Demand and availability of *Rhodiola rosea* L. raw material. In: *Bogers R., Cracer L., Lange D. (eds.) Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, 2006, pp. 223–236. ISBN 978-1-4020-5448-8. Disponibil: https://library.wur.nl/frontis/medicinal_aromatic_plants/16_galambosi.pdf
103. GALAMBOSI, B., GALAMBOSI, ZS., HETHELYI, E., SZOKE, E., VOLODIN, V., POLETAEVA, I., LLJINA, I. Importance and quality of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) growing in the European North. In: *Zeitschrift fur Arznei- und Gewurzpflanzen*. 2010, nr 4, pp. 160–169. ISSN 1431-9292. Disponibil: http://www.agrowebcee.net/uploads/media/Rhodiola_in_the_European_North_ZAG_01.pdf

104. GALAMBOSI, B. Cultivation of *Rhodiola rosea* in Europe. In: Cuerrier, A., Ampong-Nyarko, K. (eds.): *Rhodiola rosea*. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2014, pp. 87-124. eISBN 9780429184567. Disponibil: [DOI: 10.1201/b17903](https://doi.org/10.1201/b17903)
105. GANZERA, M., YAYLA, Y., KHAN, I.A. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography. In: *Arch. Pharm. Res.* 2000, nr 23(4), pp. 349–352. eISSN 1347-5223. Disponibil: [DOI: 10.1248/cpb.49.465](https://doi.org/10.1248/cpb.49.465)
106. 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. Disponibil: [DOI: 10.1248/cpb.49.465](https://doi.org/10.1248/cpb.49.465)
107. GAO, H., XU, J, LIU, X., LIU, B., DENG, X. Light effect on carotenoids production and expression of carotenogenesis genes in citrus callus of four genotypes. In: *Acta Physiol Plant*. 2011, vol. 33, pp. 2485–2492. ISSN 1861-1664. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11738-011-0793-x](https://doi.org/10.1007/s11738-011-0793-x)
108. GEORGIEV, M., PAVLOV, A., & ILIEVA, M. Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: the effect of temperature. In: *Biotechnology Letters*. 2004, 26(10), pp. 855–856. ISSN 1573-6776. Disponibil: [DOI: 10.1023/B:BILE.0000025891.64306.16](https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000025891.64306.16)
109. GEORGIEV, M., KOVACHEVA, E., MARCHEVA, N., ILIEVA, M. Purification of rosmarinic acid extracts from *Lavandula vera* MM cell biomass. In: *Food Chem*. 2006, 94, pp. 111-114. ISSN 0308-8146. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.055](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.055)
110. GEORGIEVA, K., LICHTENTHALER, H.K. Photosynthetic response of different pea cultivars to low and high temperature treatments. In: *Photosynthetica*. 2006, 44, pp. 569-578. ISSN 1573-9058. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11099-006-0073-y](https://doi.org/10.1007/s11099-006-0073-y)
111. GERSHENZON, J., KREIS, JW. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides, and steroid saponins. In: *M Wink, ed Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Annual Plant Reviews 21*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK. 1999, pp. 222–299. Disponibil: [DOI: 10.1002/9781119312994.apr0427](https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0427)
112. 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. Disponibil: http://www.bio.uaic.ro/publicatii/anale_vegetala/issue/2011F2/08-2011F2.pdf
113. GNASEKARAN, P., RATHINAM, X., SINNI AH, UR., SUBRAMANIYAM, S. A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies growth of *Phalaenopsis violacea*

- orchid. In: *J. Phytol.* 2010, vol. 2(1), pp. 29-33. ISSN 2075-6240. Disponibil: <https://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2069>
- 114.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. Disponibil: [DOI: 10.1385/1-59259-959-1:051](https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:051)
- 115.GONZALEZ, A., THMES, R. S., RODRIGUEZ, R. Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons. In: *Physiol. Plant.* 1991, vol. 83, pp. 611-620. ISSN 1399-3054. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb02477.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02477.x)
- 116.GONZALEZ-LAMOTHE, R., MITCHELL, G., GATTUSO M., DIARRA M. S., MALOUIN, F., BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. In: *Int. J. Mol. Sci.* 2009, nr 10, pp. 3400-3419. ISSN 1422-0067. Disponibil: [DOI: 10.3390/ijms10083400](https://doi.org/10.3390/ijms10083400)
- 117.GRECH-BARAN, M., SYKŁOWSKA-BARANEK, K., GIEBULTOWICZ, J., WROCZYNSKI, P., PIETROSIUK, A. Tyrosol-glycosyltransferase activity and production of salidroside in natural and transformed root cultures of *Rhodiola kirilowii* (Regel) Regel et Maximowicz. In: *Acta Biol Cracov Bot.* 2013, 55(2), pp. 126–133. ISSN 1898-0295. Disponibil: [DOI: 10.2478/abcsb-2013-0025](https://doi.org/10.2478/abcsb-2013-0025)
- 118.GRECH-BARAN, M., SYKŁOWSKA-BARANEK, K., PIETROSIUK, A. Biotechnological approaches to enhance salidroside, rosin and its derivatives production in selected *Rhodiola* spp. *in vitro* cultures. In: *Phytoch. Rev.* 2015, vol.14, pp. 657–674. ISSN 1572-980X. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11101-014-9368-y](https://doi.org/10.1007/s11101-014-9368-y)
- 119.GREGORY, R. P. F. A rapid assay for peroxidase activity. In: *Biochemical Journal.* 1966, vol. 101, nr. 3, pp. 582–583. ISSN 1470-8728. Disponibil: [DOI: 10.1042/bj1010582](https://doi.org/10.1042/bj1010582)
- 120.GUIMARA, A., SERAFINI, M., QUINTANS, L. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. In: *Expert Opin. Ther. Patents.* 2013, nr 24(3), pp. 243-265. ISSN 1744-7674. Disponibil: [DOI: 10.1517/13543776.2014.870154](https://doi.org/10.1517/13543776.2014.870154)
- 121.GUY, C. The influence of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants. In: *Lerner H.R. (Ed.). Plants responses to environmental stresses. from phytohormones to genome reorganization.* Marcel Dekker, Inc., New York, Basel. 1999, pp. 497–548. ISBN 9780824700447. [DOI: 10.1201/9780203743157](https://doi.org/10.1201/9780203743157)
- 122.GYÖRGY, Z., TOLONEN, A., PAKONEN, M., NEUBAUER, P., HOHTOLA, A. Enhancing the production of cinnamyl glycosides in compact callus aggregate cultures of *Rhodiola rosea* by biotransformation of cinnamyl alcohol. In: *Plant Science.* 2004, vol. 166, nr 1, pp. 229-236. ISSN 1573-6776. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.09.011](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.09.011).

- 123.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. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11240-005-4010-8](https://doi.org/10.1007/s11240-005-4010-8).
- 124.GYÖRGY, Z. Glucoside production by *in vitro Rhodiola rosea* cultures. Academic Dissertation. Acta Universitatis Ouluensis C Tehnica, Oulu University Press, Oulu, 2006, 244, p. ISBN 951-42-8080-6 (PDF). Disponibil: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514280806/>.
- 125.GYÖRGY, Z., FJELLDAL, E., SZABÓ, A., ASPHOLM, P.E., PEDRYC, A. Genetic diversity of golden root (*Rhodiola rosea* L.) in northern Norway based on recently developed SSR markers. In: *Turkish J. of Biology*, 2013, nr 37, pp. 665-660. ISSN 1303-6092. Disponibil: [DOI: 10.3906/biy-1302-17](https://doi.org/10.3906/biy-1302-17)
- 126.HADACEK, F. Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. In: *Crit Rev Plant Sci*. 2002, vol. 21, nr 4, pp. 273–322. ISSN 1549-7836. Disponibil: [DOI: 10.1080/0735-260291044269](https://doi.org/10.1080/0735-260291044269)
- 127.HADIZADEH, I., PIVASTEGAN, B., HAMZEHZARGHANI, H. Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*. In: *Am. J. Appl. Sci*. 2009, vol. 6, nr 5, pp. 857-861. ISSN 1554-3641. Disponibil: [DOI: 10.3844/ajassp.2009.857.861](https://doi.org/10.3844/ajassp.2009.857.861)
- 128.HAO, G., X DU, F ZHAO, R SHI, J WANG. Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2009, vol. 97, nr 2, pp. 175–185. ISSN 1573-5044. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11240-009-9513-2](https://doi.org/10.1007/s11240-009-9513-2)
- 129.HARBORNE J.B., BAXTER H. The Handbook of Natural Flavonoids. *John Wiley and Sons, Chichester*. 1999, Vol. 1-2. 1838 p. ISBN: 978-0-471-95893-2 Disponibil: <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.41065/page/n481>
- 130.HARBORNE, J.B. AND WILLIAMS, C.A. Advances in Flavonoid Research Since 1992. In: *Phytochemistry*. 2000, vol. 55, nr 6, pp. 481-504. ISSN 1873-3700. Disponibil: [DOI: 10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- 131.HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., ANEE, T.I., FUJITA, M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. In: *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2017, vol. 23, nr 2, pp. 249-268. ISSN 0974-0430. Disponibil: [DOI: 10.1007/s12298-017-0422-2](https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2)
- 132.HAYAT, S., HAYAT, Q., ALYEMENI, M.N. et al. Role of proline under changing environments. In: *Plant Sign.Behavior*. 2012, vol. 7, nr 11, pp. 1456–1466. ISSN 1559-2324. Disponibil: [DOI: 10.4161/psb.21949](https://doi.org/10.4161/psb.21949)

133. HETHELYI, EB., HORANY, K., GALAMBOSI, B., DOMOKOS, J., PALINKAS, J. Chemical composition of the essential oil from rhizomes of *R. rosea* L. grown in Finland. In: *J Essent Oil Res.* 2005, vol. 17, nr 6, pp. 628-629. ISSN 2163-8152. Disponibil: [DOI: 10.1080/10412905.2005.9699016](https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9699016)
134. HIPPOLYTE, I., MARIN, B., BACCOU, JC., JONARD, R. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. In: *Plant Cell Rep.* 1992, vol. 11, nr 3, pp. 109-112. ISSN 1432-203X. Disponibil: [DOI:10.1007/BF00232160](https://doi.org/10.1007/BF00232160)
135. HOOPEN, HJG., VINKE, JL., MORENO, PRH., VERPOORTE, R., HEIJNEN, JJ. Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharanthus roseus* suspension cultures. In: *Enzyme Microb. Tech.* 2002, vol. 30, nr 1, pp. 56–65. ISSN 0141-0229. Disponibil: [DOI: 10.1016/S0141-0229\(01\)00456-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00456-2)
136. HSIEH, MH., CHANG, CY., HSU, SJ., CHEN, JJ. Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in IspD and IspE albino mutants in Arabidopsis. In: *Plant Molecular Biology.* 2008, vol. 66, nr 6, pp. 663–673. ISSN 1573-5028. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11103-008-9297-5](https://doi.org/10.1007/s11103-008-9297-5)
137. <http://data.gbif.org>
138. <http://www.tamiflu.com/>
139. HU, Y., BAO, F., LI, J. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. In: *Plant J.* 2000, vol. 24, nr 5, pp. 693–701. ISSN 1365-313X. Disponibil: [DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00915.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00915.x)
140. HU, YQ., LIU, S., YUAN, HM., LI, J., YAN, DW., ZHANG, JF., LU, YT. Functional comparison of catalase genes in the elimination of photorespiratory H₂O₂ using promoter- and 3'-untranslated region exchange experiments in the *Arabidopsis cat2* photorespiratory mutant. In: *Plant, Cell and Environment.* 2010, vol. 33, nr 10, pp. 1656-1670. ISSN 1365-3040. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1365-3040.2010.02171.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02171.x)
141. HUSSAIN, A., QARSHI, IA., NAZIR, H., AND IKRAM, U. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: *Recent Advances in Plant in vitro Culture.* Intechopen. 2012. 28 p. Disponibil: [DOI: 10.5772/50568](https://doi.org/10.5772/50568)
142. HUYLEBROECK, JMV., PIQUERASM, A., DEBERGHM, PC. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. In: *Plant Sci.* 2000, vol. 155, nr 1, pp. 59-66. Disponibil: [DOI: 10.1016/S0168-9452\(00\)00201-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00201-6)
143. IMLAY, JA. Pathways of oxidative damage. In: *Annu Rev Microbiol.* 2003, vol. 57, pp. 395–418. eISSN 1545-3251. Disponibil: [DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938)

- 144.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 si ameliorării plantelor*. Chisinau 2008, pp. 372-376. ISBN 978-9975-78-667-6.
- 145.JANSKA, A., MARSIK, P., ZELENKOVA, S., OVESNA, J. Cold stress and acclimation— what is important for metabolic adjustment? In: *Plant Biol.* 2010, vol. 12, nr 3, pp. 395-405. ISSN 1435-8603. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1438-8677.2009.00299.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00299.x)
- 146.JIANFENG, X., ZHIGUO, S., PUSUN, F. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production. In: *Enzyme and Microbial Technology.* 1998, vol. 23 nr 1-2, pp. 20–27. ISSN 0141-0229. Disponibil: [DOI: 10.1016/s0141-0229\(98\)00011-8](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(98)00011-8)
- 147.JOO, JH., BAE, YS., LEE, JS. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. In: *Plant Physiol.* 2001, vol. 126 nr 3, pp. 1055-60. ISSN 1532-2548. Disponibil: [DOI: 10.1104/pp.126.3.1055](https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1055)
- 148.JOSET, K., NYBERG, N., VAN DIERMEN, D. et al. Metabolic profiling of *Rhodiola rosea* rhizomes by 1H NMR spectroscopy. In: *Phytochem Anal.* 2011, vol. 22, nr 2, pp. 158–165. ISSN 1099-1565. Disponibil: [DOI: 10.1002/pca.1262](https://doi.org/10.1002/pca.1262)
- 149.KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. In: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004, vol. 44, nr 6, pp. 453-464. ISSN 1549-7852. Disponibil: [DOI: 10.1080/10408690490886683](https://doi.org/10.1080/10408690490886683)
- 150.KARUPPUSAMY S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. In: *J Med Plants Res.* 2009, vol. 3, nr 13, pp. 1222–39. ISSN 1996-0875. Disponibil: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/EEE689215753>
- 151.KATALINIĆ, V., MILOŠ, M., KULIŠIĆ, T. et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. In: *Food Chem.* 2006, vol. 94, nr 4, pp. 550–557. ISSN 0308-8146. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.12.004](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004)
- 152.KELLY GS. *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. In: *Alternative Medicine Review.* 2001. vol. 6, nr 3, pp. 293–302. ISSN 1089-5159. Disponibil: [PMID:11410073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11410073/)
- 153.KIM, SJ., HWANG, B., HWANG, SJ., AHN, JC. Production of salidroside from callus culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. In: *Korean J. Plant biotechnology.* 2004, vol. 31, nr 1, pp. 89-94. ISSN 2384-1397. Disponibil: [DOI: 10.5010/JPB.2004.31.1.089](https://doi.org/10.5010/JPB.2004.31.1.089)
- 154.KLICH, M.G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. In: *Environmental and Experimental Botany.* 2000, vol. 44, nr 3, pp. 171-183. ISSN 0098-8472. Disponibil: [DOI: 10.1016/S0098-8472\(00\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(00)00056-3)

- 155.KOLEWE, M.E., GAURAV, V., ROBERTS, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. In: *Mol Pharmaceutics*. 2008, vol. 5, nr 2, pp. 243-256. ISSN 1543-8392. Disponibil: [DOI: 10.1021/mp7001494](https://doi.org/10.1021/mp7001494)
- 156.KOŁODZIEJ, B., SUGIER, D. Selected elements of biology and morphology of Roseroot in South-Eastern Poland. In: *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*. 2012, vol. 11, nr 5, pp. 127–142. ISSN 2545-1405. Disponibil: http://www.hortorumcultus.actapol.net/pub/11_5_127.pdf
- 157.KOŁODZIEJ, B., SUGIER, D. Influence of plants age on the chemical composition of roseroot (*Rhodiola rosea* L.). In: *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. 2013, vol. 12, nr 3, pp. 147-160. ISSN 2545-1405. Disponibil: http://www.hortorumcultus.actapol.net/pub/12_3_147.pdf
- 158.KORKINA, L.G. Phenylpropanoids as Naturally Occurring Antioxidants from Plant Defence to Human Health. In: *Cellular and Molecular Biology*. 2007, vol. 53, nr 1, pp. 15-25. ISSN 1165-158X. Disponibil: [DOI: 10.1170/T772](https://doi.org/10.1170/T772)
- 159.KOVACHEVA, N., RUSANOV, K., ATANASSOV, I. Industrial Cultivation of Oil Bearing Rose and Rose Oil Production in Bulgaria During 21st Century, Directions and Challenges. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2010, vol. 24, nr 2, pp. 1793-1798. ISSN 1314-3530. Disponibil: [DOI: 10.2478/V10133-010-0032-4](https://doi.org/10.2478/V10133-010-0032-4)
- 160.KOVALEVA, N.P., DOLGUSHEV, V.A., TIKHOMIROVA, A.A. Viability and germination rate of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) seeds obtained under artificial illumination. In: *Russian Agricultural Sciences*. 1997, vol. 23, nr 12, pp. 11-13. pISSN 1068-3674.
- 161.KOVALEVA, N.P., TIKHOMIROV, A.A., DOLGUSHE, V.A. Specific characteristics of *Rhodiola rosea* growth and development under photoculture conditions. In: *Russian Journal of Plant Physiology*. 2003, vol. 50, nr 4, pp. 527-531. pISSN 1021-4437. eISSN 1608-3407. Disponibil: [DOI: 10.1023/A:1024781025696](https://doi.org/10.1023/A:1024781025696)
- 162.KRAJEWSKA-PATAN, A., DREGER, M., GÓRSKA-PAUKSZTA, M., ŁOWICKA, A., FURMANOWA, M., MROZIKIEWICZ, P.M. *Rhodiola rosea* L. – present status of biotechnology investigations. In: *Herba Pol.* 2005, vol 51, nr (3/4), pp. 51–64. ISSN 0018-0599.
- 163.KRAJEWSKA-PATAN, A., DREGER M, ŁOWICKA A, et al. Chemical investigations of biotransformed *Rhodiola rosea* callus tissue. In: *Herba Pol.* 2007, vol. 53, nr 4, pp. 77-87. ISSN 0018-0599. Disponibil: <http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/591698-10.pdf>
- 164.KRAJEWSKA-PATAN, A., FURMANOWA, M., DREGER, M., GO 'RSKA-PAUKSZTA, M., ŁOWICKA, A., MS 'CISZ, A., MIELCAREK, S., BARANIAK, M., BUCHWALD, W., MROZIKIEWICZ, PM. Enhancing the biosynthesis of salidroside by biotransformation of p-tyrosol in callus culture of *Rhodiola rosea* L. In: *Herba Pol.* 2007, vol. 53, nr 1, pp. 55–64.

ISSN 0018-0599. Disponibil: http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/2897720-7_artykul.pdf

165. KRAJEWSKA-PATAN, A., FURMANOWA, M., DREGER, M., MŚCISZ, A., MIELCAREK, S., KANIA, M., BUCHWALD, W., BARANIAK, M., PIETROSIUK, A., ZYCH, M., KARASIEWICZ, M., BOGACZ, A., KUJAWSKI, R., MROZIKIEWICZ, P. *Rhodiola kirilowii*—the present status and perspectives of medicinal use Part I. *In vivo* and *in vitro* cultivation as well as phytochemical investigations of extracts of roots and callus tissues. In: *Herba Pol.* 2008, vol. 54, nr 3, pp. 140–157. ISSN 0018-0599. Disponibil: http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/5227073-12_Rhodiola.pdf
166. KRIZEK, D.T., R.M. MIREC, KI., BRITZ, S.J. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cucumber. In: *Physiol. Plant.* 1997, vol. 100, nr 4, pp. 886-893. ISSN 1399-3054. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00014.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb00014.x)
167. KRSNIK-RASOL, M. Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. In: *Intern. J. Develop. Biol.* 1991, vol. 35, nr 3, pp. 259-263. Disponibil: [DOI: 10.1387/ijdb.1667582](https://doi.org/10.1387/ijdb.1667582)
168. KUMAR, A., GOYAL, S. C., SHARMA, N., POOJA, SINGH, A., LATA, C., PARSHAD, J., RAJKUMAR AND EKTA. Changes in biochemical constituents, enzyme activities and protein profiles during root-shoot differentiation in callus culture of *Dioscorea alata*. In: *Indian Journal of Agricultural Sciences.* 2017, vol. 87, nr 1, pp. 107-114. pISSN 0019-5022. Disponibil: <https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/4293/1/IJAS%2C%202017.pdf>
169. 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. Disponibil: [DOI: 10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
170. LAFAY, S., GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. In: *Phytochem. Rev.* 2008, vol. 7 nr 2, pp. 301–311. ISSN 1572-980X. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11101-007-9077-x](https://doi.org/10.1007/s11101-007-9077-x)
171. LAGRIMINI, LM. The role of peroxidase in host insect defenses. In: *Carozzi N and Koziel M (eds), Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants.* 1997, pp. 195–223. eBook ISBN 9780429217951. Disponibil: [DOI: 10.1201/9780203211731](https://doi.org/10.1201/9780203211731)
172. LAMEIRA, O.A., PINTO, J.E.B.P., CARDOSO, M.G., ARRIGONI-BLANK, M.F. Establishment of cell suspension cultures and flavonoid identification in *Cordia verbenacea* DC. In: *Rev. bras. plantas med.* 2009, vol.11, n.1, pp.7-11. ISSN 1516-0572. Disponibil: [DOI: 10.1590/S1516-05722009000100002](https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000100002)

- 173.LAN, X., CHANG, K., ZHENG, L. et al. Engineering salidroside biosynthetic pathway in hairy root cultures of *Rhodiola crenulata* based on metabolic characterization of tyrosine decarboxylase. In *PLoS One*. 2013, vol. 8, nr 10, e75459. ISSN 1932-6203. Disponibil: [DOI: 10.1371/journal.pone.0075459](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075459)
- 174.LE GALL, H., PHILIPPE, F., DOMON, JM., GILLET, F., PELLOUX, J., RAYON, C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. In: *Plants*. 2015, vol. 4, nr1, pp. 112–166. Disponibil: ISSN 2223-7747. [DOI: 10.3390/plants4010112](https://doi.org/10.3390/plants4010112)
- 175.LISZKAY, S., KENK, B., SCHOPFER, P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. In: *Planta*. 2003, vol 217, nr 4, pp. 658–667. ISSN 1432-2048. Disponibil: [DOI: 10.1007/s00425-003-1028-1](https://doi.org/10.1007/s00425-003-1028-1)
- 176.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)
- 177.LIU, W., YIN, D.X., WANG, D.M., LI, D.W. Influence of environmental factors on the active substances production and antioxidant activity in *Potentilla fruticosa* L. and its quality assessment. In: *Pak. J. Bot.* 2015, vol. 47, nr 6, pp. 2195-2205. ISSN 2070-3368. Disponibil: [DOI: 10.1038/srep28591](https://doi.org/10.1038/srep28591)
- 178.LUCKNER, M. Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1984, 576 p. ISBN 978-3-662-09840-0. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-3-662-02384-6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-02384-6)
- 179.LUNA, CM., PASTORI, GM., DRISCOLL, S., GROTEN, K., BERNARD, S., FOYER, CH. Drought controls H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. In: *Journal of Experimental Botany*. 2005, vol. 56, nr 411, pp. 417-423. ISSN 1460-2431. Disponibil: [DOI: 10.1093/jxb/eri039](https://doi.org/10.1093/jxb/eri039)
- 180.MA, G., LI, W., DOU, D., CHANG, X., BAI, H., SATOU, T., et al. Rhodiolosides A-E, monoterpene glycosides from *Rhodiola rosea*. In: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2006, vol. 54, nr 8, pp. 1229-1233. ISSN 1347-5223. Disponibil: [DOI:10.1248/cpb.54.1229](https://doi.org/10.1248/cpb.54.1229)
- 181.MA, LQ. Molecular cloning and overexpression of a novel UDP-glucosyltransferase elevating salidroside levels in *Rhodiola sachalinensis*. In: *Plant Cell Rep*. 2007, vol. 26, nr 7, pp. 989–999. ISSN 1432-203X. Disponibil: [DOI: 10.1007/s00299-007-0317-8](https://doi.org/10.1007/s00299-007-0317-8)
- 182.MA, LQ., GAO, D.Y., WANG, Y.N., WANG, H.H., ZHANG, J.X., PANG, X.B., et al. Effects of overexpression of endogenous phenylalanine ammonialyase (PALrs1) on

- accumulation of salidroside in *Rhodiola sachalinensis*. In: *Plant Biol.* 2008, vol. 10, nr 3, pp. 323–333. ISSN 1435-8603. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1438-8677.2007.00024.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2007.00024.x)
- 183.MAEDA, H., DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. In: *Annu Rev Plant Biol.* 2012, nr 63, pp. 73–105. ISSN 1545-2123. Disponibil: [DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105439](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439)
- 184.MALIK, S. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. In: *Process Biochem.* 2011, vol. 46, nr 1, pp. 23–34. ISSN 1359-5113. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.procbio.2010.09.004](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.004)
- 185.MANTELL, S.H., SMIT, H.H. Cultural factors that influence secondary metabolites accumulations in plant cell and tissue cultures. In: *S.H. Mantell, H. Smith (Eds.) Plant Biotechnology. Society for Experimental Biology, Seminar Series 18 Cambridge University Press, Cambridge, 1984, 75 p. ISBN 9780521287821.*
- 186.MARCHEV, A., HAAS, C., SCHULZ, S. et al. Sage *in vitro* cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances. In: *Biotechnol Lett.* 2014, vol. 36, nr 2, pp. 211–221. ISSN 1573-6776. Disponibil: [DOI: 10.1007/s10529-013-1350-z](https://doi.org/10.1007/s10529-013-1350-z)
- 187.MARTIN, J., DUSEK, J. Flavonoid accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgii *in vitro* cultures upon treatment with sodium cinnamate. In: *Ceska a Slovenska Farmacie.* 2007, vol. 56, nr 6, pp. 280–283. ISSN 1805-4439.
- 188.MCADAM, J.W., NELSON, C.J., SHARP, E.R. Plant peroxidase activity in the leaf elongation zone of Tall Fescue I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. In: *Plant Physiol.* 1992, vol. 99, nr 3, pp. 872–878. ISSN 1532-2548. Disponibil: [DOI: 10.1104/pp.99.3.872](https://doi.org/10.1104/pp.99.3.872)
- 189.MCDONALD, KA., JACKMAN, AP. Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. In: *Plant Cell Rep.* 1989, vol. 8, nr 8, pp. 455-458. ISSN 1432-203X. Disponibil: [DOI: 10.1007/BF00269047](https://doi.org/10.1007/BF00269047)
- 190.MCGARVEY, DJ., CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. In: *Plant Cell.* 1995, vol. 7, nr 7, pp. 1015–1026. ISSN 1531-298X. Disponibil: [DOI: 10.1105/tpc.7.7.1015](https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015)
- 191.MICHAL, G., SCHOMBURG, D. Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology. 2nd ed. Wiley, 2013, 416 p. Disponibil: [DOI: 10.1002/9781118657072.ch3](https://doi.org/10.1002/9781118657072.ch3)
- 192.MILLER, G., SUZUKI, N., CIFTCI-YILMAZ, S, MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. In: *Plant, Cell and Environment.* 2010, vol. 33, nr 4, pp. 453-467. ISSN 1365-3040. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x)

- 193.MIR, R., JALLU, S., SINGH, TP. The shikimate pathway: review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. In: *Crit Rev Microbiol*. 2015, vol. 41, nr 2, pp. 172–89. ISSN 1549-7828. Disponibil: [DOI: 10.3109/1040841X.2013.813901](https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813901)
- 194.MIRMAZLOUM, I., FORGA CS, I., ZOK, A. et al. Transgenic callus culture establishment, a tool for metabolic engineering of *Rhodiola rosea* L. In: *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*. 2014, vol. 13, nr 4, pp. 95–106. ISSN 1644-0692. Disponibil: http://hortorumcultus.actapol.net/pub/13_4_95.pdf
- 195.MISHRA, S., and AGRAWAL, S.B. Interactive effects between supplemental ultraviolet-B radiation and heavy metals on the growth and biochemical characteristics of *Spinacia oleracea*. In: *Braz. J. Plant Physiol*. 2006, vol. 18, nr 2, pp: 307-314. ISSN 1677-9452. Disponibil: [DOI: 10.1590/S1677-04202006000200007](https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000200007)
- 196.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. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.ab.2006.10.035](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.10.035)
- 197.MORRIS, P. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. Effect of culture temperature. In: *Plant Cell Rep*. 1986, vol. 5, nr 6, pp. 427–429. ISSN 1432-203X. Disponibil: [DOI: 10.1007/BF00269633](https://doi.org/10.1007/BF00269633)
- 198.MUANDA, F., KONE, D., DICKO, A. et al. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts. In: *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, Article ID 674320, 8 p. ISSN 1741-427X. Disponibil: [DOI: 10.1093/ecam/nep109](https://doi.org/10.1093/ecam/nep109)
- 199.MULDER-KRIEGER, TH., VERPOORTE, R., SVENDSEN, AB. et al. Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1988, vol. 13, nr 2, pp. 85–154. ISSN 1573-5044. Disponibil: [DOI: 10.1007/bf00034451](https://doi.org/10.1007/bf00034451)
- 200.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. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
- 201.MURTHY, H.N., DANDIN, V.S., ZHONG, JJ., PAEK, KY. Strategies for Enhanced Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures. In: *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Springer, Dordrecht. 2014, pp. 471–508. ISBN 978-94-017-9223-3. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-94-017-9223-3_20](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_20)

- 202.MUSTAFA, NR., DE WINTER, W., VAN IREN, F., VERPOORTE, R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. In: *Nat Protoc.* 2011, vol. 6, nr 6, pp. 715–742. ISSN 1750-2799. Disponibil: [DOI: 10.1038/nprot.2010.144](https://doi.org/10.1038/nprot.2010.144)
- 203.NIU, L. AND LIAO, W. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. In: *Front. Plant Sci.* 2016, vol. 7, 230. ISSN 1664-462X. Disponibil: [DOI: 10.3389/fpls.2016.00230](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00230)
- 204.OKAMOTO, Y., YAMAHI, K., KOBAYASHI, K. Allelopathic activity of camphor released from camphor tree (*Cinnamomum camphora*). In: *Allelopathy J.* 2011, vol. 27, nr 1, pp. 123–132. ISSN 0973-5046.
- 205.PADUCH, R., KANDEFER-SZERSZEŃ, M., TRYTEK, M., FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. In: *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; vol. 55, nr 5, pp. 315-27. ISSN 1661-4917. Disponibil: [DOI: 10.1007/s00005-007-0039-1](https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1)
- 206.PANIGRAHI, J., BEHERA, M., MAHARANA, S. et al. Biomolecular changes during *in vitro* organogenesis of *Asteracantha longifolia* (L.) Nees – A medicinal herb. In: *Indian J. Exp. Biol.*, 2007, vol. 45, pp. 911–919. ISSN 0975-1009. Disponibil: <https://pdfs.semanticscholar.org/8f88/b33f163e300dba521e3c232d08facfdb4d1c.pdf>
- 207.PANOSSIAN, A., WIKMAN, G. Effects of adaptogens on the central nervous system and the molecular mechanisms associated with their stress-protective activity. In: *Pharmaceuticals*. 2010, vol. 3, nr 1, pp. 188–224. ISSN 1424-8247. Disponibil: [DOI: 10.3390/ph3010188](https://doi.org/10.3390/ph3010188)
- 208.PANOSSIAN, A., WIKMAN, G., SARRIS, J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. In: *Phytomedicine*. 2010, vol. 17, nr 7, pp. 481–493. ISSN: 0944-7113. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.phymed.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.02.002)
- 209.PARK, Y.G., KIM, M.H., YANG, J.K., CHUNG, Y.G., CHOI, M.S. Light-susceptibility of camptothecin production from *in vitro* cultures of *Camptotheca acuminata* Decne. In: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2003, vol. 8, nr 1, pp. 32–36. ISSN 1976-3816. Disponibil: [DOI: 10.1007/BF02932895](https://doi.org/10.1007/BF02932895)
- 210.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. Disponibil: [DOI: 10.1007/s00299-005-0972-6](https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6)
- 211.PAUL, N.D., GWYNN-JONES, D. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. In: *Trends in Ecology & Evolution*. 2003, 18(1), pp. 48–55. ISSN 0169-5347. Disponibil: [DOI: 10.1016/s0169-5347\(02\)00014-9](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(02)00014-9)
- 212.PAYNE, G.F., SHULER, M.L., BRODELIUS, P. Plant cell culture. In: B. K. Lydensen (Ed), *Large Scale Cell Culture Technology*, Hanser Publishers, Munich, 1987, pp. 193–229. ISBN 3-446-14845-0.

213. PAYNE, R.; EDMONDS, M. Isolation of shikimic acid from star aniseed. In: *J. Chem. Ed.* 2005, vol. 82, nr 4, pp. 599-600. ISSN 0021-9584. Disponibil: [DOI: 10.1021/ed082p599](https://doi.org/10.1021/ed082p599)
214. PEREIRA, D.M., VALENTAO, P., PEREIRA, J.A. et al. Phenolics: From chemistry to biology. In: *Molecules*. 2009, vol. 14, nr 6, pp. 2202-2211. ISSN 1420-3049. Disponibil: [DOI: 10.3390/molecules14062202](https://doi.org/10.3390/molecules14062202)
215. 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. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.10.005](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.005)
216. PETSALO, A., JALONEN, J., TOLONEN, A. Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A*. 2006, vol. 1112, nr 1-2, pp. 224-231. ISSN 0021-9673. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.056](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.056)
217. PLATIKANOV, S., EVSTATIEVA, L. Introduction of wild golden root (*Rhodiola rosea* L.) as a potential economic crop in Bulgaria. In: *Econ Bot.* 2008, vol. 62, nr 4, pp. 621-627. ISSN 1874-9364. Disponibil: [DOI: 10.1007/s12231-008-9051-6](https://doi.org/10.1007/s12231-008-9051-6)
218. PLAXTON, W.C., and MCMANUS, M.T. Control of Primary Metabolism in Plants. In: *Annual Plant Reviews*. 2006, vol. 22, 412 p. ISBN 978-14051-3096-7. Disponibil: [DOI: 10.1002/9780470988640](https://doi.org/10.1002/9780470988640)
219. POLLASTRI, S., TATTINI, M. Flavonols: old compounds for old roles. In: *Annals Botany*. 2011, vol. 108, nr 7, pp. 1225-1233. ISSN 03057364. Disponibil: [DOI: 10.1093/aob/mcr234](https://doi.org/10.1093/aob/mcr234)
220. PRAVEEN, N., MURTHY, HN. Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. In: *Ind Crops Prod.* 2012, vol. 35, pp. 241-243. ISSN 0926-6690. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.07.009](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.009)
221. PRZYBYL, J., WEGLARZ, Z., GESZPRYCH, A. Quality of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) cultivated in Poland. In: *Acta Horticulturae*. 2008, vol. 765, pp. 143-150. ISSN 0567-7572. Disponibil: [DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.765.17](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.765.17)
222. PULIDO, P., PERELLO, C., RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. New insights into plant isoprenoid metabolism. In: *Molecular Plant*. 2012, vol. 5, nr 5, pp. 964-967. ISSN 1674-2052. Disponibil: [DOI: 10.1093/mp/sss088](https://doi.org/10.1093/mp/sss088)
223. RAMAKRISHNA, A. and RAVISHANKAR, GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. In: *Plant Signal Behav.* 2011, vol. 6, nr 11, pp. 1720-1731. ISSN: 1559-2316. Disponibil: [DOI: 10.4161/psb.6.11.17613](https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613)

224. RAMANI, S., CHELLIAH, J. UV-B-induced signaling events leading to the enhanced production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. In: *BMC Plant Biol.* 2007, vol. 7, 17 p. ISSN 1471-2229. Disponibil: [DOI: 10.1186/1471-2229-7-61](https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-61)
225. RAMIREZ-ESTRADA, K., VIDAL-LIMON, H., HIDALGO, D., MOYANO, E., GOLENIOSWKI, M., CUSIDÓ, RM., PALAZON, J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. In: *Molecules.* 2016, vol. 21, nr 2:182, 24 p. ISSN 1420-3049. Disponibil: [DOI: 10.3390/molecules21020182](https://doi.org/10.3390/molecules21020182)
226. RAO, SR., RAVISHANKAR, GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. In: *Biotechnol Adv.* 2002, 20, pp. 101–153. ISSN 0734-9750. Disponibil: [DOI: 10.1016/s0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(02)00007-1)
227. RAVISHANKAR, GA., RAO, SR. Biotechnological production of phytopharmaceuticals. In: *J Biochem Mol Biol Biophys.* 2000, 4, pp. 73–102. ISSN 1025-8140.
228. RAZZAGHI-ASL, N., GARRIDO, J., KHAZRAE, I. H., BORGES, F., FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. In: *Current medicinal chemistry.* 2013, vol. 20, nr 36, pp. 4436-4450. ISSN 1875-533X. Disponibil: [DOI: 10.2174/09298673113209990141](https://doi.org/10.2174/09298673113209990141)
229. 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)
230. ROHLOFF, J. Cultivation of herbs and medicinal plants in Norway—Essential oil production and quality control. PhD thesis, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim, Norway, 2003, 77 p. ISBN 82-471-5177-4. Disponibil: <https://core.ac.uk/download/pdf/52102180.pdf>
231. 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. Disponibil: <https://innovareacademics.in/journal/ajpcr/Vol6Suppl1/1574.pdf>
232. RUFFONI, B., PISTELLI, L., BERTOLI, A. and PISTELLI, L. Plant cell cultures: bioreactors for industrial production. In: *Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2010, vol. 698, pp. 203-21. Online ISBN 978-1-4419-7347-4. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-1-4419-7347-4_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_15)
233. RUIZ-SOLA, M.A., COMAN, D., BECK, G., BARJA, M.V., COLINAS, M., GRAF, A., WELSCH, R., RUTIMANN, P., BUHLMANN, P., BIGLER, L. et al. Arabidopsis geranylgeranyl diphosphate synthase 11 is a hub isozyme required for the production of most

- photosynthesis-related isoprenoids. In: *New Phytol.* 2016, vol. 209, nr 1, pp. 252-264. ISSN 1469-8137. Disponibil: [DOI: 10.1111/nph.13580](https://doi.org/10.1111/nph.13580)
- 234.RYU, DDY., LEE, SO., ROMANI, R.J. Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. In: *Biotechnol Bioeng.* 1990, vol. 35, nr 3, pp. 305–311. ISSN 1097-0290. Disponibil: [DOI: 10.1002/bit.260350312](https://doi.org/10.1002/bit.260350312)
- 235.SAHAI, OP., SHULER, ML. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. In: *Biotechnol Bioeng.* 1984, vol. 26, nr 2, pp. 111–120. ISSN 1097-0290. [DOI: 10.1002/bit.260260202](https://doi.org/10.1002/bit.260260202)
- 236.SAKIHAMA, Y., COHEN, M.F., GRACE, S.C. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. In: *Toxicology.* 2002, vol. 77, nr 1, pp. 67–80. ISSN 0300-483X. [DOI: 10.1016/S0300-483X\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8)
- 237.SAUNDERS, D., POPPLETON, D., STRUCHKOV, A., et al. Analysis of five bioactive compounds from naturally occurring *Rhodiola rosea* in eastern Canada. In: *Can J Plant Sci.* 2013, vol. 94, nr 4, pp. 741–748. ISSN 0008-4220. [DOI: 10.4141/CJPS2013-177](https://doi.org/10.4141/CJPS2013-177)
- 238.SCHREINER, M., MARTINEZ-ABAIGAR, J., GLAAB, J., JAMMSEN, M. UV-B induced secondary plant metabolites. In: *Optik & Photon.* 2014, vol. 2, pp. 34–37. ISSN 2626-1308. [DOI: 10.1080/07352689.2012.664979](https://doi.org/10.1080/07352689.2012.664979)
- 239.SCHWAB, J., BASSAM, R., and DIGEL, I. Plant cells viability measurement: spectrofluorometric approach. In: *1st YRA MedTech Symposium, Young Researchers Academy – MedTech in NRW University of Duisburg-Essen*, April 8, Duisburg, Germany. 2016, pp. 35–36. ISBN 978-3-940402-06-6. Disponibil: [DOI: 10.17185/dupublico/](https://doi.org/10.17185/dupublico/)
- 240.SCRAGG, AH., CRESSWELL, R., ASHTON, S., YORK, A., BOND, P., FOWLER, MW. Growth and secondary metabolite product formation of a selected *Cataranthus roseus* cell line. In: *Enzym Microbial Technol.* 1988, vol. 10, nr 9, pp. 532–536. ISSN 0141-0229. Disponibil: [DOI: 10.1016/0141-0229\(88\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90045-2)
- 241.SEIGLER, D.S. *Plant Secondary Metabolism*, Chapman and Hall (Kluwer Academic Publishers), New York. 1998, 711 p. ISBN 978-1-4613-7228-8. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-1-4615-4913-0](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4913-0)
- 242.SEITZ, HU., HINDERER, W. Anthocyanins. Cultures cell culture and somatic cell genetics of plants. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Volume 5: Phytochemicals in Plant Cell* (Constabel F, Vasil I, editors), San Diego: Academic Press, 1988. p 49–76. ISBN 978-0-12-715005-5. Disponibil: [DOI: 10.1016/B978-0-12-715005-5.50042-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715005-5.50042-X)

243. SHATAR, S., ADAMS, R.P.; KOENIG, W. Comparative study of the essential oil of *Rhodiola rosea* L. from Mongolia. In: *Journal of Essential Oil Research*. 2007, vol. 19, nr 3, pp. 215-217. ISSN 2163-8152. Disponibil: [DOI: 10.1080/10412905.2007.9699264](https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699264)
244. SHENG, CZ., HU, TQ., BI, H., YUAN, YJ., JIANG, Y. Effects of plant growth substances on induction and culture of callus from *Rhodiola quadrifida*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2005, vol. 30, nr 16, pp. 1237–1240. ISSN 1001-5302. Disponibil: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZGZY200516003.htm
245. SHILPA, K., VARUN, K., LAKSHMI, B.S. An Alternate Method of Natural Drug Production: Elciting Secondary Metabolite Production Using Plant Cell Culture. In: *Journal of Plant Sciences*. 2010, vol. 5, nr 3, pp. 222-247. ISSN 1816-4951. Disponibil: [DOI: 10.3923/jps.2010.222.247](https://doi.org/10.3923/jps.2010.222.247)
246. SHIM, IS., MOMOSE, Y., YAMAMOTO, A., KIM, DW., USUI, K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. In: *Plant Growth Regul.* 2003, vol. 39, pp. 285-292. ISSN 0167-6903. Disponibil: [DOI: 10.1023/A:1022861312375](https://doi.org/10.1023/A:1022861312375)
247. SHOHAEL, AM., ALI, MB., YU, KW., HAHN, EJ., PAEK, KY. Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006, vol. 85, nr 2, pp. 219–228. ISSN 1573-5044. Disponibil. [DOI: 10.1007/s11240-005-9075-x](https://doi.org/10.1007/s11240-005-9075-x)
248. SIMKIN, AJ., GUIRIMAND, G., PAPON, N., COURDAVAULT, V., THABET, I., GINIS, O., BOUZID, S., GIGLIOLI-GUIVARC'H, N., CLASTRE, M. Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. In: *Planta*, 2011, vol. 234, nr 5, pp. 903–914. ISSN 1432-2048. Disponibil: [DOI: 10.1007/s00425-011-1444-6](https://doi.org/10.1007/s00425-011-1444-6)
249. 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. Disponibil: [DOI: 10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
250. SIVAKUMAR, G., YU, KW., HAHN, EJ., PAEK, KY. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. In: *Curr Sci*. 2005, vol. 89, nr 4, pp. 641–649. ISSN 0011-3891. Disponibil: <https://www.jstor.org/stable/24111160>
251. SIVANANDHAN, G., KAPIL DEV, G., JEYARAJ, M., RAJESH, M., MUTHUSELVAM, M, et al. A promising approach on biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. In: *Protoplasma*. 2013, vol 250, pp. 885–898. ISSN1615-6102. Disponibil: [DOI: 10.1007/s00709-012-0471-x](https://doi.org/10.1007/s00709-012-0471-x).

- 252.SKOOG, F., MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1957, vol. 11, pp. 118–130. ISSN 0081-1386. Disponibil: [PMID: 13486467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13486467/)
- 253.SLESACK, I., LIBIK, M., KARPINSKA, B., KARPINSKI, S., MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. In: *Acta Biochim Pol.* 2007, vol. 54, nr 1, pp. 39-50. ISSN 1734-154X. Disponibil: http://www.actabp.pl/pdf/1_2007/39s.pdf
- 254.SOARES, G.A. Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). Dissertação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003, 90 p. Disponibil: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_%207054200700060001500028&lng=en
- 255.SONG, X.S., TIAO, C.L., SHI, K. et al. The Response of Antioxidant Enzymes in Cellular Organelles in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Leaves to Methyl Viologen-induced Photo-oxidative Stress. In: *Plant Growth Regul.* 2006, vol. 49, nr 1, pp. 85-93. ISSN 1573-5087. Disponibil: [DOI: 10.1007/s10725-006-0023-5](https://doi.org/10.1007/s10725-006-0023-5)
- 256.STEWARD, F.C., MAPES, M.O., & MEARS, K. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany.* 1958, vol. 45, nr 10, pp. 705-708. ISSN 1537-2197. Disponibil: [DOI: 10.2307/2439728](https://doi.org/10.2307/2439728)
- 257.STONE, M., WILLIAMS, D. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). In: *Mol Microbiol.* 1992, vol. 6, nr 1, pp. 29-34. ISSN 1365-2958. Disponibil: [DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00834.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00834.x)
- 258.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
- 259.SUN, C., WANG, Z., ZHENG, Q., ZHANG, H. Salidroside inhibits migration and invasion of human fibrosarcoma HT1080 cells. In: *Phytomedicine.* 2012, vol. 19, nr 3–4, pp. 355–363. ISSN 0944-7113. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.phymed.2011.09.070](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.09.070)
- 260.SUNG, D.Y., KAPLAN, F., LEE, K.J., and GUY, C. L. Acquired tolerance to temperature extremes. In: *Trends in Plant Science.* 2003, vol. 8, nr. 4, pp. 179–187. ISSN 1360-1385. Disponibil: [DOI: 10.1016/S1360-1385\(03\)00047-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00047-5)
- 261.TASHEVA, K., KOSTURKOVA, G. Bulgarian golden root *in vitro* cultures for micropropagation and reintroduction. In: *Cent Eur J Biol.* 2010, vol. 5, nr 6, pp. 853–863. ISSN1644-3632. Disponibil: [DOI: 10.2478/s11535-010-0092-3](https://doi.org/10.2478/s11535-010-0092-3)

262. TASHEVA, K., KOSTURKOVA, G. Establishment of callus cultures of *Rhodiola rosea* Bulgarian ecotype. In: *Acta Horticulture*. 2012a, vol. 955, pp. 129-136. ISSN 0567-7572. Disponibil: [DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.955.17](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.955.17).
263. TASHEVA, K., KOSTURKOVA, G. The effect of sucrose concentration on *in vitro* callogenesis of golden root-endangered medicinal plant. In: *Sci Bull. Ser F Biotechnol*. 2014, vol. 18, pp. 77–82. ISSN 2285-1364. Disponibil: <http://biotechnologyjournal.usamv.ro/pdf/2014/Art13.pdf>
264. TASHEVA, K., KATEROVA, Z., KOSTURKOVA, G. The effect of UV irradiation on *in vitro* cultures development of golden root – endangered medicinal plant. In: *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. 2015, vol. 19, pp. 70-75. ISSN 2285-1364. Disponibil: <http://biotechnologyjournal.usamv.ro/pdf/2015/vol2015.pdf>
265. TAYLOR, L.P., GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. In: *Curr. Opin. Plant Biol*. 2005, vol. 8, nr 3, pp. 317–323. ISSN 1369-5266. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.pbi.2005.03.005](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.005)
266. THOLL, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015, vol. 148, pp. 63-106. ISSN 0724-6145. Disponibil: [DOI: 10.1007/10_2014_295](https://doi.org/10.1007/10_2014_295)
267. TIAN, M., GU, Q., ZHU, M. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. In: *Plant Sc*. 2003, vol. 165, nr 4, pp. 701-707. ISSN 0168-9452. Disponibil: [DOI: 1016/S0168-9452\(03\)00224-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00224-3)
268. TICHA, I., CAP, F., PACOVSKA, D., HOFMAN, P., HAISEL, D., CAPKOVA, V. and SCHAFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and light resistance of plantlets grown *in vitro*. In: *Physiologia Plantarum*. 1998, vol. 102, nr 2, pp. 155–162. ISSN 1399-3054. Disponibil: [DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1020201.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1020201.x)
269. TISI, A., FEDERICO, R., MORENO, S., LUCRETTI, S., MOSCHOU, PN., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, KA., ANGELINI, R., CONA, A. Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. In: *Plant Physiol*. 2011, vol. 157, nr 1, pp. 200-215. ISSN 1532-2548. Disponibil: [DOI: 10.1104/pp.111.173153](https://doi.org/10.1104/pp.111.173153)
270. TODOROVA, M., EVSTATIEVA, L., PLATIKANOV, ST., KULEVA, L. Chemical composition of the essential oil from Bulgarian *R. rosea* L. rhizomes. In: *J Essent Oil Bearing Plants*. 2006, vol. 9, nr 3, pp. 267–271. ISSN 0976-5026. Disponibili: [DOI: 10.1080/0972060X.2018.1500182](https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1500182)
271. TOLONEN, A., PAKONEN, M., HOHTOLA, A., JALONEN J. Phenylpropanoid glycosides from *Rhodiola rosea*. In: *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2003, vol. 51, nr 4, pp. 467-470. ISSN 1347-5223. Disponibil: [DOI: 10.1248/cpb.51.467](https://doi.org/10.1248/cpb.51.467)

272. 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)
273. TORRENS-SPENCE, M.P., PLUSKAL, T., LI, F.-S., CARBALLO, V. & WENG, J.-K. Complete Pathway Elucidation and Heterologous Reconstitution of *Rhodiola* Salidroside Biosynthesis. In: *Mol. Plant*. 2018, vol. 11, nr 1, pp. 205–217. ISSN 1674-2052. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.molp.2017.12.007](https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.007)
274. UMACIYA, TARIQ, MOHAMMAD A., BILAL H. A. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014, vol. 130, pp. 264-271. ISSN 1011-1344. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.11.026](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.11.026)
275. VANDER PLAS, L.H.W., EIJKELBOOM, C., HAGENDOORN, M.J.M. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions- competition between secondary metabolite production and growth in a model system (*Morinda citrifolia*). In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1995, vol. 43, nr 2, pp. 111-116. ISSN 1573-5044. Disponibil: [DOI: 10.1007/BF00052164](https://doi.org/10.1007/BF00052164)
276. VERMA, N., SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. In: *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2015, vol. 2, nr 4, pp. 105–113. ISSN 2214-7861. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002)
277. VERPOORTE, R., CONTIN, A., and MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. In: *Phytochem. Rev.* 2002, vol. 1, nr 1, pp. 13-25. ISSN 1572-980X. Disponibil: [DOI: 10.1023/A:1015871916833](https://doi.org/10.1023/A:1015871916833)
278. VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. In: *Mol. Plant*. 2010, vol. 3, nr 1, pp. 2–20. ISSN 1674-2052. Disponibil: [DOI: 10.1093/mp/ssp106](https://doi.org/10.1093/mp/ssp106)
279. VRANOVA, E., COMAN, D., GRUISSEM, W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. In: *Mol Plant*. 2012, vol. 5, pp. 318–333. ISSN 1674-2052. Disponibil: [DOI: 10.1093/mp/sss015](https://doi.org/10.1093/mp/sss015)
280. WALLAART, TE., PRAS, N., BEEKMAN, AC., QUAX, WJ. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. In: *Planta Med.* 2000, vol. 66, nr 1, pp. 57-62. ISSN 0032-0943. Disponibil: [DOI: 10.1055/s-2000-11115](https://doi.org/10.1055/s-2000-11115)
281. WANG J, RONG X, LI W, YANG Y, YAMAHARA J, LI Y. *Rhodiola crenulata* root ameliorates derangements of glucose and lipid metabolism in a rat model of the metabolic syndrome and type 2 diabetes. In: *J Ethnopharmacol.* 2012, vol. 142, nr 3, pp. 782–8. ISSN 0378-8741. Disponibil: [DOI:10.1016/j.jep.2012.05.063](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.063)

282. WEGLARZ, Z., PRZYBYŁ, J., GESZPRYCH, A. Roseroot (*Rhodiola rosea* L.): effect of internal and external factors on accumulation of biologically active compounds. In: *Ramawat K, Merillon J (eds) Bioactive molecules and medicinal plants*. Springer, Berlin Heidelberg. 2008, pp. 297–315. Online ISBN 978-3-540-74603-4. Disponibil: [DOI: 10.1007/978-3-540-74603-4_16](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4_16)
283. WEINBERG, E.D. Secondary Metabolism: Raison d’etre. In: *Perspectives in Biology and Medicine*. 1971, vol. 14, nr 4, pp. 565-77. Online ISSN 1529-8795. Disponibil: [DOI: 10.1353/pbm.1971.0033](https://doi.org/10.1353/pbm.1971.0033)
284. WENG, J. The evolutionary paths towards complexity: a metabolic perspective. In: *New Phytol.* 2013, vol. 201, pp. 1141-1149. ISSN: 1469-8137. Disponibil: [DOI: 10.1111/nph.12416](https://doi.org/10.1111/nph.12416)
285. WIEDENFELD, H., et.al. Phytochemical and analytical studies of extracts from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola quadrifida*. In: *Pharmazie*. 2007, vol. 62, nr 4, pp. 308-311. ISSN 0031-7144. Disponibil: [DOI: 10.1691/ph.2007.4.6664](https://doi.org/10.1691/ph.2007.4.6664)
286. 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. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001)
287. WINK, M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. In: *Annual Plant Reviews, 2nd edn* (ed. M.Wink), Blackwell, Oxford, 2010, Vol. 40, 464 p. Online ISBN 978-1-405-18397-0. Disponibil: [DOI: 10.1002/9781444320503](https://doi.org/10.1002/9781444320503)
288. WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. In: *Medicines*. 2015, vol. 2, nr 3, pp. 251–286. ISSN 2305-6320. Disponibil: [DOI: 10.3390/medicines2030251](https://doi.org/10.3390/medicines2030251)
289. WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002, vol. 5, nr 3, pp. 218–223. ISSN 1369-5266. Disponibil: [DOI: 10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
290. XIN, T., LI, X., YAO, H., LIN, Y., MA, X., CHENG, R., SONG, J., NI, L., FAN, C., CHEN, S. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues. In: *Sci Rep.* 2015, vol. 5, 8337. ISSN 2045-2322. Disponibil: [DOI: 10.1038/srep08337](https://doi.org/10.1038/srep08337)
291. XU, JF., LIU, CB., HAN, AM., FENG, PS., SU, ZG. Strategies for the improvement of salidroside production in cell suspension cultures of *Rhodiola sachalinensis*. In: *Plant Cell Rep.* 1998b, vol. 17, nr 4, pp. 288–293. ISSN 1432-203X. Disponibil [DOI: 10.1007/s002990050394](https://doi.org/10.1007/s002990050394)
292. XU, F., CHENG, S. Effects of 5-Aminolevulinic Acid on Chlorophyll, Photosynthesis, Soluble Sugar and Flavonoids of *Ginkgo biloba*. In: *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*

- Cluj Napoca. 2011, vol. 39. nr 1, pp. 41-47. ISSN 1842-4309. Disponibil: [DOI: 10.15835/nbha3915880](https://doi.org/10.15835/nbha3915880)
293. YAZAKI, K., SUGIYAMA, A., MORITA, M. et al. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. In: *Phytochem. Reviews*. 2008, vol. 7, nr 3, pp. 513–524. ISSN 1572-980X. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11101-007-9079-8](https://doi.org/10.1007/s11101-007-9079-8)
294. YAZDANI, D., TAN, Y., ZAINAL, A., JAGANATH, I. A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi. In: *J Med Plants Res*. 2011, vol. 5, nr 30, pp. 6584-6589. ISSN 1996-0875. Disponibil: [DOI: 10.5897/JMPR11.485](https://doi.org/10.5897/JMPR11.485)
295. YIN, W.B., LI, W., DU, G.S., HUANG, Q.N. Studies on tissue culture of Tibetan *Rhodiola rosea*. In: *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2004, nr 8, pp. 1506-1510. ISSN 1000-4025.
296. YIN, L., LAN, Y., & ZHU, L. Analysis of the protein expression profiling during rice callus differentiation under different plant hormone conditions. In: *Plant Molecular Biology*. 2008, vol. 68, nr 6, pp. 597–617. ISSN 1573-5028. Disponibil: [DOI: 10.1007/s11103-008-9395-4](https://doi.org/10.1007/s11103-008-9395-4)
297. YORUK, R., MARSHALL, M.R. Phyzycochemical 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)
298. YU, HS., MA, LQ., ZHANG, JX., SHI, GL., HU, YH., WANG, YN. Characterization of glucosyltransferases responsible for salidroside biosynthesis in *Rhodiola sachalinensis*. In: *Phytochemistry*. 2011, vol. 72, nr 9, pp. 862–870. ISSN 1873-3700. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.03.020](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.03.020)
299. ZAGOSKINA, NV., DUBRAVINA, GA., ALYAVINA, AK., GONCHARUK, EA. Effect of ultraviolet (UV-B) radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant callus cultures. In: *Russian Journal of n Plant Physiology*. 2003, vol. 50, nr 2, pp. 270–275. ISSN 1608-3407. Disponibil: [DOI: 10.1023/A:1022945819389](https://doi.org/10.1023/A:1022945819389)
300. ZHANG, W., ZHANG, L., DONG, F., GAO, J., GALBRAITH, D.W. & SONG, C.P. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. In: *Plant Physiology*. 2001, vol. 126, pp. 1438–1448. ISSN 1532-2548. Disponibil: [DOI: 10.1104/pp.126.4.1438](https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1438)
301. ZUCCHINI, M., & AGAZIO, M. Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. In: *Plant Physiol Biochem*. 2004, vol. 42, nr 5, pp. 445-450. ISSN 0981-9428. Disponibil: [DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.03.007](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.007)

302. ZWACK, P.J., and RASHOTTE, A.M. Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. In: *J. Exp. Bot.* 2015, vol. 66, pp. 4863–4871. ISSN 1460-2431. Disponibil: [DOI: 10.1093/jxb/erv172](https://doi.org/10.1093/jxb/erv172)
303. ZWENGER, S., and BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. In: *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2008, vol. 3, nr 1, pp. 1–7. ISSN 1538-2273. Disponibil: <http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1381413468>
304. БИКМЕТОВА, М.М., БАЙБУРИНА, Р.К. Размножение *in vitro* родиолы розовой. В: *Генетика, селекция и биотехнология лесных древесных и лекарственных растений*. 1993, сс. 97-100. ISSN 2222-7962.
305. ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАКОПЕЯ. 11 издание, 2 выпуск. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. Изд-во М. Медицина. 1990, 196 с. ISBN 5-225-00382-6. Disponibil: <http://www.fptl.ru/biblioteka/farmacop/gf11-2.pdf>
306. ГРОДЗИНСКИЙ, Д.М. Радиобиология растений - Киев : Наук. думка, 1989. - 379,[1] с. ISBN 5-12-001077-6.
307. ДАСКАЛЮК, А.П., ТОМА, О.К. Стратификация семян растений: попытка к оценке состояния перспективы. В: *Физиология и биохимия культурных растений*. 1994, Т. 26, №1, сс. 11-22. ISSN 0522-9310.
308. ДУБИЧЕВ, А.Г., КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ВОРОНЦОВ, Е.Д. Изучение химического состава корневищ *Rhodiola rosea* методом ВЭЖХ. В: *Химия природных соединений*. 1991, Т. 2, сс. 188-193. ISSN 0023-1150.
309. ЗАВОРУЕВА, Е.Н., УШАКОВА, С.А. Оценка термоустойчивости растений при разных уровнях освещенности методами медленной индукции флуоресценции хлорофилла и СО₂-газообмена. В: *Физиология растений*. 2004, Т. 51, № 3. сс. 333-340. ISSN 0015-3303.
310. 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.
311. ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., КУРКИН, В.А. Флавоноиды корневищ *Rhodiola rosea*. II. Флавонолигнан и гликозиды гербацетина. В: *Химия природных соединений*. 1983, Т. 1, сс. 23-32. ISSN 0023-1150.
312. ИШМУРАТОВА, М.М. Клональное микроразмножение *Rhodiola rosea* L. и *R. iremelica* Boriss. *in vitro*. In: *Раст.ресурсы*. 1998, Т. 34, вып.1, сс. 12-23. ISSN 0033-9946.
313. ИШМУРАТОВА, М.М., САЦЫПЕРОВА, И.Ф. Начальные этапы онтогенеза и некоторые биологические особенности развития *Rhodiola rosea* L. и *R. iremelica* Boriss., интродуцированных в Башкирию. В: *Раст.ресурсы*. 1998, Т. 34, вып.1, сс. 3-11. ISSN 0033-9946.

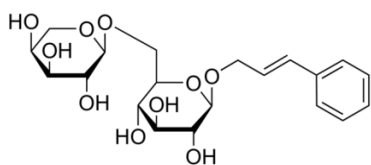
- 314.КИРЬЯНОВ, А.А., БОНДАРЕНКО, Л.Т., КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г. Определение розавидина в корневищах Родиолы розовой. В: *Химико-фармацевтический журнал*. 1988, Т. 11, сс. 451-455. ISSN 0023-1134.
- 315.КИРЬЯНОВ, А.А., БОНДАРЕНКО, Л.Т., КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ДУБИЧЕВ, А.Г., ВОРОНЦОВ, Е.Д. Определение биологически активных компонентов корневищ *Rhodiola rosea*. В: *Химия природных соединений*. 1991, Т. 3, сс. 320-323. ISSN 0023-1150.
- 316.КУРЕНКОВА, С.В. Пигментная система культурных растений в условиях подзоны средней тайги Европейского северо-востока. Екатеринбург: УрО РАН, 1998, 115 с. УДК 633 (635 : 58). 132.1 (470.1).
- 317.КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г. КЛЕЗНИНА, В.Г. Флавоноиды корневищ *Rhodiola rosea*. I. Глюкозиды трицына. В: *Химия природных соединений*. 1982, Т. 5, сс. 581-584. ISSN 0023-1150.
- 318.КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ЩАВЛИНСКИЙ, А.Н. III Флавоноиды корневищ *Rhodiola rosea*. В: *Химия природных соединений*. 1984, Т. 3, сс. 390-391. ISSN 0023-1150.
- 319.КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ЩАВЛИНСКИЙ, А.Н. Флавоноиды надземной части *Rhodiola rosea*. II. Строение новых гликозидов гербацетина и госсинетина. В: *Химия природных соединений*. 1985, Т. 4, сс. 496-507. ISSN 0023-1150.
- 320.КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ЩАВЛИНСКИЙ, А.Н. Терпеноиды корневищ *Rhodiola rosea*. In: *Химия природных соединений*. 1985, Т. 5, сс. 632-636. ISSN 0023-1150.
- 321.КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ЩАВЛИНСКИЙ, А.Н., НУХИМОВСКИЙ, Е.Л., ВАИДЫШЕВ, В.В. Методы определения подлинности и качества корневищ родиолы розовой. В: *Химико-фармацевтический журнал*. 1985, Т. 19, № 3, сс.185-190. ISSN 0023-1134.
- 322.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.
- 323.КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ГОРБУНОВ, Ю.В., НУХИМОВСКИЙ, Е.Л., ШРЕТЕР, А.И., ЩАВЛИНСКИЙ, А.Н. Химическое исследование некоторых видов родов *Rhodiola* L. и *Sedum* L. и вопросы их хемосистематики. В: *Растительные ресурсы*. 1986, Т. 22, №3, сс. 310-319. ISSN 0033-9946.
- 324.КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., КИРЬЯНОВ, А.А., БОНДАРЕНКО, Л.Т., ВАНДЫШЕВ, В.В., МАЙНСКОВ, А.В., НУХИМОВСКИЙ, Е.Л., КЛИМАХИН, Г.И. О

- качестве сырья родиолы розовой. В: *Химико-фармацевтический журнал*. 1989, Т. 23, № 11. сс.1364-1367. ISSN 0023-1134.
325. КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ДУБИЧЕВ, А.Г., ВОРОНЦОВ, Е.Д., АЛЕКСАНДРОВА, И.В., ПАНОВА, Р.В. Фенилпропаноиды каллусной культуры *Rhodiola rosea*. В: *Химия природных соединений*. 1991, Т. 4. сс. 481-489. ISSN 0023-1150.
326. КУРКИН, В.А. Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов: монография. - Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, 2015. 240 с. УДК 615.32.
327. КЭЛУГЭРУ-СПЭТАРУ, Т.Н. Физиологические проблемы интродукции золотого корня (*Rhodiola rosea* L.) в республике Молдова. В: *VII Съезд Общества физиологов растений России, "Физиология растений – фундаментальная основа экологии инновационных биотехнологий" и Международная научная школа "Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции"*, Нижний Новгород, 2011, сс. 400-401. УДК 581.9. Disponibil: http://www.spsl.nsc.ru/fulltext/konfe/VIIfiz-plant_2.pdf
328. ПОЧИНОК, Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976, 334 с. УДК 584.19.
329. САРАТИКОВ, А.С. Родиола розовая – ценное лекарственное растение: золотой корень. А.С. Саратиков, Е.А. Краснов. – Томск, 1987, 254 с. УДК 582 : 715 : 633.88.
330. СТЕПАНОВА, Э.Ф., ШИРЗАД, Б., ЕВСЕЕВА, С.Б. Родиола розовая: Состояние исследований и возможности создания Космецевтических и Дерматологических средств. В: *Фармация и фармакология*. 2016, Т. 4 (5), сс. 36-62. ISSN: 2307-9266 Disponibil: [DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-5-36-62](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2016-4-5-36-62)
331. ТРОЩЕНКО, А.Т., КУТИКОВА, Г.А. Родиолозид из *Rhodiola roseum* и *Rh. Quadrifida*. В: *Химия природных соединений*. 1974, Т. 4, сс. 244-249. ISSN 0023-1150.
332. ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ (ФС).2.5.0036.15 Родиолы розовой корневища и корни. Disponibil: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/1211/index.html
333. ХЕЙНТАЛУ, А. Биология и агротехника родиолы, рапонтика и анзура в Эстонии. – Таллин, 2000. ISBN 9985-60-786-4.

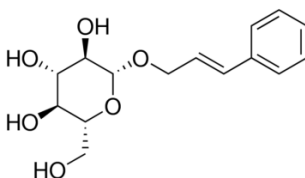
ANEXE

Anexa 1. Structura chimică a celor mai importanți MS caracteristici pentru rizomii de *R. rosea*.

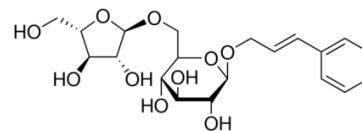
Fenilpropanoidele



Rosavin

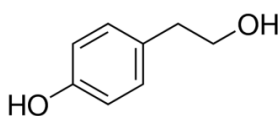


Rosin

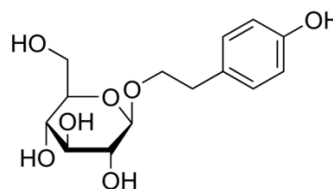


Rosarin

Derivații feniletanolului

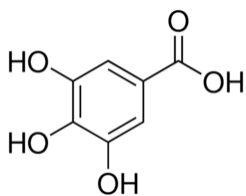


p – Tirosol (aglicon)

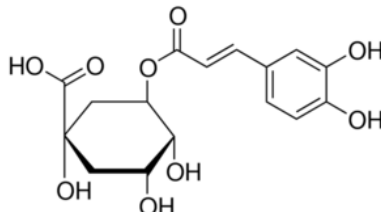


Salidrozin (glicozid)

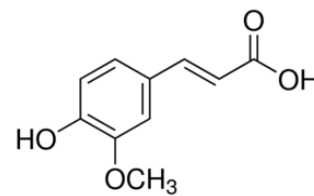
Acizii hidroxicinamici și fenolici



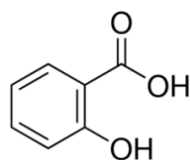
Acid galic



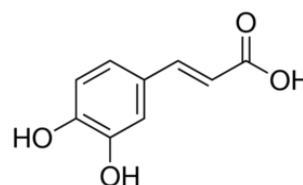
Acid clorogenic



Acid ferulic



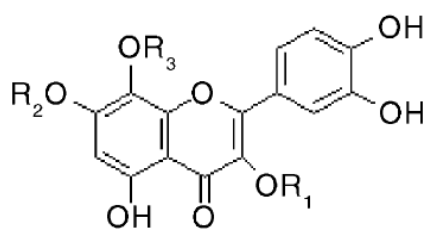
Acid salicilic



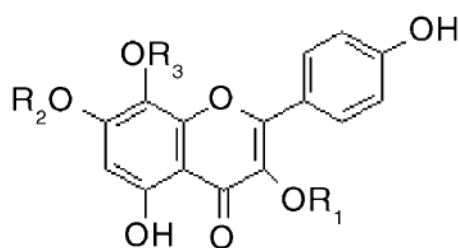
Acid cafeic

Fig. A1.1. Structura chimică a celor mai importante fenilpropanoide, feniletanoloide, acizi hidroxicinamici și fenolici caracteristici pentru rizomii de *R. rosea*.

Anexa 2. Structura chimică a celor mai importante flavonoide, monoterpene și compuși volatili caracteristici pentru rizomii de *R. rosea*.



R₁ - H, R₂ - Ra, R₃ - Glu - Rhodiolidin
R₁, R₃ - H, R₂ - Ra - Rhodiolidin



R₁ - Glu, R₂ - H, R₃ - Xilo - Rhodalidin
R₁ - H, R₂ - Ra, R₃ - Glu - Rhodionidin
R₁, R₃ - H, R₂ - Ra - Rhodionin

Fig. A2.1. Structura chimică a celor mai importante flavonoide caracteristice pentru rizomii de *R. rosea*.

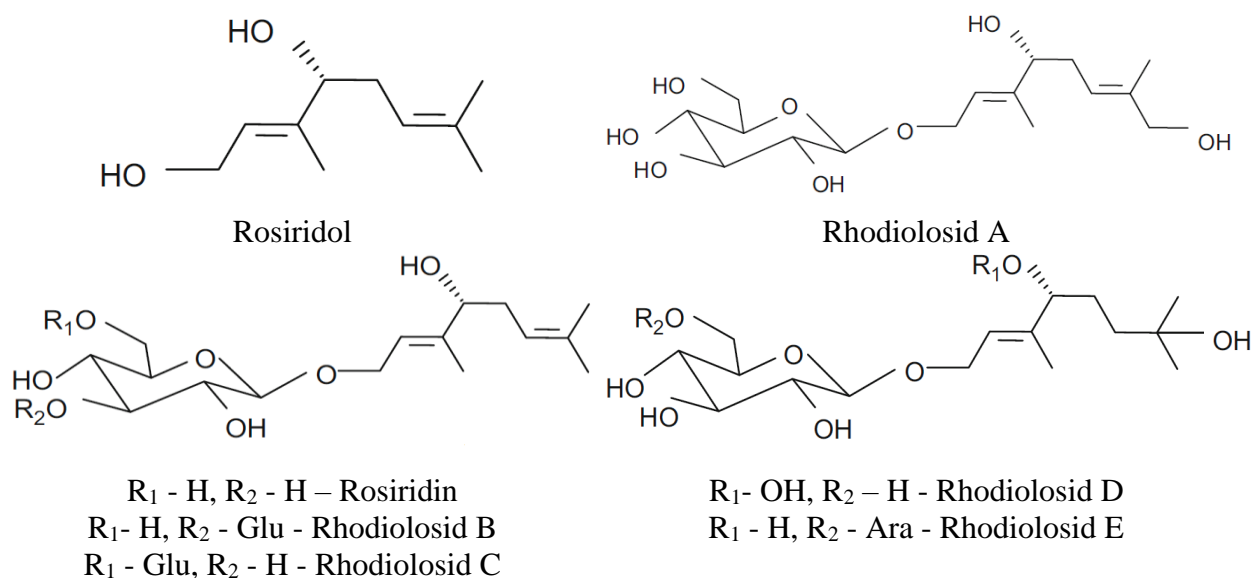


Fig. A2.2. Structura chimică a celor mai importante monoterpene caracteristice pentru rizomii de *R. rosea*.

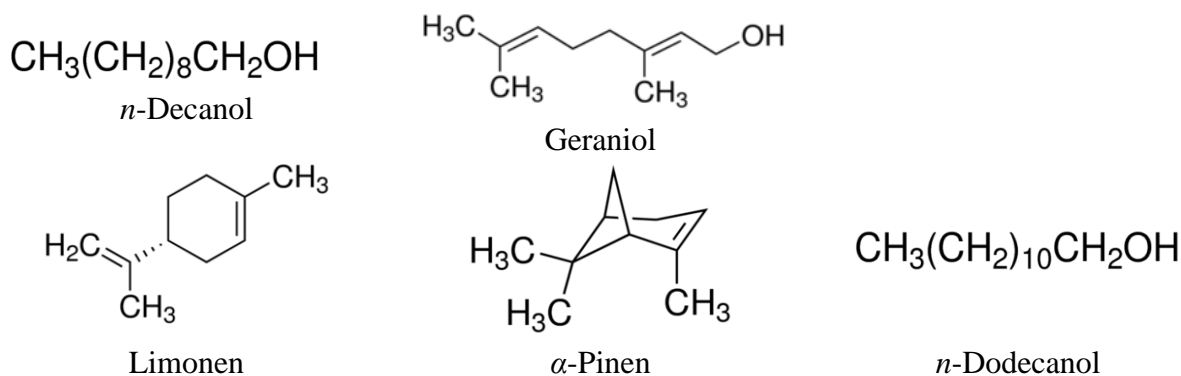


Fig. A2.3. Structura chimică a celor mai importanți compuși volatili caracteristici pentru rizomii de *R. rosea*.

Anexa 3. Imaginea semințelor germinate și a plantulelor de *R. rosea* obținute în condiții *in vivo* și *in vitro*.

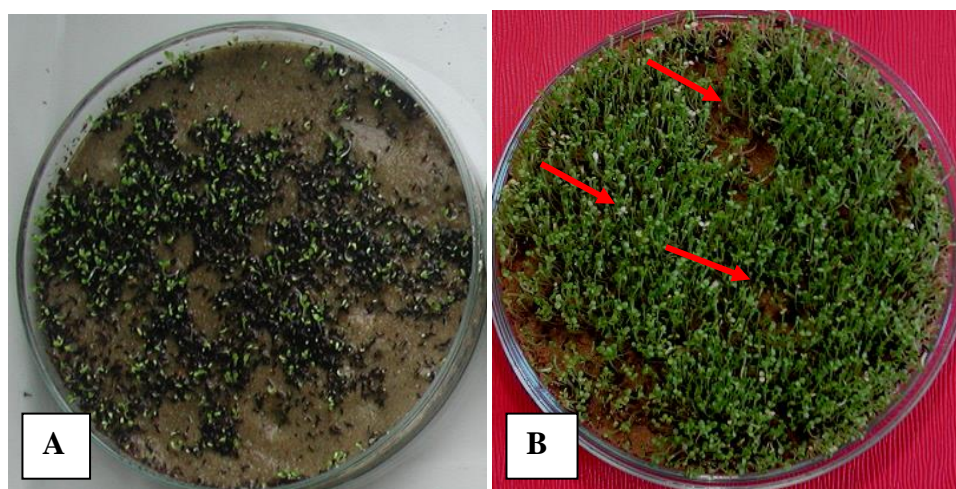


Fig. A3.1. Imaginea semințelor germinate în ziua a 21-a de stratificare (A) și a plantulelor de *R. rosea* în ziua a 7-a de cultivare suplimentară în termostat (B).

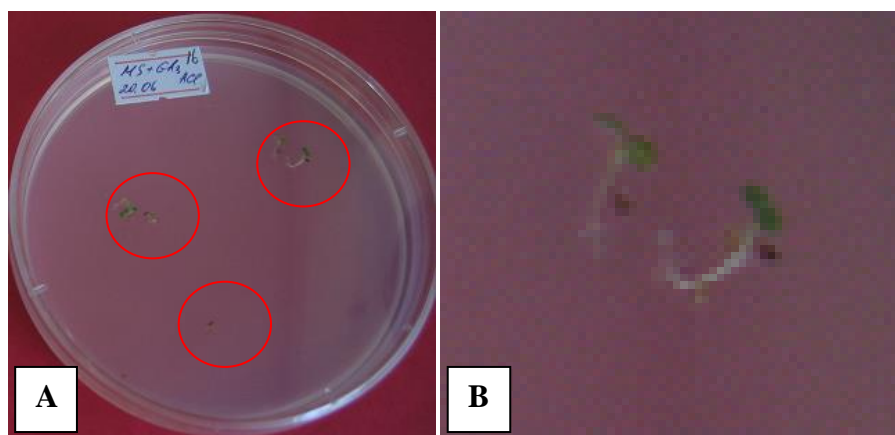


Fig. A3.2. Imaginea plantulelor de *R. rosea* obținute în condiții sterile din semințe (A) – imagine obișnuită; B – imagine mărită de 4 ori.

Anexa 4. Curbe de calibrare.

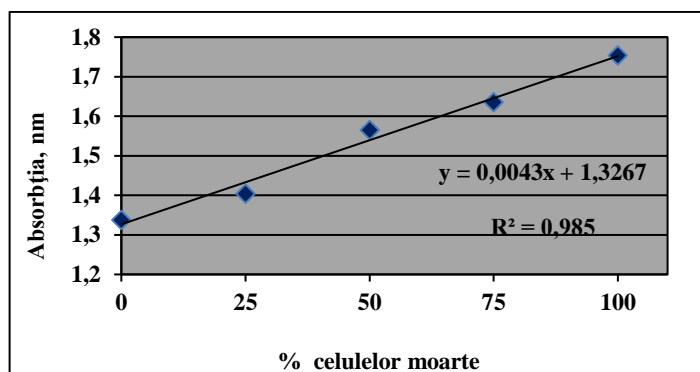


Fig. A4.1. Curba de calibrare a conținutului celulelor moarte în cultura calusului de *R. rosea* determinată cu ajutorul spectrofotometriei UV-VIS.

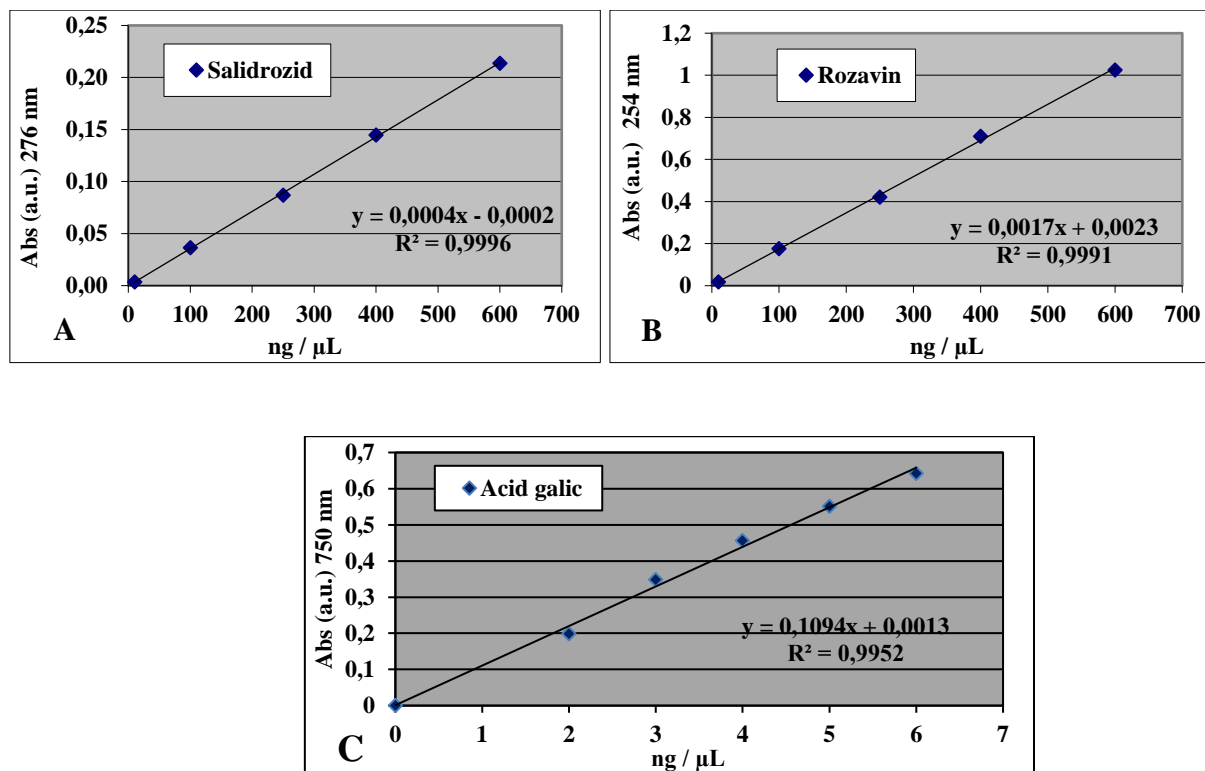


Fig. A4.2. Curbele de calibrare ale compușilor standard: salidroside (A), rosavin (B) și acid galic (C) construite în baza absorbției determinate cu ajutorul spectrofotometriei UV-VIS.

Anexa 5. Conținutul de salidrozin și rosavin în rizomii de *R. rosea* colectați în diferite regiuni geografice.

Tabelul A5.1. Conținutul de salidrozin și rosavin în rizomii de *R. rosea* colectați în diferite regiuni geografice (% din masa uscată).

Țara	Salidrozin, %	Rosavin, %	Referința
Rusia, Altai	0,2-1,5	0,05-0,1	322, 329
Rusia, Ural	1,31	2,39	103
Ucraina, Transcarpatia	1,2	2,5	322
Finlanda	0,63	1,36	103
China	0,13-1,11	0,8	103
Mongolia, Altai	0,14	1,9- 4,2	103
Polonia	0,13-1,9	2,8	221, 282
Bulgaria	0,4-2,0	1,6-2,8	88, 217

Anexa 6. Testarea organoleptică a uleiului volatil din rizomii de *R. rosea*.

Moldova 2069 Chişinău, str. Mesager 1
tel. (3732) 74-89-50 fax (3732) 74-26-86
cont de decontare 2251104011191
AKB "Moldova-Agroindbank" filiala "Miron Costin"
cod 280101710
c/f 207950 cod TVA 0500362



Молдова 2069 Кишинэу, ул. Месаджер 1
тел. (3732) 74-89-50 факс (3732) 74-26-86
р.с. 2251104011191
АКБ "Молдова-Агроиндбанк" филиал "Мирон Костин"
МФО 280101710
ф. код 207950 код НДС 0500362

VIORICA-COSMETIC S.A.

Nr. 05-01-04/300
"01" 08 2005

Directorului Institutului de
Fiziologie a plantelor AŞRM
D-ul Tudorache Gheorghe

În răspuns la solicitarea dv-astră de a determina nota parfumerică a probei de ulei volatil obținut din rizomii de *Rhodiola rosea* L. extras de studenta Matei Lilia vă anunțăm că la testarea mirosului probei date de către Consiliul de degustare de la S.A. "Viorica-Cosmetic" el a primit nota 4,8.

Şeful-adjunct
pe probleme științifice

E. Vorobiova

Parfumerul principal

L. Guțul

01.08.05

Anexa 7. Plantele de *R. rosea* la al 3-a an de cultivare în condiții de câmp, Rezervația Științifică “Plaiul Fagului”.



Fig. A7.1. Plantele de *R. rosea* la al 3-a an de cultivare în condiții de câmp, Rezervația Științifică “Plaiul Fagului”.

Anexa 8. Imaginile calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* cultivate pe mediul nutritiv Murashige-Skoog solid și lichid

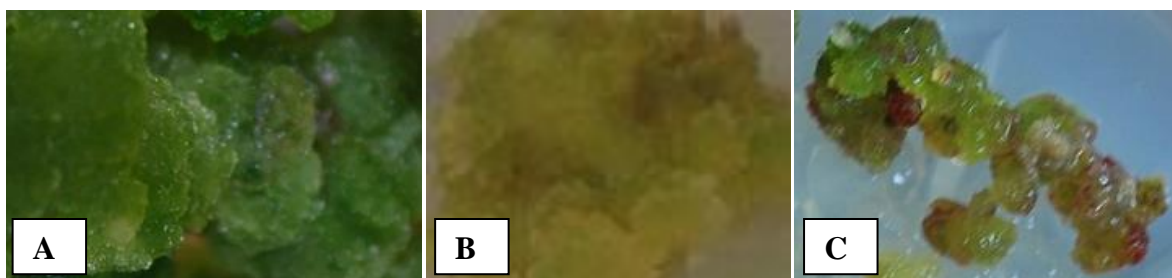


Fig. A8.1. Imaginile calusului de *R. rosea* în vârstă de 40 zile cultivat pe mediul nutritiv Murashige-Skoog solid (A – varianta 1), (B – varianta 5), (C – varianta 3).

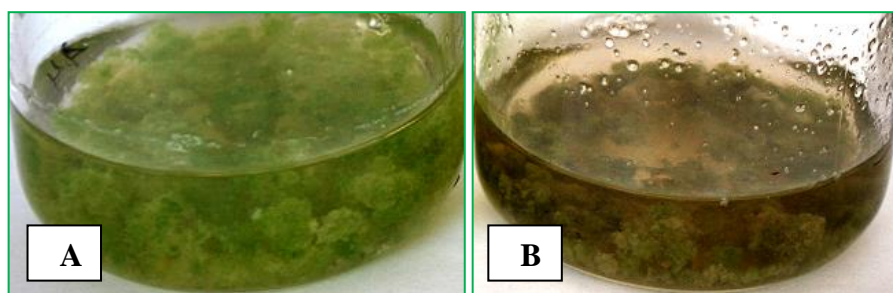


Fig. A8.2. Imaginile agregatelor celulare de *R. rosea* în vârstă de 22 zile cultivate pe mediul nutritiv Murashige-Skoog lichid (A – varianta 1), (A – varianta 2).

Anexa 9. Imaginile calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* expuse diferitor factori fizici.

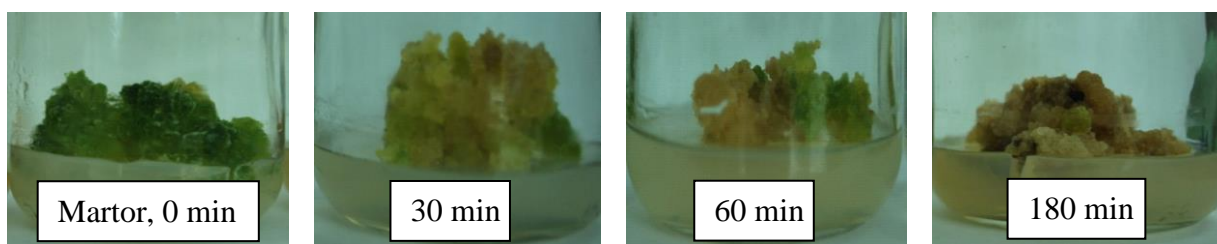


Fig. A9.1. Imaginile diferitor variante ale calusului de *R. rosea* în ziua 30-a de cultivare, care a fost tratat cu UV-B pe parcursul a 0 (martor), 30, 60 și 180 min începând cu ziua a 12-a după inoculare.



Fig. A9.2. Imagini ale calusului de *R. rosea* expus șocului cu temperaturi negative (-8°C, -12°C și -14°C) pe parcursul a 8 ore la a 20-a zi de cultivare și menținut ulterior 20 zile la temperatura de + 26°C.



Fig. A9.3. Imagini ale agregatelor celulare de *R. rosea* expuse șocului cu temperaturi negative (-8°C, -12°C, -14°C și -16°C) pe parcursul a 8 ore la a 12-a zi de cultivare și menținute ulterior 8 zile la temperatura + 26°C.

Anexa 10. Imaginile culturii agregatelor celulare de *R. rosea*.



Fig. A10.1. Imaginea culturii agregatelor celulare de *R. rosea* în mediul nutritiv lichid cultivate pe giratoriu.

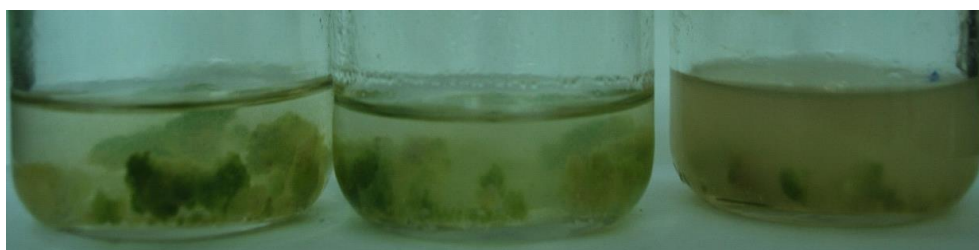


Fig. A10.2. Agregatele celulare de *R. rosea* cultivate pe mediul nutritiv lichid ce conține alcool cinamic în concentrație de 4 mM. De la stânga la dreapta vase în ziua a 13, 17 și 20 de cultivare.

Anexa 11. Brevet de invenție 3375.

Procedeu de micropropagare a plantelor de Rhodiola rosea L. in vitro.

Autori: CĂLUCĂRU-SPATARU Tatiana, DELEAN Tatiana, DASCALIUC Alexandru



MD 3375 G2 2007.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



**(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală**

(11) 3375 (13) G2
(51) Int. Cl.: A01H 4/00 (2006.01)
A01H 5/04 (2006.01)
A01H 5/06 (2006.01)
A61K 36/41 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2007 0082 (22) Data depozit: 2007.03.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.08.31, BOPI nr. 8/2007
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CĂLUGĂRU Tatiana, MD; DELEAN Tatiana, MD; DASCALIUC Alexandru, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de micropropagare a plantelor de *Rhodiola rosea L. in vitro*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată pentru micropropagarea plantelor de *Rhodiola rosea L. in vitro*.

Procedeu include cultivarea minirizomilor și a explantelor de pe minirizomi, obținute din mugurii axilari pe mediul nutritiv agarizat Murashige-Skoog, ce conține suplimentar cărbune activat în cantitate de 1200 mg/l, având pH-ul 6,5, la o temperatură de

2
26°C și umiditatea relativă a aerului de 70% cu o fotoperioadă de 16 ore și intensitatea iluminării de 1000 lx.

5
Rezultatul invenției constă în sporirea coeficientului de multiplicare a plantelor de *Rhodiola rosea L.*, pe baza majorării intensității de formare a lăstarilor.

10
Revendicări: 1

MD 3375 G2 2007.08.31

Anexa 12. Brevet de invenție 894.

Procedeu de obținere a biomasei calusului de Rhodiola rosea L. in vitro.

Autori: CĂLUGĂRU-SPATARU Tatiana, CAUȘ Maria, DASCALIUC Alexandru

REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

Nr. 894

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

**Titlul: Procedeu de obținere a biomasei calusului de
Rhodiola rosea L. in vitro**

**Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI
PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

Data depozit: 2014.10.20

Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte
integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

Director General

CHISINAU



Anexa 13. Act de implementare a rezultatelor științifice



APROB:
Directorul Institutului de Genetică,
Fiziologie și Protecție a Plantelor

L. ANDRONIC

"4" octombrie 2019

ACT DE IMPLIMENTARE A REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE

Prin prezentul, se confirmă că cultura calusului de *Rhodiola rosea* L. în vârstă de 10 ani este menținută *in vitro* în cadrul laboratorului Biochimia Plantelor, fiind utilizată în realizarea mai multor proiecte de cercetare, inclusiv: **proiecte fundamentale** - „Influența proceselor de inițiere și reglare a transformărilor speciilor reactive de oxigen (SRO) asupra dezvoltării plantelor și rezistenței lor față de factorii de stres abiotic”, (2015 – 2019); „Elaborarea, determinarea proprietăților fizico-chimice și biologice a reglatorilor naturali de creștere și implementarea lor în tehnologiile agricole contemporane”, (2011 – 2014); **proiect de transfer tehnologic** - „Controlul creșterii calusului și acumulării metaboliților secundari *in vitro* la *Rhodiola rosea* L.”, (2009) și **proiect internațional moldo-rus** “Reglarea biosintezei metaboliților secundari în cultura celulelor și a plantelor *in vitro* și *in vivo* și aprecierea influenței acestor substanțe asupra reacțiilor fiziologice față de acțiunea factorilor abiotici (temperaturi extreme) și biotici (acțiunea paraziților)”, (2010).

Responsabil pentru menținerea și cultivarea culturii celulare de *R. rosea* L. în condițiile *in vitro* este cercetătorul științific Călugăru–Spătaru Tatiana.

Membrii Comisiei:

Șeful laboratorului Biochimia Plantelor, doctor habilitat,
prof. universitar, DASCALIUC Alexandru

Director adjunct pentru activitate științifică,
doctor, SMEREA Svetlana

Secretar științific
doctor, COTENCO Eugenia

Cercetător științific coordonator,
doctor, CAUȘ Maria

Cercetător științific,
CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana

Anexa 14. Act de valorificare a rezultatelor tezei de doctor

Ministerul Educației,
Culturii și Cercetării al Republicii Moldova
Universitatea de Stat "Dimitrie Cantemir"
str. Academiei 32, Chișinău, Republica Moldova, MD-2028
tel.: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md



Ministry of Education,
Culture and Research of the Republic of Moldova
"Dimitrie Cantemir" State University
32 Academiei str., Chisinau, MD-2028, Republic of Moldova
phone: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md

nr. 05/ser-188 din 25.10.2019

ACT DE VALORIFICARE a rezultatelor tezei de doctor în biochimie „Acumularea în vivo și in vitro a metaboliților secundari la specia *Rhodiola rosea* L. din populația carpatină”

Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir” confirmă valorificarea rezultatelor investigațiilor științifice la tema „Acumularea în vivo și in vitro a metaboliților secundari la specia *Rhodiola rosea* L. din populația carpatină” realizate de dna Tatiana CĂLUGĂRU-SPĂTARU, cercetător științific, în cadrul Laboratorului *Biochimia Plantelor* al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

Rezultatele studiului efectuat sunt utilizate în procesul didactic la Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, Facultatea *Științe fundamentale*, Departamentul *Chimie, Matematică și Informatică* la predarea cursurilor:

„Terpeni și terpenoide”, titular de curs dl profesor, doctor habilitat Nikon UNGUR, la ciclul II, studii de masterat, și

„Chimia produselor farmaceutice și cosmetice”, titular de curs dl doctor, conferențiar universitar Alexandru CIOCĂRLAN, la ciclul I, studii de licență.

Conferențiar universitar,
dr. Alexandru Ciocărlan

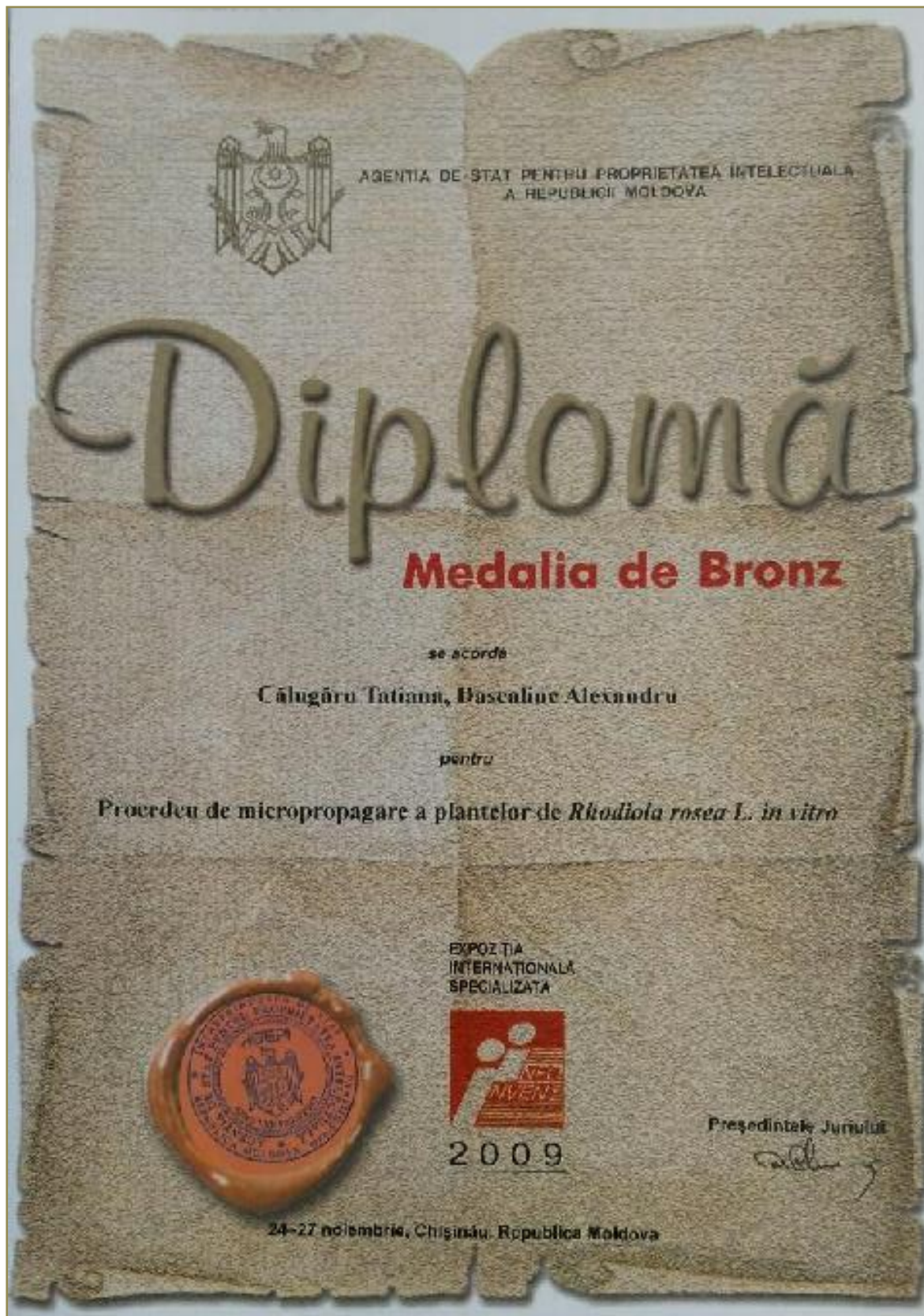
Profesor universitar,
dr. hab. Nikon Ungur

Șef departament Chimie,
Matematică și Informatică,
dr. Natalia Velișco

Prim-prorector,
Conferențiar universitar,
dr. Liliana Rotaru



Anexa 15. Diplomă pentru medalia de bronz - INFOINVENT 2009, CHIȘINĂU





Anexa 17. Diplomă pentru medalia de aur – INVENTICA 2016, IAȘI



Anexa 18. Diplomă pentru medalia de aur – PROINVENT- 2016, CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ-NAPOCA
sub egida MINISTERULUI EDUCAȚIEI NAȚIONALE ȘI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE
și ACADEMIEI DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

SALONUL INTERNAȚIONAL DE INVENTICĂ
PRO INVENT, Ediția a XIV-a, 2016, Cluj-Napoca, România

DIPLOMA
DE EXCELENȚĂ
ȘI MEDALIA DE AUR CU MENȚIUNE SPECIALĂ

Se acordă CĂLUGĂRU-SPĂTARU TATIANA, CAUȘ MARIA, DASCALIUC ALEXANDRU

De la INSTITUTUL DE GENETICA, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI

Pentru PROCEDEUL DE OBTINERE A BIOMASEI CALUSULUI DE RHODIOLA ROȘEA L. IN VITRO

PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. VASILE ȚOPA
Rector al
Universității Tehnice din Cluj-Napoca



PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU

Radu Munteanu

Diplomă pentru medalia de aur – EUROINVENT 2018, IAȘI



DIPLOMA
OF
GOLD MEDAL is awarded to:

Process for *in vitro* production of *Rhodiola rosea* L. callus biomass

Calugaru-Spataru Tatiana, Caus Maria, Dascaluc A.

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU

May 19, 2018




DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

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

CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana _____

CURRICULUM VITAE

CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana



Cetățenie: MD

Studii

2001 – 2004 **Institutul de Fiziologie al AȘM, studii doctorale**
1990 – 1995 **Universitatea de Stat din Tiraspol, facultatea biologie și chimie**
1980 – 1990 **Școala medie din or. Florești**

Stagii

2004 – prezent **cercetător științific, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor**
2001 – 2004 **doctorand, Institutul de Fiziologie al AȘM**
1995 – 2001 **lector asistent, Universitatea de Stat din Tiraspol (cu sediul la Chișinău)**
1995 – 2001 **laborant, Universitatea de Stat din Tiraspol (cu sediul la Chișinău)**

Competențe dobândite la locul de muncă

- Specialist în biochimie și biotehnologie;
- metode de reglare și analiză a biosintezei metaboliților secundari în cultura *in vitro*;
- tehnici de analiză electroforetică a spectrelor polipeptidice și enzimaticice;
- procedee de multiplicare clonală și menținere a genotipurilor valoroase;
- metode de obținere a culturilor de calus și regenerarea plantelor din celulele somatice a unor genotipuri prețioase și rare *in vitro*;
- inducerea și menținerea culturilor de calus și agregatelor celulare;
- regenerarea și aclimatizarea plantelor la transferul de la condiții de cultură *in vitro* la cele *in vivo* etc.

Proiecte

proiecte fundamentale:

- 2015 – 2019** • proiect **15.817.05.13A** - Influența proceselor de inițiere și reglare a transformărilor speciilor reactive de oxigen (*SRO*) asupra dezvoltării plantelor și rezistenței lor față de factorii de stres abiotic;
- 2011 – 2014** • proiect **11.817.04.06A** - Elaborarea, determinarea proprietăților fizico-chimice și biologice a reglatorilor naturali de creștere și implementarea lor în tehnologiile agricole contemporane;
- 2006 – 2010** • Rolul proteinelor de rezervă și chitenazelor în determinarea dormitării plantelor la boli și dăunători;
- 2005 – 2009** • Disecarea, maturarea, dormitarea și germinația semințelor: rolul proteinelor și altor factori.

proiecte de transfer tehnologic și aplicative:

- 2005 – 2009** • Controlul creșterii calusului și acumulării metaboliților secundari *in vitro* la *Rhodiola rosea* L.;

- 2003 – 2006** • Introducerea în cultura *in vitro* și obținerea embrioizilor somatici la stejarul pufos (*Quercus pubescens*);
- 2003 – 2005** • Elaborarea procedeeilor de micropropagare a nukulii (*Juglans regia* L.), la etapa: Inducerea embrioizilor somatici la *Juglans regia* L.
- proiecte internaționale:**
- 2010 – 2011** • proiectul STCU Nr. 5063 - Implementarea metodelor fizico-chimice din biologie în agricultura organică;
- 2008 – 2010** • proiect **moldo-rus** C-24 - Reglarea biosintezei metaboliților secundari în cultura celulelor și a plantelor *in vitro* și *in vivo* și aprecierea influenței acestor substanțe asupra reacțiilor fiziologice față de acțiunea factorilor abiotici (temperaturi extremale) și biotici (acțiunea paraziților);
- 2006 – 2007** • proiectul INTAS - Menținerea aparatului CTBA, suportul tinerilor savanți și a studenților;
- 2005 – 2008** • proiectul INTAS Nr. 05-104-7603 - Selecția și cultivarea *Rhodiola rosea* L. bazată pe metodele moleculare, fitochimice și fiziologice;
- 2004 – 2006** • proiectul CRDF MR2-996 - Elaborarea procedeeului și tehnologiei obținerii substanțelor native din plante și utilizarea lor în agricultură și medicină;
- 2003 – 2005** • proiectul CRDF MA1-3029 - Introducerea *Rhodiola rosea* L. în agricultura de producere a Moldovei.

Lucrări științifice publicate:

Rezultatele științifice sunt publicate în peste 50 lucrări științifice, inclusiv:

- 3 articole în diferite reviste științifice internaționale,
- 9 articole în reviste naționale de profil categoria B/C,
- 15 articole în culegeri științifice naționale/internaționale,
- 21 materiale/ teze la conferințe/simpozioane științifice internaționale (peste hotare) și în republică;
- 7 brevete de invenții.

Articole științifice în reviste internaționale

în reviste internaționale cotate ISI și SCOPUS

1. DASCALIUC A., CĂLUGĂRU-SPĂTARU T., CIOCĂRLAN, A., COSTICĂ M., COSTICĂ N., KRAJEWSKA-PATAN, A., DREGER M., MSCISZ A., FURMANOVA M. Chemical composition of golden root (*Rhodiola rosea* L.) rhizomes of Carpathian origin. *Herba Polonica*. 2008, vol. 54, nr 4, pp. 17-27. ISSN 0018-0599. http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/1687607-02_Chemical.pdf
2. 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”*. Seria Agronomie. 2013, vol. 56 nr 2, pp. 57-60. ISSN 1454-7414. [http://www.revagrois.ro/PDF/2013-2/paper/2013-56\(2\)_09-en.pdf](http://www.revagrois.ro/PDF/2013-2/paper/2013-56(2)_09-en.pdf)

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

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>
2. 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 AȘM. Științele vieții*. 2017, nr. 1 (333), pp. 39-47. ISSN 1857-064X. <http://bsl.asm.md/article/id/52247>
3. CĂLUGĂRU-SPĂTARU. T. Effects of Natural Growth Regulator *Reglalg* on the *Rhodiola rosea* L. callus growth rate. *Journal of Botany*, Chisinau, 2015, vol. VII, nr. 1(10), pp. 5-9. ISSN 1857-095X. http://www.gradinabotanica.asm.md/sites/default/files/revista_botanica2015.pdf
 4. CĂLUGĂRU-SPĂTARU T. Acumularea metaboliților secundari în *Rhodiola rosea* L. în funcție de condițiile mediului. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. nr 1(325) 2015, pp. 85-92. ISSN 1857-064X. <http://bsl.asm.md/article/id/37175>
 5. CAUȘ M., CĂLUGĂRU-SPĂTARU T., DASCALIUC A. Influența reglatorului 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>

Brevete de invenție

1. CĂLUCĂRU T., MALOCOC A., DELEAN T., DASCALIUC A. *Procedeu de micropropagare a plantelor de gerberă in vitro*. MD 3219 G2 2007.01.31.
2. CĂLUCĂRU-SPĂTARU T., DELEAN T., DASCALIUC A. *Procedeu de micropropagare a plantelor de Rhodiola rosea L. in vitro*. MD 3375 G2 2007.08.31.
3. CĂLUCĂRU-SPĂTARU T., DASCALIUC A. *Procedeu de micropropagare a plantelor de Actinidia arguta in vitro*. MD 605 2013.10.31.
4. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., CAUȘ, M., DASCALIUC, A. *Procedeu de obținere a biomasei calusului de Rhodiola rosea L. in vitro*. MD 894 2015.11.30.
5. CAUȘ, M., CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., DASCALIUC, A. *Procedeu de determinare a sexului la plantele de Actinidia arguta in vitro*. MD 1055 Z 2017.02.28.
6. CĂLUGĂRU-SPĂTARU T., CIOCĂRLAN N., CAUȘ M., DASCALIUC A. *Procedeu de micropropagare a plantelor de Mentha gattefossei Maire in vitro*. MD 1091, 2017.06.30.
7. CAUȘ, M., CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., DASCALIUC, A. *Metodă de determinare a temperaturii de inhibiție a sistemului radicular la castravete Cucumis sativus L*. MD 1134, 2017.11.30.

Rezultatele inovaționale au fost apreciate la saloane naționale/internaționale de inventică cu 9 medalii de aur, 2 argint și 2 bronz.

Apartenența la societăți: Societatea de Biochimie din Moldova

Cunoașterea limbilor: limba română – limba maternă, franceză - bine, limba rusă – bine.

Date de contact:

Mun. Chișinău,

str. Pădurii 20

tel: +37322530177

mob. +37368380072

✉ tcalugaru@yahoo.com