

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI
CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT „DIMITRIE CANTEMIR”**

**Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 581.1:635.714(043.2)**

MUTU ANA

**DIVERSITATEA STRUCTURALĂ ȘI FUNCȚIONALĂ
LA *ORIGANUM VULGARE L.***

164.02. – FIZIOLOGIE VEGETALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2020

Teza a fost elaborată în cadrul Centrului Genetică Funcțională a Universității de Stat „Dimitrie Cantemir” (USDC) și Centrului de Cercetări Biologice „Stejarul” (CCB „Stejarul”) Piatra Neamț, România.

Conducători științifici:

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

Referenți oficiali:

GONCEARIUC Maria, dr. hab. în șt. biol., prof. cercet., Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor
CALALB Tatiana, dr. hab. în șt. biol., conf. univ., Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Membri ai Consiliului Științific Specializat:

ȘIȘCANU Gheorghe, *președinte*, academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
CAUȘ Maria, *secretar științific*, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător
DASCALIUC Alexandru, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
ȘTEFĂRȚĂ Anastasia, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător
LEȘANU Mihail, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Susținerea tezei va avea loc la **23 ianuarie 2020, ora 11⁰⁰** în ședința Consiliului Științific Specializat **D 164.02-115** din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, MD 2002, str. Pădurii 20, or. Chișinău, Republica Moldova, tel.: +37322770447, fax: +37322556180, e-mail: institut.gtpp@gmail.com.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală „*Andrei Lupan*” (str. Academiei 5a, MD 2028, or. Chișinău) și pe pagina web a ANACEC (www.cnaa.md).

Rezumatul a fost expediat la **20 decembrie 2019**.

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat



CAUȘ Maria
dr. în șt. biol., conf. cercet.

Conducători științifici

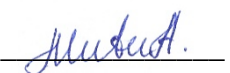


DUCA Maria
acad., dr. hab. în șt. biol., prof. univ.



GILLE Elvira
dr. în șt. biol., prof. univ.

Autor



MUTU Ana

© Mutu Ana, 2020

CUPRINS

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND STUDIUL SPECIEI <i>ORIGANUM VULGARE</i> L. CA PLANTĂ MEDICINALĂ ȘI AROMATICĂ	7
2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE	7
3. STUDIUL MORFOLOGIC COMPARATIV AL PLANTELOR DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i>	8
3.1. Caracteristica particularităților fenotipice ale plantelor din flora spontană și colecție	8
3.2. Estimarea coeficientului de variație și corelație a parametrilor morfologici	9
3.3. Identificarea caracterelor morfologice cu cea mai mare contribuție în diversitatea intra- și interpopulațională	10
4. DIVERSITATEA MOLECULARĂ INTRA- ȘI INTERPOPULAȚIONALĂ LA SPECIA <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i>	12
4.1. Genotiparea cu markeri RAPD	12
4.2. Variabilitatea secvențelor microsatelite (EST-SSR)	13
4.3. Stabilirea relațiilor molecular-genetice dintre subpopulațiile speciei <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	15
5. VARIABILITATEA FITOCHIMICĂ A PLANTELOR DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i> DIN FLORA SPONTANĂ	16
5.1. Analiza calitativă a extractelor vegetale	16
5.2. Evaluarea cantitativă a substanțelor biologice active	16
5.3. Compoziția chimică a uleiului volatil de <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	17
6. ACTIVITATEA TRANSCRIȚIONALĂ A UNOR GENE CE CODIFICĂ TERPEN-SINTETAZE	20
6.1. Analiza terpen-sintetazelor în băncile de gene	20
6.2. Activitatea transcripțională a monoterpen-sintetazelor	20
6.3. Activitatea transcripțională a sesquiterpen-sintetazelor	22
7. PARTICULARITĂȚI CORELATIVE ALE DIVERSITĂȚII MOLECULAR-GENETICE, BIOCHIMICE ȘI MORFOLOGICE A PLANTELOR DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i>	24
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	26
BIBLIOGRAFIE	28
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI.....	30
ADNOTARE (română, engleză, rusă)	31

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea cercetărilor. Specia *Origanum vulgare* L. (sovârf) face parte din genul *Origanum* L. (familia *Lamiaceae*), caracterizat printr-un grad înalt de heterogenitate și taxonomie complexă. Reprezentanții acestui gen sunt plante erbacee aromatice, perene, originare din zona mediteraneană, răspândite în Europa, Asia, Africa de Nord și America de Nord [8].

Plantele speciei *O. vulgare* sunt pe larg valorificate în scopuri fitoterapeutice sau alimentare în calitate de plante medicinale și aromatice (PMA) pentru conținutul înalt în substanțe biologice active (SBA), în special *carvacrol*, *timol*, *p-cimen* și alte terpenoide din uleiul esențial [35]. Semnificația fiziologică a acestor compuși, cu specificitate înaltă de organ și țesut, rezultă din implicarea în rezistența plantelor la diferiți factori de mediu, inclusiv atacul microorganismelor, insectelor, animalelor erbivore sau în calitate de atranctanți pentru polenizatori etc. [6, 7, 32].

Chemotipul metaboliților secundari, în cadrul aceleiași specii de plante, este variat, în funcție de fenofază, arealul geografic, interacțiunile cu mediul biotic și abiotic, fapt ce indică asupra rolului decisiv al terpenoizilor, în calitate de compuși activi biologic, fiziologic și ecologic, în adaptarea și perpetuarea populației de indivizi [33, 34].

Actualmente, în baza caracterelor morfologice specifice sunt documentate 6 subspecii de *O. vulgare* L.: ssp. *vulgare*, ssp. *glandulosum* (Desfontaines), ssp. *gracile* (Koch) Ietswaart, ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart, ssp. *viridulum* (Martrin-Donos) și ssp. *virens* (Hoffmannsegg, Link) Ietswaart [8]. Dintre acestea, subspecia *hirtum*, bogată în monoterpenoide fenolice, a constituit subiectul diverselor cercetări științifice în decursul mai multor decenii [34]. Specia *O. vulgare* ssp. *vulgare*, răspândită în majoritatea țărilor europene (cu climă temperată), inclusiv în habitatul natural al Republicii Moldova [5, 22], este fragmentar studiată.

Evoluția cunoștințelor referitoare la importanța fitoconstituenților cu multiple valențe de întrebuințare este asociată cu o cerere tot mai mare în resurse vegetale. În Europa, numeroase specii de PMA sunt colectate din populațiile biocenozelor native, periclitând astfel existența acestora, inclusiv a speciei *O. vulgare* L. Din aceste considerente, *O. vulgare* a fost inclusă în lista "Priority Species", în cadrul Programului European de Cooperare pentru Resursele Genetice ale Plantelor [34]. De asemenea, conform literaturii de specialitate se observă o tendință de sporire a investigațiilor molecular-genetice, complementar celor biochimice, în scopul identificării genotipurilor valoroase din flora spontană și introducerii acestora în cultură [1, 12, 15].

În Republica Moldova, comparativ cu alte țări, este slab dezvoltată practica cultivării și producerii sovârfului în calitate de PMA. Specia *O. vulgare*, preponderent ssp. *hirtum*, a fost introdusă în cultura comercială, după anul 2000, fiind cultivată pe suprafețe industriale (peste 300

ha) [17]. Investigațiile din ultimii ani ale cercetătorilor Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP) au vizat culturile experimentale de *O. vulgare*, tehnologia de cultivare și conservare a materiei prime, identificarea unor compuși cu valoare farmaceutică. Au fost analizate diferite genotipuri de *O. vulgare* ssp. *hirtum* și ssp. *vulgare* din colecția IGFPP sub aspectul diversității morfologice și biochimice, fiind identificate conținuturi mai mari de ulei esențial și carvacrol la ssp. *hirtum* comparativ cu ssp. *vulgare* [5, 18].

În flora spontană a Republicii Moldova, conform cercetătorilor Negru A. (2007) și Goncariuc M. (2014), se întâlnește doar specia *O. vulgare* ssp. *vulgare* și numeroase varietăți ale acesteia. Lipsesc informații detaliate privind studiul acestei specii din habitatul natural autohton, spre deosebire de alte țări, în care plantele de *O. vulgare* din flora spontană sunt pe larg explorate științific și economic [15, 23, 30, 34].

Cunoașterea fondului de gene, precum și a interrelațiilor dintre indivizii din populații determinate de acțiunea factorilor climatici și antropici, trebuie să fie prioritară în elaborarea strategiilor de conservare și valorificare la nivel național. Germoplasma locală de *O. vulgare* ssp. *vulgare*, formată în condiții ecologice specifice regiunii (cantități reduse de precipitații, alternate cu perioade îndelungate de secetă, temperaturi scăzute în perioada estivală, habitate la altitudini mici), poate reprezenta o sursă de fenotipuri și chemotipuri cu potențial ameliorativ sub aspectul producerii SBA.

Este important de menționat că deși terpenele și derivații acestora nu îndeplinesc funcții primare, similar altor compuși, de exemplu în fotosinteză (carotenoizi, clorofile, plastochinone), respirație (ubichinona), creștere și dezvoltare (citochinine, gibereline, brasinosteroizi), modificarea metabolismului specific în scopul obținerii anumitor chemotipuri, deseori afectează potențialul de rezistență fiziologică a plantei. Din aceste considerente, o semnificație aparte în cercetările axate pe valorificarea PMA din habitatul natural revine geneticii funcționale, în particular, a analizei expresiei genelor asociate căilor de sinteză a compușilor secundari.

Scopul lucrării constă în studiul diversității structural-funcționale a plantelor speciei *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană a Republicii Moldova (rezervația Orheiul Vechi) prin prisma unor indici corelativi de creștere și dezvoltare, precum și aspecte ale activității de transcripție a terpen-sintetazelor și de acumulare a metaboliților secundari.

Obiectivele cercetării:

1. evidențierea particularităților morfologice și fiziologice ale plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare*;
2. evaluarea polimorfismului molecular intraspecific prin genotipare RAPD și EST-SSR;
3. studiul variabilității compușilor metabolismului secundar și stabilirea profilului chimic al

uleiului volatil;

4. estimarea activității transcripționale a unor gene ce codifică terpen-sintetazele implicate în biosinteza produșilor metabolismului secundar;
5. identificarea particularităților corelative ale diversității morfologice, molecular-genetice, biochimice și fiziologice a plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană.

Ipoteza de cercetare constă în elucidarea diversității structurale și funcționale a plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană în perspectiva valorificării potențialului biologic, într-un mod echilibrat, pe baze științifice temeinice. Nivelul ridicat al variabilității molecular-genetice constatat la populația de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din rezervația Orheiul Vechi relevă faptul că exploatarea și fragmentarea habitatelor nu a afectat semnificativ diversitatea în interiorul populației, indicând asupra unei capacități sporite de adaptare la condițiile de mediu. Lucrarea subliniază importanța cunoașterii aspectului molecular-fiziologic de reglare a sintezei terpenelor și derivaților acestora pentru selecția și obținerea formelor ameliorate de PMA.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese. Demersul științific și metodologia cercetării, care include un număr vast de metode și tehnici, selectate în cadrul acestui studiu au permis atingerea obiectivelor propuse. Sunt aplicate metode de statistică multivariată (ACP), analiză clusteriană, teste de semnificație statistică pentru comparații multiple (ANOVA, *Student*, *Fisher*, *Bonferroni*), statistică corelațională (*Pearson*, *Spearman*, testul *Mantel*), molecular-genetică (G_{ST} , F_{SR} , F_{RT} , testul AMOVA) care permit prezentarea și interpretarea clară a rezultatelor în scopul identificării gradelor de variabilitate morfologică, biochimică și fiziologică a plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* studiate și nivelele relaționale dintre acești parametri.

Strategia de cercetare a speciei din flora spontană prezentată în lucrarea de față poate fi aplicată cu succes asupra studiului diferitor specii de PMA cu scopul identificării, selectării și introducerii în cultură a formelor cu caractere economic valoroase.

Cercetările prezentate au fost realizate parțial în cadrul proiectului internațional bilateral moldo-român 13.820.18.06/RoA „GECOMAP – „*Analiza polimorfismului genetic intraspecific pentru elaborarea markerilor moleculari ai unor chemotipuri de plante medicinale și aromate*”.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Introducere** se argumentează actualitatea și importanța problemei abordate, sunt formulate scopul și obiectivele tezei, expuse noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor și sumarul capitolelor tezei.

1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND STUDIUL SPECIEI *ORIGANUM VULGARE* L. CA PLANTĂ MEDICINALĂ ȘI AROMATICĂ

Capitolul include analiza detaliată a datelor din literatura de specialitate privind încadrarea sistematică, răspândirea și valoarea economică a speciei *O. vulgare* L. O atenție deosebită se acordă diversității la nivel de specie prin sinteza cercetărilor cu referire la variabilitatea morfologică, biochimică, molecular-genetică și evidențierea particularităților distinctive ale metabolismului secundar.

2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE

Materialul de studiu. Pentru investigarea diversității structurale și funcționale la specia *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. (sovârf) din flora spontană a Republicii Moldova au fost luate în studiu 7 subpopulații [3] prelevate din rezervația cultural-naturală Orheiul Vechi (notate convențional: Or1-Or7, 6 fiind colectate de la diferite altitudini a versantului Butuceni: Or1-42m, Or2-45m, Or3-26m, Or4-23m, Or5-23m și Or6-22m), iar în cazul a 2 obiective de cercetare plantele din flora spontană au fost investigate în aspect comparativ cu 3 subpopulații din colecția de plante medicinale a Grădinii Botanice Naționale (Institut) „*Alexandru Ciubotaru*” (GBNI), mun. Chișinău: Ch8-Ch10. Pentru realizarea obiectivelor propuse plantele au fost colectate în perioada de înflorire deplină (90%) [24].

Metodele de cercetare. Studiul compoziției chimice a extractelor vegetale prin *cromatografie pe strat subțire* (CSS), *cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță* (HPLC), *spectrofotometrie* și *gaz-cromatografie cuplată cu spectroscopie de masă* (GC-MS) s-a realizat în cadrul Laboratorului Biologie vegetală al Centrului de Cercetări Biologice „Stejarul”, Piatra Neamț, România.

Analiza variabilității fenotipice prin *examinări macroscopice* și *biometrice*, estimarea diversității molecular-genetice prin genotipare RAPD și SSR (*extragerea ADN-lui cu CTAB, PCR, spectrofotometrie, electroforeză PAGE și AGE*) și studiul expresiei genelor (*izolarea ARN-lui cu TRI Reagent, reverstranscripție, PCR cantitativ*) [31] s-au efectuat în Laboratorul de Genomică al Centrului Genetică Funcțională, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”.

Prelucrarea și interpretarea statistică a datelor s-a realizat prin metode de statistică descriptivă (\bar{x} , s^2 , SD, SEM, $s_{\bar{x}}$), molecular-genetică (indici de diversitate și diferențiere genetică, testul AMOVA), comparativă (ANOVA, testul *Bonferroni*, *Student*), corelațională (testul *Mantel*, coeficientul *Pearson* și *Spearman*), analiză multivariată (ACP) și clusterizare (UPGMA) [9, 10, 26].

3. STUDIUL MORFOLOGIC COMPARATIV AL PLANTELOR DE *ORIGANUM VULGARE* SSP. *VULGARE*

Cunoașterea diversității și a relațiilor molecular-genetice între indivizi, în contextul dinamic al factorilor de mediu, inclusiv al managementului antropic al fitocenozelor, este primordială în elaborarea strategiilor eficiente de reglare fiziologică, ameliorare și conservare a resurselor vegetale. Condițiile de creștere și dezvoltare a plantelor deseori induc răspunsuri fenotipice imediate, esențiale în apariția polifenismului determinat ecologic, ulterior și a diferențierii molecular-genetice. În această ordine de idei, primul obiectiv în elucidarea diversității structural-funcționale a plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* autohtone reprezintă caracteristica morfologică a plantelor din habitatul natural (rezervația Orheiul Vechi) în aspect comparativ cu cele din colecția de PMA a GBNI.

3.1. Caracteristica particularităților fenotipice ale plantelor din flora spontană și din colecție

Evaluarea fenotipică a subpopulațiilor de sovârf a evidențiat însușiri generale comune pentru plantele din flora spontană și cele din colecția GBNI și anume: indivizi grupați în tufe, generate dintr-un rizom orizontal cu numeroase rădăcini filiforme, tulpini pubescente, ascendente, cu lăstari sterili și floriferi, frunze ovale, inflorescență corimbiformă cu cime contractate, corola bilabiata, tubuloasă, infundibuliformă din care se observă androceul format din 4 stamine fertile cu filamente divergente și gineceu cu stil lung, trăsături fenotipice caracteristice pentru specia *O. vulgare*.

Totodată, s-a constatat că culoarea florilor, care este determinată de cantitatea unor compuși cu activitate antioxidantă, cum ar fi: antocianii, carotenoizii oxidați, polifenolii etc., variază în funcție de zona de colectare. Astfel, plantele din colecție sunt de culori alb-roze (Ch8), violet-pal (Ch9) și roz-pal (Ch10), în timp ce exemplarele din habitatul natural prezintă diferite nuanțe de violet: violet-purpuriu (Or1), violet-deschis (Or2, Or3, Or4 și Or6) și violet-pal (Or5 și Or7), manifestând o asociere cu gradientul altitudinal și respectiv cu luminozitatea și gradul de înclinare a reliefului (expoziția versantului spre nord, nord-est).

Analiza biometrică a 9 caractere cantitative: *înălțimea plantei* (HP), *diametrul tulpinii* (DT), *numărul de ramuri pe plantă* (RP), *lungimea ramurii* (LR), *numărul de frunze pe nod* (nodul 5 de la bază, FN), *numărul de noduri pe tulpină* (NT), *distanța internodurilor* (DI), *lungimea și lățimea frunzei* (frunza matură al nodului 5 de la bază, LF, respectiv, IF) la faza de înflorire deplină, a pus în evidență valori medii mai mari după majoritatea indicilor la plantele din colecție comparativ cu cele indigene, care relevă particularități specifice pentru plantele din cultură în

contextul condițiilor de creștere și dezvoltare controlate. Plantele din subpopulația Ch9 se evidențiază prin valori sporite după 5 parametri (HP, DT, NT, DI și FN), iar subpopulația Or7 cu maxime ale valorilor medii la 6 parametri (HP, RP, LR, DI, FN și IF), apropiindu-se după aceste caracteristici de plantele din colecție. Subpopulația Or2, care se află pe sol calcaros, la o altitudine mai mare comparativ cu celelalte subpopulații de pe versantul Butuceni se caracterizează prin cele mai joase medii la 7 dintre cei 9 parametri măsurabili investigați. Considerăm că valorile reduse ale majorității indicilor reflectă o strategie de adaptare a plantelor, în vederea evitării efectului mecanic dăunător al vânturilor puternice la altitudini mari, pe de o parte, iar pe de altă parte, pot fi determinate de temperaturi relativ scăzute și conținutul limitat de nutrienți și apă [11]. Astfel, valorile scăzute ale parametrilor morfobiometrici investigați care caracterizează plantele provenite din flora spontană autohtonă determină particularități xeromorfe de adaptare la diferite condiții pedoclimatice.

3.2. Estimarea coeficientului de variație și corelație a parametrilor morfologici

Diversitatea morfologică constatată la subpopulațiile speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* reprezintă expresia fenotipică a caracterelor cu un posibil nivel de instabilitate, în funcție de condițiile variate de mediu (temperatură, precipitații) și habitat (structura solului, altitudine etc.). În acest context este important de apreciat gradul de omogenitate și reprezentativitate a variației valorilor individuale, precum și asocierilor corelative a variabilelor cantitative, ca un indice de estimare a interconexiunilor fiziologice sinergiste/antagoniste potențiale.

Astfel, conform coeficientului de variație (V, %) individuală, la nivel intrapopulațional s-a constatat că plantele de la GBNI sunt mai omogene după majoritatea parametrilor studiați comparativ cu plantele din populația naturală. Totodată, ambele populații au manifestat cele mai mici valori ale coeficientului de variație pentru înălțimea plantelor (HP) și numărul de noduri pe tulpină (NT), iar cele mai mari, și respectiv, cel mai eterogen parametru – lungimea ramurilor (LR) (Figura 3.1).

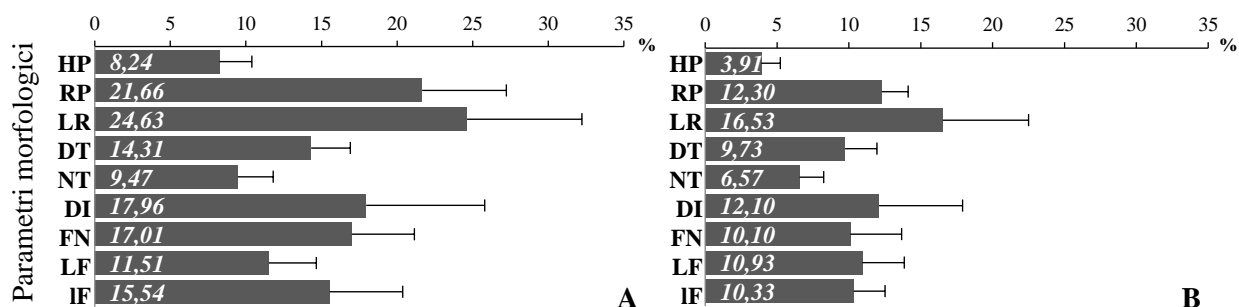


Fig. 3.1. Valorile medii ale coeficientului de variație (V, %) la populația prelevată din flora spontană (A) și cea din colecție (B)

Notă: Barele reprezintă abaterea standard a valorii medii a parametrului (V, %) în cadrul populației.

La nivel interpopulațional s-a constatat că Or3, Or4 și Or5 sunt eterogene ($V > 30\%$) după

lungimea ramurilor. Celelalte subpopulații sunt relativ omogene ($10\% < V < 20\%$) după majoritatea parametrilor morfometrici, iar în cazul plantelor din colecție se evidențiază Ch8 și Ch9 ca subpopulații omogene ($V < 10\%$) și Ch10 – relativ omogenă, după 7 din 9 indici morfologici investigați.

Analiza corelațională (*Pearson*), care caracterizează relația directă sau indirectă de asociere între 2 caractere, la nivel intrapopulațional a relevat cele mai multe corelații statistic semnificative pentru HP (*înălțimea plantelor*), FN (*numărul de frunze/nod*) și DT (*diametrul tulpinii*) (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Coeficienți de corelație *Pearson* între parametrii morfologici la cele zece subpopulații de *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* studiate

	HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF
HP	1								
RP	0,51*	1							
LR	0,53*	0,65*	1						
DT	0,48*	0,55*	0,18	1					
NT	-0,15	-0,05	-0,24	0,44*	1				
DI	0,80*	0,30	0,42	0,59	-0,07	1			
FN	0,54*	0,58*	0,46	0,63*	0,17	0,69*	1		
LF	0,39	0,41	0,20	0,53*	-0,26	0,31	-0,07	1	
IF	0,80*	0,34	0,46	0,21	-0,29	0,53*	0,33	0,36	1

Notă: * – corelații statistic semnificative (*Pearson* $r(20)$, $P=95\%$).

La nivel intrapopulațional s-a remarcat Or2 din flora spontană prin lipsa corelațiilor, cu o singură excepție (FN:DI, $r = 0,46$) și Or3, Or4, Or5 cu câte 4 corelații. În același timp, cele mai multe corelații statistic semnificative (13) au fost identificate la plantele din Ch10 (GBNI), majoritatea fiind de intensitate medie, relevând interrelații homeostatice de creștere și dezvoltare a plantelor.

3.3. Identificarea caracterelor morfologice cu cea mai mare contribuție în diversitatea intra- și interpopulațională

Identificarea caracterelor cu cea mai mare contribuție în variabilitatea morfologică intra- și interpopulațională s-a realizat prin *Analiza Componentelor Principale* (ACP) [9], care evidențiază corelații multiple între variabile (parametri) și posibilitatea vizualizării acestor interconexiuni într-un spațiu vectorial. Astfel, modelul factorial a 9 variabile a generat 4 componente principale (CP) cu pondere diferită în explicarea varianței totale (Tabelul 3.2). Primele 6 variabile (CP1-2) asigură interpretarea a mai mult de 50% din datele inițiale: *distanța internoduri* (27,57%), *înălțimea plantei* (27,30%), *lățimea frunzei* (22,23%), *numărul de noduri/tulpină* (43,48%), *diametrul tulpinii* (31,55%) și *numărul de frunze/nod* (13,28%). Proiecția grafică a coeficienților de corelație cu variabilele concomitent cu scorurile factoriale a observațiilor (subpopulațiilor), indică Or2 și Ch9 ca cele mai distante/disimilare subpopulații după parametrii morfologici (Figura 3.2, A).

Plantele din flora spontană, spre deosebire de cele din colecția GBNI grupate după parametrii

(HP, DI, IF) corelați cu CP1, au o structură a populației mai dezorganizată (în 3 cadrane diferite), fapt ce sugerează varii combinații de similaritate/disimilaritate după unul sau mai multe caractere morfologice.

Tabelul 3.2. Valorile contribuției (%) parametrilor în cadrul componentelor principale

Parametri	CP1	CP2	CP3	CP4
Înălțimea plantei (cm)	27,30	0,00	3,15	4,43
Număr ramuri/plantă	0,84	1,41	7,44	38,28
Lungimea ramurii (cm)	3,87	2,66	0,00	33,96
Diametrul tulpinii (mm)	4,83	31,55	16,15	3,62
Număr noduri/tulpină	0,88	43,48	1,60	0,75
Distanța internoduri (cm)	27,57	2,70	0,68	1,43
Număr frunze/nod	11,05	13,28	3,67	15,16
Lungimea frunzei (cm)	1,44	0,27	64,77	0,73
Lățimea frunzei (cm)	22,23	4,67	2,53	1,64

Grupurile de subpopulații asociate ierarhic în bază de caracteristici similare (valori medii, coeficient de variație, corelații) sunt confirmate și prin analiza de clusterizare (Figura 3.2, B).

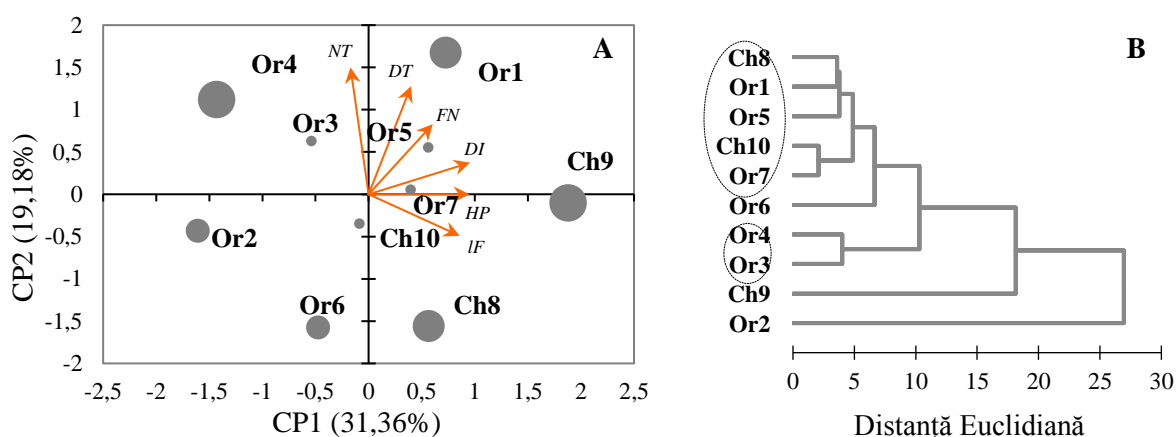


Fig. 3.2. Subpopulații asociate ierarhic în bază de caracteristici similare ale parametrilor morfologici în modelul ACP (A) și de clusterizare (B)

În concluzie, investigațiile comparative prin metode biometrice, statistice și de analiză explorativă a 9 caractere morfologice la specia *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană și colecție a pus în evidență 6 parametri, care diferențiază cel mai bine plantele la nivel intra- (*înălțimea plantei*, *numărul de frunze/nod*, *diametrul tulpinii*, *numărul de noduri/tulpină*, *distanța internodurilor*) și interpopulațional (*înălțimea plantei*, *lățimea frunzei*). *Distanța internodurilor* determină cel mai mare grad de variabilitate la nivel intrapopulațional, atât la plantele din flora spontană, cât și la cele din colecție, iar *lățimea frunzei* s-a evidențiat ca diferențiator morfologic la nivel interpopulațional relevând particularități xeromorfe de adaptare a plantelor din habitatul natural la condițiile de mediu.

4. DIVERSITATEA MOLECULARĂ INTRA- ȘI INTERPOPULAȚIONALĂ LA SPECIA *ORIGANUM VULGARE* SSP. *VULGARE*

Variabilitatea morfologică largă, constatată la plantele indigene, reflectă rezultatul interacțiunii factorilor neereditari (abiotici) și a celor ereditari (mutații, recombinații ale materialului genetic), aspect care stă la baza următorului obiectiv de investigații, realizat prin genotipare RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) și EST-SSR (*Expressed Sequence Tags-Simple Sequence Repeats*), analiza structurii alelice a locilor, a indicilor de diversitate și diferențiere moleculară.

4.1. Genotiparea cu markeri RAPD

Analiza amprentelor RAPD a constatat utilitatea a 5 din 27 de primeri testați. Oligomerii UBC₂₁₅ și OPJ₀₁ s-au evidențiat prin cea mai mare pondere a benzilor polimorfe (89-91%), iar OLIGO_{A2}, OPB₁₀ și OPH₁₅ – prin amplificarea a 4-6 fragmente de ADN specifice (Figura 4.1, A). Acești markeri sunt relevanți atât pentru plantele din habitatul natural, cât și pentru cele din colecție, determinând diferențe a câte 6-9 fragmente între indivizii fiecărei subpopulații.

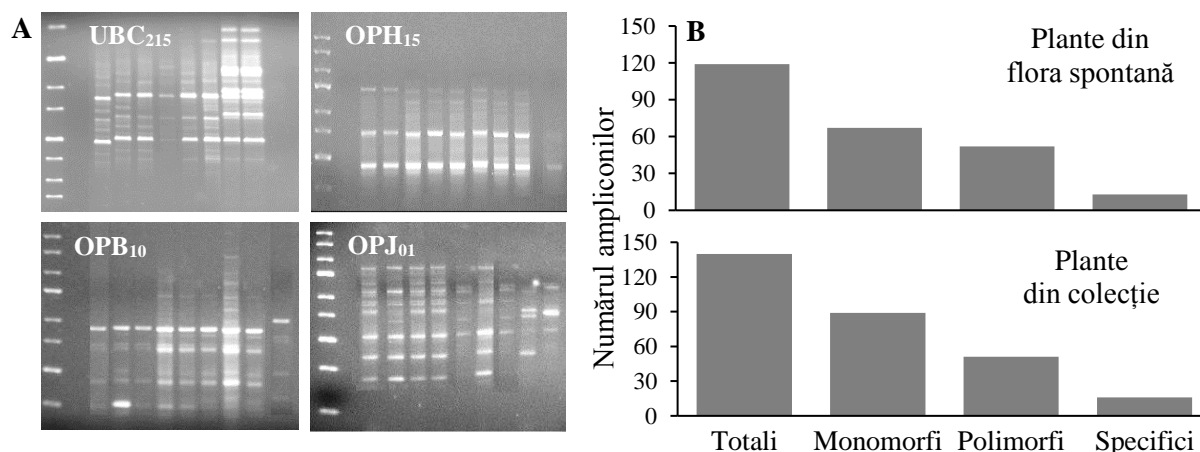


Fig. 4.1. Profile RAPD (A) și numărul de ampliconi, monomorfi, polimorfi și specifici (B)

Notă: markerul masei moleculare – 100 pb (*Thermo Scientific*).

Analiza profilurilor electroforetice a evidențiat prezența a 140 benzi la indivizii speciei *O. vulgare* din colecția GBNI și 119 la cei din flora spontană. Deși, numărul total de fragmente identificate este mai mare la cele din colecție, totuși, conform ampliconilor polimorfi puși în evidență (Figura 4.1, B) se constată o structură genetică mai complexă și un nivel de polimorfism mai pronunțat la sovârful colectat din zona Orheiului Vechi. Astfel, *screening*-ul cu primeri arbitrari a relevat gradul mai mic de variabilitate moleculară (36,4% fragmente polimorfe) a plantelor din colecția GBNI în comparație cu cel constatat la plantele din flora spontană (45,0%).

4.2. Variabilitatea secvențelor microsatelite (EST-SSR)

Genotiparea cu 11 primeri EST-SSR din regiunile de codificare a ADN-lui cu activitate de transcripție în celulele secretoare a perilor glandulari cu funcție de producere și depozitare a terpenelor (EST- *Expressed Sequence Tag*) [23] a pus în evidență rezultate convergente privind numărul de profile moleculare, de alele pe profil și conținutul informației polimorfe (PIC).

La nivel interpopulațional, Or3, Or4 și Or5 s-au evidențiat prin cele mai mari valori ale indicilor de estimare a diversității alelice: *numărul total* (A) și *mediu* (N_A) *de alele/subpopulație*, *numărul efectiv de alele* (N_E), *alele specifice* (N_S), *ponderea procentuală a locilor polimorfi* (PLP), *frecvența alelelor* (Fa) (Figura 4.2, A). Pentru indivizii din rezervația naturală au fost identificate 25 de alele rare, 5 abundente și 48 frecvente, iar la cei din colecția GBNI: 4 rare, 6 abundente și 42 frecvente (Figura 4.2, B). Cele mai abundente alele sunt OR10¹¹² și OR64⁸⁷ (frecvența de 0,82 și 0,61, respectiv) întâlnite la plantele din ambele populații studiate. Alele specifice au fost identificate la 7 din cele 10 subpopulații (Or1 – OR44¹⁶³, OR75¹¹⁴; Or3 – OR10^{102,155}, OR13¹⁷²; Or4 – OR40^{133,183}, OR81¹⁵⁸; Or5 – OR13²⁰⁰; Ch8 – OR40⁸⁶; Ch9 – OR81¹⁸⁷; Ch10 – OR81^{197,210}) și au frecvențe cuprinse între 0,005 și 0,083, majoritatea fiind rare.

Subpop.	A	N_A	N_E	N_S	PLP (%)	Loci cu alele specifice
Or1	29	2,64	2,36	2	55	OR44, OR75
Or2	35	3,18	2,26	0	82	-
Or3	49	4,46	3,64	3	100	OR10*, OR13
Or4	46	4,18	3,77	3	100	OR40*, OR81
Or5	44	4,00	2,82	1	91	OR13
Or6	25	2,27	2,26	0	73	-
Or7	25	2,27	2,21	0	55	-
Ch8	30	2,73	2,31	1	64	OR40
Ch9	25	2,27	2,22	1	73	OR81
Ch10	40	3,64	3,34	2	82	OR81*

A; * – loci cu 2 alele specifice unei subpopulații.

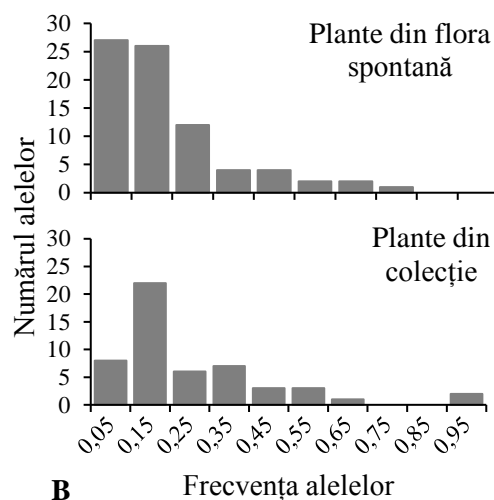


Fig. 4.2. Indici de diversitate alelică (A) și frecvența alelelor locilor EST-SSR (B)

Cuantificarea diversității moleculare realizată la nivelul unui locus separat și multi-locus prin calcularea *heterozigoției așteptate* (H_e) și *observate* (H_o), *indicelui de fixare* (F), *coeficienților de diferențiere molecular-genetică* (G_{ST} , F_{SR} și F_{RT}) a relevat diversitatea moleculară intrapopulațională mare (30%) și interpopulațională moderată (7%). Această concluzie este confirmată și de rezultatele analizei varianței moleculare, care au indicat gradul mare de variație între indivizi (Figura 4.3). Diversitatea molecular-genetică a fost mai mare la subpopulațiile din flora spontană (42%) comparativ cu cele din colecție (26%).

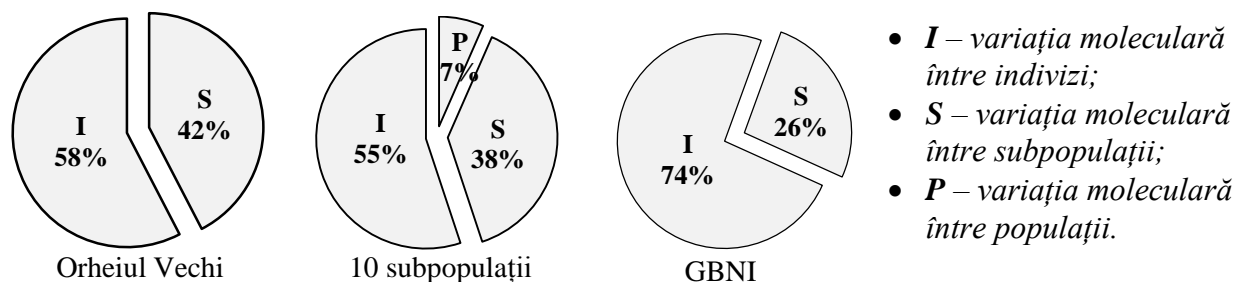


Fig. 4.3. Analiza varianței moleculare (AMOVA) a subpopulațiilor de *O. vulgare*

În cazul ambelor populații studiate, media indicelui de fixare F are valori apropiate de „0”, cu mici devieri de la echilibrul *Hardy-Weinberg* (exces de heterozigoție), fapt care denotă că încrucișările s-au realizat în mod aleatoriu. Aceste rezultate sunt concludente cu valorile medii ale heterozigoției observate și așteptate între care nu există diferență statistic semnificativă. La nivel intrapopulațional media heterozigoției pentru cei 11 loci analizați relevă cea mai mare pondere a heterozigoților la subpopulația Or4 ($H_o = 0,75 \pm 0,18$; $H_e = 0,72 \pm 0,04$), iar cea mai scăzută la subpopulațiile Or1, Or2 și Or7. Această clasificare se suprapune cu cea identificată la parametrul N_e , ceea ce subliniază o relaționare cu numărul efectiv de alele la o subpopulație și numărul de genotipuri heterozigote care rezultă din combinarea lor ($Or7 < Or1, Or2 < Or6 < Or5 < Or3 < Or4$).

Tabelul 4.1. Indici de diversitate inter- și intrapopulațională

Loci EST-SSR	H_T		F_{SR}		F_{RT}	G_{ST}
	Orhei	Chișinău	Orhei	Chișinău		
OR09	0,72	0,51	0,37	0,25	0,12	0,42
OR10	0,43	0,00	0,23	0,00	0,06	0,28
OR12	0,82	0,58	0,14	0,16	0,05	0,19
OR13	0,66	0,69	0,26	0,23	0,06	0,29
OR14	0,61	0,65	0,31	0,06	0,14	0,34
OR27	0,81	0,81	0,28	0,39	0,01	0,32
OR40	0,81	0,84	0,07	0,09	0,00	0,08
OR44	0,55	0,66	0,26	0,01	0,05	0,22
OR64	0,64	0,00	0,45	0,00	0,18	0,55
OR75	0,84	0,77	0,24	0,19	0,03	0,25
OR81	0,67	0,74	0,35	0,28	0,10	0,39
Valoarea medie	0,69±0,09	0,57±0,20	0,27±0,07	0,15±0,09	0,07±0,04	0,30±0,08

Notă: H_T – heterozigoția totală; F_{SR} – indicele de diferențiere moleculară între subpopulațiile unei populații; F_{RT} – indicele de diferențiere între populații; G_{ST} – indicele de diferențiere moleculară relativă între toate subpopulațiile.

Markerul OR64, care indică cea mai mare valoare ($F_{RT} = 0,18$, $G_{ST} = 0,55$), determină un grad înalt de diferențiere moleculară între subpopulații, urmat de OR09, OR14 și OR81 (Tabelul 4.1). Locii OR10 și OR64 au o valoare a heterozigoției totale de 0,43 și, respectiv, 0,64, la plantele din habitatul natural și homoziigoție absolută la cele din colecția GBNI.

Astfel, analiza în baza markerilor microsatețiți a relevat un grad înalt de polimorfism (PIC: $0,65 \pm 0,09$) la plantele din flora spontană și moderat (PIC: $0,52 \pm 0,19$) la cele din colecție.

4.3. Stabilirea relațiilor molecular-genetice dintre subpopulațiile speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Evaluarea structurii molecular-genetice intrapopulaționale (ACP și analiza clusteriană) relevă primul nivel de similaritate molecular-genetică între Or1 și Or2 (grupul I), Or3, Or4, Or5, Or6, Or7 (grupul II), Ch8, Ch9 și Ch10 (grup III), demonstrând o tendință generală de asociere în funcție de biotopul plantelor (Figura 4.4, A, B).

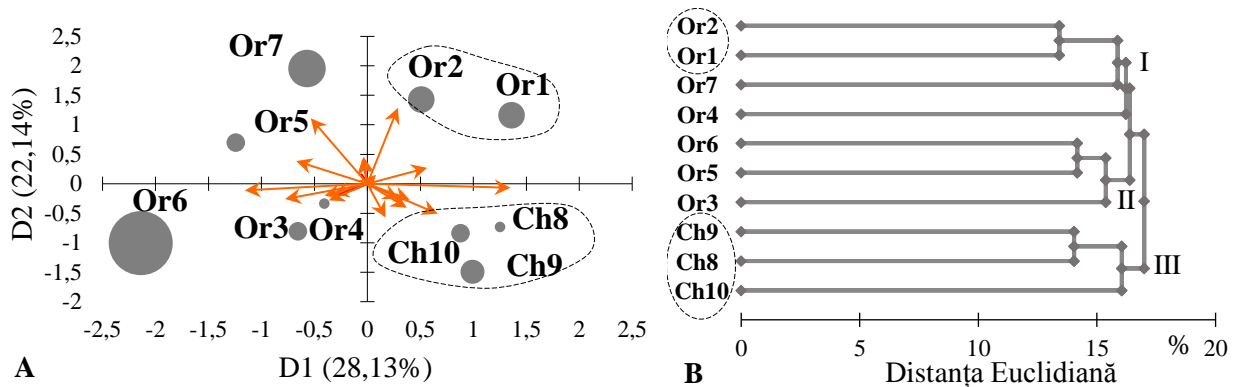


Fig. 4.4. Asocierea în grupuri a subpopulațiilor de *O. vulgare* în baza locilor EST-SSR
 Notă: A – Analiza Componentelor Principale; B – Hierarchical agglomerative clustering/UPGMA

Prezentarea în plan factorial a subpopulațiilor indigene indică asupra unor particularități molecular-genetice a Or6 și Or7 față de celelalte. Astfel, Or6 se caracterizează prin exces de heterozigoție ($H_o = 0,68$, $F = -0,42$), iar Or7 prin cea mai scăzută pondere a heterozigoților ($H_o = 0,42$, $F = -0,11$), aceasta din urmă fiind mai distantă și izolată. Structura molecular-genetică a unei populații de plante este rezultatul selecției naturale și artificiale, a recombinărilor și transferului de gene, a mutațiilor. S-a constatat că majoritatea microsateliților au rate de mutații ridicate, care apar la nivelul tipurilor de repetiții (di-, tri- și tetranucleotide), unității repetitive [2], structurii (perfect, compus sau întrerupt). Polimorfismul SSR este generat și de numărul de secvențe repetitive, astfel încât polimorfismul markerilor se datorează diferențelor de lungime a alelelor, alelele lungi fiind, în general, mai predispuse la mutație decât cele scurte. Variabilitatea semnificativă a subpopulațiilor speciei *O. vulgare* poate fi explicată și prin faptul că aceasta este o plantă alogamă, caracterizată prin polenizarea încrucișată [35].

Astfel, sistemul multi-locus studiat (11 EST-SSR) diferențiază bine subpopulațiile din flora spontană, indicând un grad mai înalt de diversitate moleculară comparativ cu subpopulațiile din colecție și, respectiv, determinând un potențial mai mare de rezistență și adaptare la condițiile variabile de mediu. Alelele cu contribuții semnificative în diferențierea moleculară intrapopulațională sunt: OR81¹³⁶, OR10¹¹², OR13¹⁴⁸ (Or1, Or2); OR64⁸⁴, OR091⁵⁰, OR75¹⁰⁰, OR10¹³⁰, OR27¹⁰⁶, OR81¹⁴⁵ (Or3, Or4, Or5, Or6); OR44¹⁴⁸, OR14⁸⁷, OR75¹⁰³, OR09¹⁶⁵, Or27¹¹⁰ (Or7); OR64⁸⁷, OR75⁹⁸, OR09¹⁴⁰, OR14¹⁰⁰, OR14⁹¹ (Ch8, Ch9, Ch10).

5. VARIABILITATEA FITOCHIMICĂ A PLANTELOR DE *ORIGANUM VULGARE* SSP. *VULGARE* DIN FLORA SPONTANĂ

Se cunoaște că germoplasma indigenă reprezintă o sursă importantă de variații molecular-genetice exprimate în fenotipuri și chemotipuri care pot fi exploatate în diverse scopuri. Plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare*, datorită conținutului înalt de SBA fac subiectul diferitor cercetări aplicative ce vizează această specie în calitate de PMA [1, 11, 12]. Variabilitatea constatată în genomul plantelor la nivelul secvențelor microsatele sugerează asupra unei compoziții biochimice corespunzătoare, care a și constituit subiectul investigațiilor din acest capitol.

5.1. Analiza calitativă a extractelor vegetale

Analiza calitativă prin *cromatografie în strat subțire* a extractelor vegetale obținute din plantele din flora spontană în faza de înflorire deplină, a relevat prezența unor acizi polifenolcarboxilici (*acid cafeic*, *acid clorogenic*, *acid rozmarinic*), flavonoide (*rutozida*, *luteolina*, *apigenol*) și triterpene (*β -sitosterolul*, *stigmasterolul*, *acidului oleanolic*, *acidul ursolic*), cunoscuți ca SBA cu multiple efecte terapeutice. Acizii *cafeic*, *clorogenic* și *rozmarinic* s-au evidențiat prin spoturi largi și mai intense în culoare comparativ cu cele ale flavonoidelor.

5.2. Evaluarea cantitativă a substanțelor biologice active

Analiza *spectrofotometrică* a extractelor vegetale a demonstrat că conținutul **polifenolilor totali** (g echivalenți *acid galic*/100 g s.u. – substanță uscată) variază între 3-5 g. Cel mai mare conținut în polifenoli totali s-a constatat la subpopulațiile Or1 și Or6, iar cel mai mic (cu 25-40%) la Or3, Or4 și Or7 (3,0-3,7 g) (Figura 5.1).

Valori maxime ale **acizilor polifenolcarboxilici** (g echivalenți *acid rozmarinic*/100 g s.u.) s-au înregistrat la Or1 și Or6 (3,40 g) și minime (cu 18-47%) la subpopulațiile Or2, Or4 și Or7 (1,80-2,80 g, $p < 0,05$). Ponderea acizilor polifenolcarboxilici în conținutul total al polifenolilor constituie cca 70%, cea mai mică valoare fiind observată la subpopulația Or4 (58,7%) (Figura 5.1).

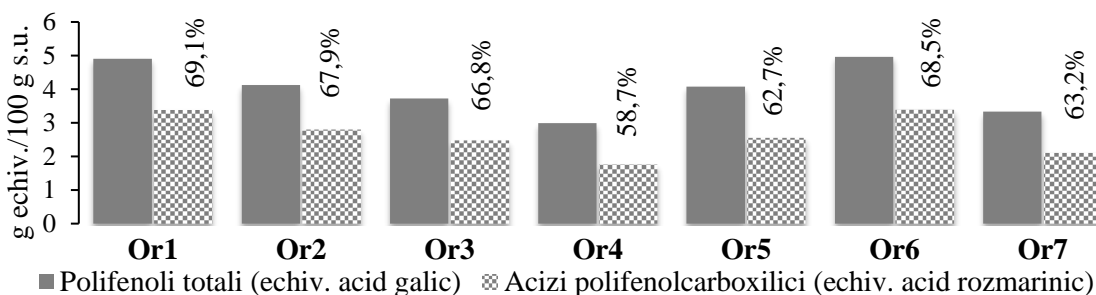


Fig. 5.1. Ponderea procentuală a acizilor polifenolcarboxilici în conținutul de polifenoli totali a extractelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* (polifenoli totali – 100%)

Spectrofotometric a fost determinat și nivelul bioacumulării *flavonoidelor* care a prezentat cele mai mari valori la Or1 (1,05 g/100 g s.u.) și cele mai mici la Or7 (0,63 g/100 g s.u.) pentru *rutozidă* și maxime la Or1 (0,52 g/100 g s.u.), minime la Or4 și Or7 (0,29 g/100 g s.u.) pentru *luteolină*.

Studiul fracțiilor multicomponente prin *cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță* (HPLC) a pus în evidență *acidul rozmarinic* – component majoritar cu valori maxime la Or6 (1678,14±6,27 mg/100 g s.u.) și minime la Or4 (431,06±4,37 mg/ 100 g s.u.). În baza conținutului *acidului rozmarinic* se conturează următorul clasament a subpopulațiilor: Or4 < Or7 < Or5 < Or3 < Or2 < Or1 < Or6 (Tabelul 5.1).

Tabelul 5.1. Conținutul în polifenoli și flavonoide determinat prin HPLC (mg/100 g s.u.) la subpopulațiile de *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Orheiul Vechi	Acid clorogenic	Acid cafeic	Acid p-cumaric	Acid rozmarinic	Luteolină
Or1	2,51±0,11 ^d	16,67±0,23 ^d	1,88±0,04 ^a	1175,76±9,91 ^b	5,96±0,15 ^a
Or2	2,21±0,21 ^e	18,10±0,24 ^c	1,66±0,10 ^b	1003,90±4,74 ^c	3,67±0,06 ^c
Or3	2,67±0,06 ^d	14,90±0,27 ^e	1,50±0,17 ^c	992,64±2,40 ^d	3,09±0,23 ^d
Or4	5,12±0,21 ^a	18,86±0,14 ^b	1,20±0,12 ^d	431,06±4,37 ^e	2,33±0,10 ^e
Or5	4,36±0,14 ^b	15,15±0,07 ^e	1,60±0,09 ^{b,c}	875,94±9,01 ^e	5,29±0,01 ^b
Or6	1,65±0,11 ^f	16,92±0,13 ^d	1,06±0,05 ^e	1678,14±6,27 ^a	3,13±0,06 ^d
Or7	3,53±0,10 ^c	20,76±0,31 ^a	1,28±0,16 ^d	570,94±4,49 ^f	2,04±0,07 ^f

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei±eroarea valorii medii (n=3); Prin litere este indicată diferența statistic semnificativă dintre subpopulații.

Spre deosebire de *acidul rozmarinic*, ceilalți compuși au fost identificați în cantități de: 15,15-20,76 mg/100 g s.u. în cazul *acidului cafeic*; 1,65-5,12 mg/100 g s.u. – *acidul clorogenic* și 1,06-1,88 mg/100 g s.u. – *acidul p-cumaric*. Aceste cantități sunt considerabil mai mici față de valoarea medie a conținutului de *acid rozmarinic* (961,20 mg/100 g s.u.) și anume de 64 de ori, 275 și 640 de ori în cazul *acidului cafeic*, *clorogenic* și *acidului p-cumaric* corespunzător.

Generalizând datele de mai sus, menționăm că diferența foarte mare în conținutul de substanțe polifenolice și flavonoide poate fi determinată de condițiile climaterice, în special, umiditate ridicată și zile mai puțin însorite în perioada înfloririi, deoarece cantitatea de flavonoide, care constituie compuși cu rol de ecran față de radiațiile ultraviolete, variază în funcție de durata și intensitatea luminii solare [6].

5.3. Compoziția chimică a uleiului volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Interesul științific și comercial pentru compoziția uleiului volatil de sovârf este determinat de terpene – compuși ai metabolismului secundar de o mare diversitate structural-funcțională. Compoziția chimică calitativă și cantitativă a uleiului este variabilă, fiind raportate diferite chemotipuri de monoterpene și sesquiterpene în calitate de compuși dominanți [35].

Dintr-o 100 g de biomasă uscată obținută din plantele studiate (parțile aeriene la faza de

înflorire deplină, 90% [24]) a fost extras între 0,8-1,0 ml de ulei volatil conform Farmacopeei Române (ed. 8-a și a 10-a) și Agenția Europeană a Medicamentului. Analiza compoziției chimice a uleiului volatil prin *gaz-cromatografie cuplată cu spectroscopie de masă* (GC-MS) a pus în evidență 38 de compuși, dintre care 20 de monoterpene (MT) și 15 sesquiterpene (ST), 1 compus (*dihidro-edulan I*) din clasa norisoprenoizilor și 2 compuși (*3-octanonă*, *3-octanol*) alifatici cu valori mai mici de 1%. Numărul total (38) de compuși se identifică în uleiul extras din plantele a trei subpopulații Or2, Or6 și Or7. Unii compuși lipsesc din profilul biochimic al plantelor, de exemplu: *α-amorfenul* nu este prezent în uleiul volatil al indivizilor din Or1; *lemonalul* și *geranialul* – Or3 și Or4; *isopinocampfona* și *cis-geraniolul* – Or5 și *eucaliptolul* – Or3.

Ponderea totală care revine monoterpenelor este mai redusă decât cea a sesquiterpenelor la toate subpopulațiile, cu excepția Or5 și Or6 la care ambele clase de substanțe au valori apropiate ($p=0,36$; $p=0,77$) cu o mică prevalență a sesquiterpenelor. Cele mai mari diferențe între aceste 2 clase de compuși (MT/ST) sunt identificate la Or3 (de 70%), Or2, Or4 și Or7 (23-26%) (Figura 5.2).

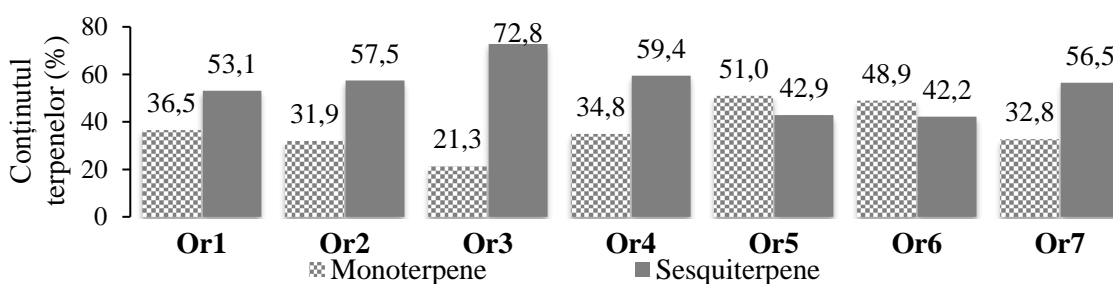


Fig. 5.2. Conținutul de monoterpene și sesquiterpene identificate prin GC-MS

Din totalul a 38 de compuși, 28 au valori mai mari de 1% (cel puțin în cazul unei singure subpopulații) și prezintă variații în concentrația și tipul terpenelor identificate: Or1 (10MT; 10 ST); Or2 (7 MT; 9 ST); Or3 (4MT; 9ST); Or4 (10MT; 8ST); Or5 (12MT; 6ST); Or6 (15 MT; 8 ST); Or7 (9 MT; 10 ST). Cinci monoterpene au cele mai mari valori procentuale și prezintă variabilitate intrapopulațională semnificativă: *sabinen* (1-15%), *trans-β-ocimen* (2-8%), *cis-β-ocimen* (2-6%), *p-cimen* (2-5%), *eucaliptol* (1-7%). S-a remarcat *4-terpineolul* și *α-terpineolul* prin valori înalte la Or5 (2,60%, respectiv 3,51%), iar *lemonalul*, *cis-geraniolul*, *geranialul* și *geranil acetatul* la Or6 (1,51%, 1,34%, 2,20% și 4,63%, respectiv), cu diferențe statistic semnificative ($p<0,05$) față de toate subpopulațiile. În cazul sesquiterpenelor principalii constituenți ai uleiului volatil din probele analizate sunt: *β-cariofilen* (14-33%), *germacren D* (3-17%), *oxid de cariofilen* (3-12%), *α-cariofilen* (3-7%), *τ-gurjunen* (2-4%). Aceste variații cantitative sunt reflectate elocvent în reprezentarea grafică a 7 amprente cromatografice (cu compuși în concentrații $\geq 2\%$) ale uleiului volatil studiat (Figura 5.3, A).

Analiza contribuției procentuale (ACP) a relevat 9 componente care caracterizează valoarea aromatică a extractelor la cele 7 subpopulații studiate (Figura 5.3, B): *β-cariofilen* (56,9%), *oxid de*

cariofilen (33,8%), *sabinen* (29,9%), *germacren D* (28,3%), *cis- β -ocimen* (6,5%), *τ -gurjunen* (4,1%), *β -bisabolen* (3,1%), *γ -terpinen* (3,1%), *p-cimen* (3,0%). Acești compuși pot fi utilizați în calitate de „marker” în autentificare și reprezintă o particularitate specifică de interacțiune a profilului fitochimic cu condițiile de mediu, reprezentând o chemovarietate a uleiului volatil la plantele indigene de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din Republica Moldova (rezervația Orheiul Vechi).

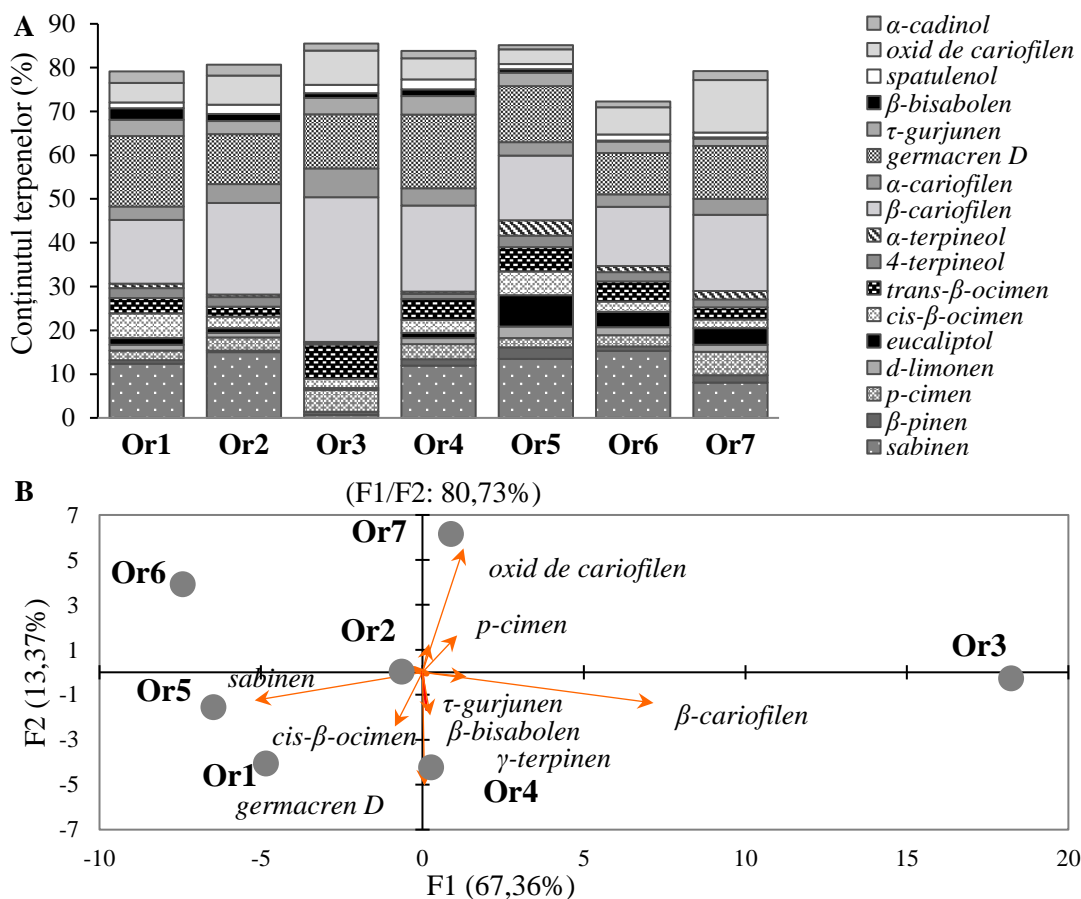


Fig. 5.3. Profile chimice (A) și compuși terpenici cu contribuție procentuală mare în variabilitatea biochimică a subpopulațiilor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* (B)

Se consideră că terpenele sunt generate prin două căi metabolice: una localizată în citozol, dependentă de mevalonat (MVA), prin care are loc formarea sesquiterpenelor (C15) și alta activă în plastide, 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP), rezultând monoterpenele (C10) [36]. Diverse studii au relevat sporirea sintezei terpenelor în citozolul celulelor secretoare a perilor glandulari ca răspuns la o varietate de factori stresogeni, de exemplu seceta, care reduce sinteza de substrat fotosintetic, inclusiv transportul asimilatelor, inhibând astfel procesul de creștere. Perturbarea metabolismului PMA determină sinteza lor prin căi atipice asigurate de schimbul de substrat între citozol și plastide [25, 37], precum și de modificări la nivel de expresie a genelor responsabile de fondul metabolizilor secundari.

În concluzie, particularitatea distinctivă a uleiului volatil extras din plantele autohtone a speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* constă în variabilitatea biochimică intrapopulațională determinată de cantități mari de sesquiterpene (42-73%) și moderate de monoterpene (21-51%).

6. ACTIVITATEA TRANSCRIPTIONALĂ A UNOR GENE CE CODIFICĂ TERPEN-SINTETAZE

Varietatea largă de profile chimice a compușilor terpenici este în funcție de rezistența fiziologică și este condiționată de reacția adaptivă a organismului, în anumite etape de dezvoltare și în diverse situații de stres biotic sau abiotic. Acești metaboliți secundari sunt sintetizați de terpen-sintetaze (TPS) care, în mare parte fiind active pe mai multe substraturi, asigură diversitatea structurală a produselor finale. Nivelele de reglare metabolică a acestor constituenți chimici pot fi diferite, atât genetic, cât și biochimic. În acest capitol sunt prezentate rezultatele cercetării activității de transcripție a 7 TPS la plantele speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană.

6.1. Analiza terpen-sintetazelor în băncile de gene

Studiul literaturii de specialitate și a secvențelor nucleotidice în bazele de date genomice a relevat faptul că TPS reprezintă familii de gene rezultate din duplicări, mutații și alte divergențe funcționale [36]. Actualmente, la specia *O. vulgare* este secvențiat doar genomul cloroplastic [13], iar în ceea ce privește structura și funcția genelor nucleare, în majoritatea cazurilor, este investigată prin identificarea gradului de omologie cu gene descrise la plantele cu genomul cunoscut. În baza de date NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [38] sunt accesibile mai multe secvențe genice transcrise (EST-uri) cu funcția candidat de terpen-sintetaze la specia *O. vulgare*, identificate în sisteme heterologe de expresie [4, 16].

Pentru a realiza obiectivele înaintate s-au analizat EST-urile la această specie prin programul bioinformatic BLAST din NCBI, fiind identificate secvențe ARNm cu diferit grad de similaritate (50-99%, scor BLAST >100) cu alte gene ce codifică terpen-sintetaze. De exemplu, *Ovtps1*, *Ovtps2* și *Ovtps7* prezintă omologie cu *alfa-terpineol* (82%), *gamma-terpinen-sintetaza* (94%) din genul *Thymus*, *terpen-sintetaza* (67%) din specia *Salvia officinalis*, *linalol-sintetaza* (64%) din specia *Perilla setoyensis* etc.

Astfel, în baza acestor informații au fost selectate 7 EST-TPS pentru care au fost elaborați primeri specifici și analizați cantitativ transcripții în florile și frunzele plantelor studiate.

6.2. Activitatea transcripțională a monoterpen-sintetazelor

Analiza expresiei relative a 4 monoterpen-sintetaze, *Ovtps1* [GU385980], *Ovtps2* [GU385978.1], *Ovtps5* [GU385971] și *Ovtps7* [GU385967], a relevat un conținut diferit de transcripți în dependență de genă, organ și subpopulație (Figura 6.1).

Nivelul de expresie relativă a *Ovtps1* variază de la 0,110 u.c. pentru Or3 până la 1,748 u.c. pentru Or5 în frunze și în flori de la 0,719 u.c. (Or6) până la 2,764 u.c. (Or1). În dependență de

organul analizat se observă discriminarea subpopulațiilor Or1, Or2, Or3, Or4 față de Or5, Or6, Or7, primele având cantități mici în frunze (Figura 6.1, A) și mai mari în flori (Figura 6.1, B), iar ultimele trei subpopulații – valori mari în frunze și mici în flori.

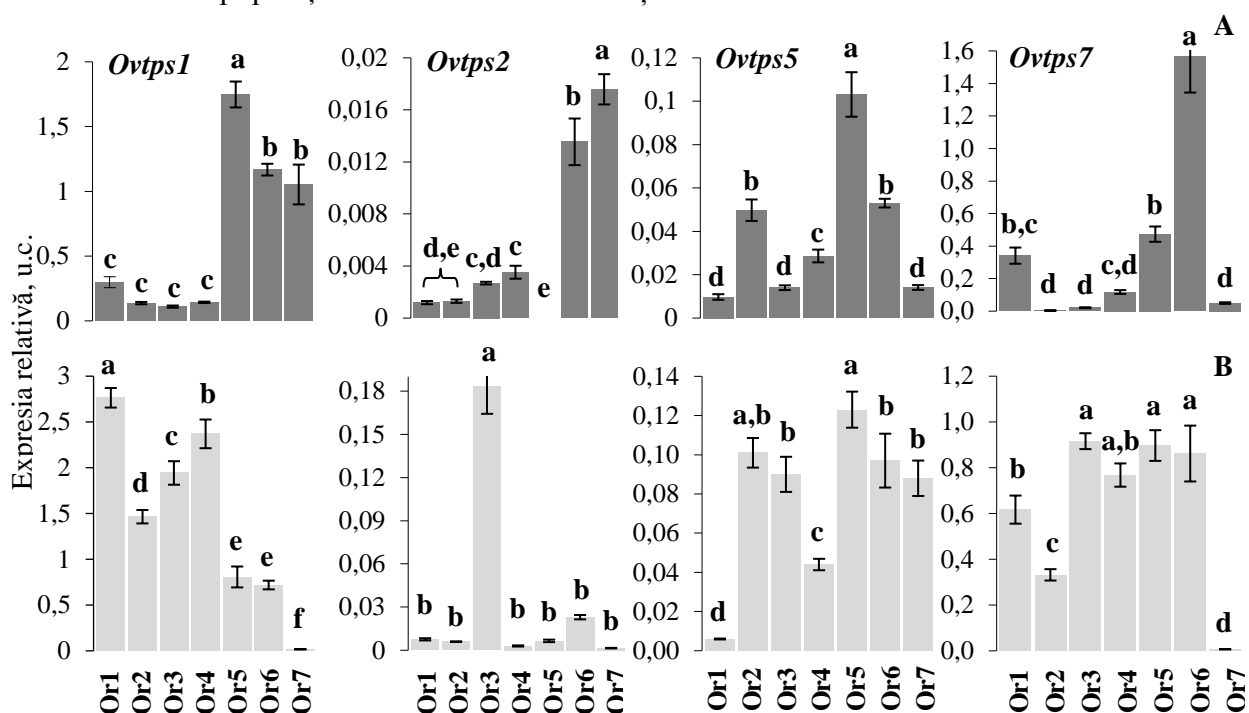


Fig. 6.1. Activitatea transcripțională a monoterpen-sintetazelor în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei cu abaterea standard; prin litere este indicată diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

Spre deosebire de *Ovtps1*, activitatea de expresie a *Ovtps2* a prezentat valori mai mici în frunze, de la 0,001 u.c. (Or1) până la 0,018 u.c. (Or7). Nu au fost depistați transcripți în frunzele plantelor din subpopulația Or5. Cantități mai mari de ARNm *Ovtps2* au fost înregistrate în flori. Subpopulația Or3 se diferențiază prin conținutul în transcripți de 0,183 u.c. față de celelalte 6 (Figura 6.1, B) la care au fost constatate valori foarte mici (0,001-0,023 u.c.).

Ovtps5 nu se deosebește esențial după nivelul de expresie relativă în frunze și flori (Figura 6.1, A, B), fiind identificat același rang de valori. Or5, cu cele mai înalte valori (0,123 u.c., $p < 0,05$), este urmată de Or2, Or3, Or6 și Or7 (0,088-0,101 u.c.) fără diferențe statistic semnificative între ele. Subpopulațiile Or1 și Or4 au cele mai mici valori față de toate subpopulațiile.

Gena *Ovtps7* din frunze nu întrece valoarea de 0,6 u.c. a expresiei relative (excepție Or6) (Figura 6.1, A). În flori, valorile medii sunt relativ omogene în cadrul populației, mai mari de 0,6 u.c. la Or1, Or3, Or4, Or5 și Or6. Cele mai mici valori au fost înregistrate la Or7 (0,007 u.c.).

În baza celor relatate se poate de conchis că în cazul a 3 gene, *Ovtps1*, *Ovtps2* și *Ovtps7*, conținutul mai mare de transcripți a fost constatat în flori, comparativ cu cel din frunze (1,5-8 ori). Monoterpen-sintetaza *Ovtps5* a prezentat un nivel de expresie relativ similar în flori și frunze.

6.3. Activitatea transcripțională a sesquiterpen-sintetazelor

Genele *Ovtps3* [GU385976], *Ovtps4* [GU385974] și *Ovtps6* [GU385970] codifică proteinele cu activitate enzimatică, numite sesquiterpen-sintetaze datorită produselor finale de reacție – sesquiterpenele. Studiul expresiei relative a pus în evidență o activitate transcripțională diferențiată în funcție de genă, organ și subpopulație. Astfel, gena *Ovtps3* are o activitate mai mare în flori comparativ cu cea din frunze (de 2-3 ori). Gena *Ovtps6* a prezentat un nivel de expresie relativ similar în flori și frunze, iar în cazul *Ovtps4* au fost înregistrate valori mai mari în frunze (Figura 6.2).

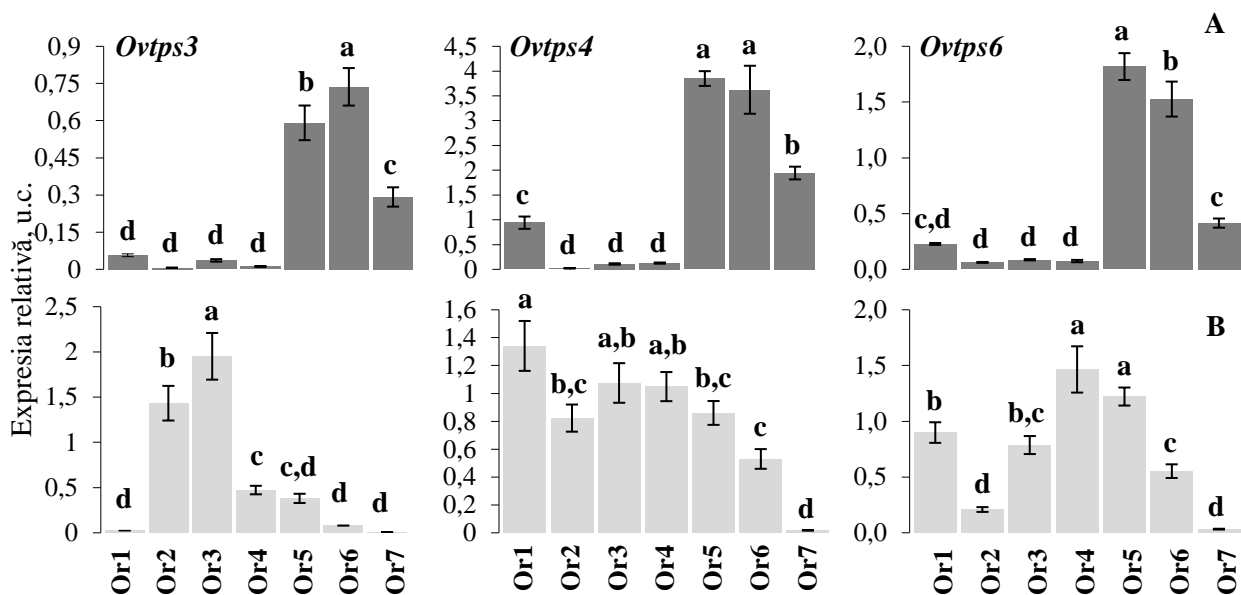


Fig. 6.2. Activitatea transcripțională a sesquiterpen-sintetazelor în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei cu abaterea standard; prin litere este indicată diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

Activitatea transcripțională a *Ovtps3* în frunze a prezentat cel mai mare nivel la Or6 (0,74 u.c.), Or5 (0,59 u.c.) și Or7 (0,29 u.c.). Subpopulațiile Or2 și Or3 sunt evidențiate cu cel mai mare nivel al transcripților în flori (1,43 și 1,95 u.c., respectiv).

Conținutul *Ovtps4* în frunze variază de la 0,02 u.c. (Or2) până la 3,85 u.c. (Or5), iar în flori, este în medie mai mic, cuprins între valorile 0,02 u.c. (Or7) și 1,34 u.c. (Or1).

În cazul *Ovtps6* valorile variază în frunze de la 0,06 u.c. (Or2) până la 1,82 u.c. (Or5), iar în flori, de la 0,03 u.c. (Or7) până la 1,47 u.c. (Or4).

Analiza comparativă a celor două grupe de gene a pus în evidență conținutul mai mare de transcripți ai sesquiterpen-sintetazelor comparativ cu cel al monoterpen-sintetazelor atât în frunze (cca 3,3 ori), cât și în flori (1,7 ori), fapt ce explică conținutul mai mare de sesquiterpene, comparativ cu cel al monoterpenelor în compoziția uleiului volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Identificarea asocierilor corelative în profilul de expresie a terpen-sintetazelor. După tipul relației de dependență cantitativă între transcripții terpen-sintetazelor studiate se conturează un profil general de co-expresie. Astfel, supraexpresia genelor în frunze (excepție *Ovtps5*) este asociată cu subexpresia *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps4* în flori. Valorile conținutului *Ovtps5* din frunze corelează pozitiv cu cel al transcripțiilor codificate de toate genele studiate în flori (Figura 6.3, A). Particularități în activitatea de expresie genică se constată și la nivel de organ, de exemplu, în frunze sunt corelații negative doar în cazul unei gene, iar în flori se asociază negativ valorile pentru *Ovtps5* cu *Ovtps1*, *Ovtps4*, *Ovtps6* și pentru *Ovtps6* cu *Ovtps3*.

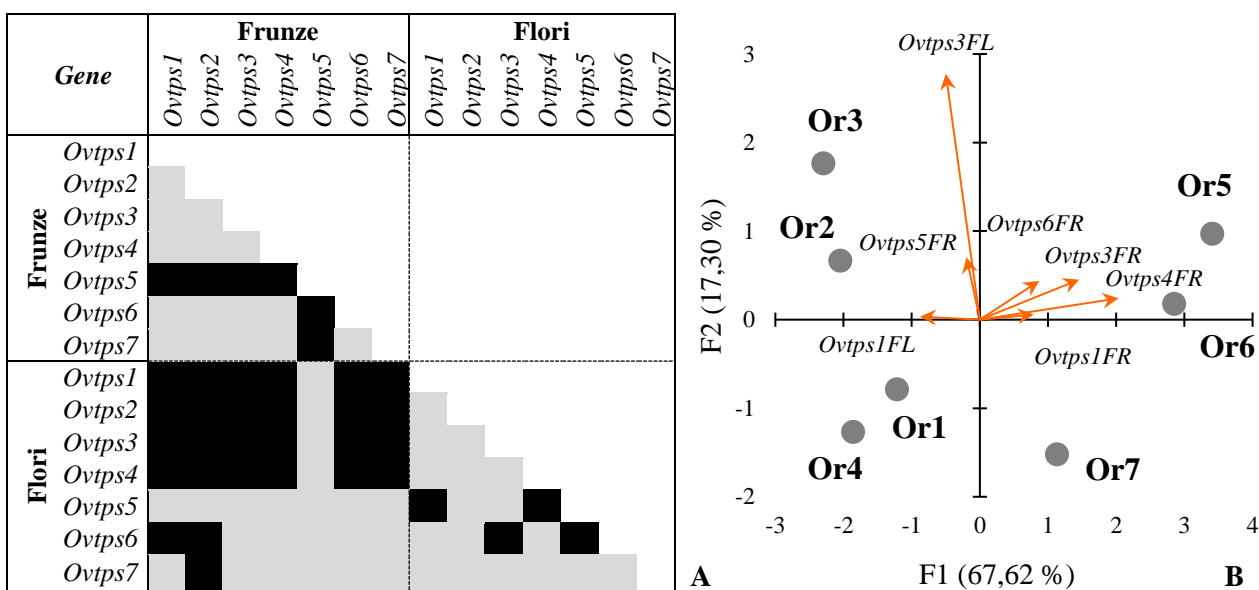


Fig. 6.3. Profilul general de co-expresie a terpen-sintetazelor în frunze și flori (A) și distribuția subpopulațiilor în baza activității de transcripție a EST-urilor studiate (B)

Notă: culoarea neagră în profilul de co-expresie indică corelații negative iar gri – corelații pozitive.

Cea mai mare pondere procentuală în caracterizarea populației o au valorile conținutului de transcripție *Ovtps4* (46%), *Ovtps3* (24%), *Ovtps1* (8%), *Ovtps6* (9%), *Ovtps5* (7%) din frunze și *Ovtps3* (86%), *Ovtps1* (9%) din flori (Figura 6.3, B). Aceste variabile au grupat subpopulațiile Or1, Or2, Or3 și Or4 după conținutul mai înalt al transcripțiilor în flori, în timp ce Or5, Or6 și Or7 se evidențiază prin valori ridicate ale conținutului de transcripție în frunze.

În concluzie, analiza activității de transcripție a 7 terpen-sintetaze la specia *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană a pus în evidență un profil de co-expresie, diferențiat în frunze și în flori, cu diverse asocieri corelative, care se datorează unor procese polimerice, pleiotropice și epistatice de interacțiune a genelor, determinate de factori fiziologici și de mediu. Se cunoaște că reglarea posttranscripțională a genelor *TPS* este dependentă de acumularea substratului biochimic în funcție de bioritmul circadian.

7. PARTICULARITĂȚI CORELATIVE ALE DIVERSITĂȚII MOLECULAR-GENETICE, BIOCHIMICE ȘI MORFOLOGICE A PLANTELOR DE *ORIGANUM VULGARE* SSP. *VULGARE*

Studiul diversității structural-funcționale a plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din rezervația cultural-naturală Orheiul Vechi realizat la nivel morfologic, molecular-genetic, biochimic, fiziologic și aplicarea statisticii comparative, care a inclus diferite combinații formate din: *matrici integrale a datelor inițiale (AB)*, *grupuri de parametri asociați corelativ (Mantel [1])* și *relația dintre valorile a 2 parametri (Spearman [4])* a pus în evidență unele asocieri corelative între parametrii fiecărui nivel abordat.

Astfel, au fost identificate 5 asocieri corelative statistice semnificative (3 pozitive și 2 corelații indirecte, negative) între variabilitatea alelică a EST-SSR cu expresia genelor și conținutul terpenelor. Dintre acestea, menționăm corelațiile medii pozitive între frecvența tuturor alelelor studiate (82) și monoterpen-sintetazele active transcripțional în flori ($r(AB) = 0,51$), corelarea locilor OR44 ($r(AB) = 0,50$) și OR40 ($r(AB) = 0,49$) cu toate 7 terpen-sintetaze exprimate în flori și asocierea corelativă ($r(AB) = 0,43$) a OR40 și OR64 cu nivelul de expresie a sesquiterpen-sintetazelor în frunze. Aceste corelații demonstrează o tendință de modificare în activitatea de transcripție a genelor *TPS* în funcție de frecvența alelelor locilor SSR studiați. De asemenea, a fost identificată o corelație statistic semnificativă între frecvența alelică a 9 loci SSR ($r(AB) = -0,37$, $p = 0,04$) cu conținutul a 9 compuși majoritari (*sabinen*, *p-cimen*, *cis- β -ocimen*, *γ -terpinen*, *β -cariofilen*, *τ -gurjunen*, *β -bisabolen*, *oxid de cariofilen*, *germacren D*), care determină valoarea aromatică a uleiului volatil a plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare*, confirmând stabilirea corectă a chemovarietății speciei indigene investigate.

În același timp a fost stabilită lipsa corelațiilor între variabilitatea morfologică și alelică a EST-SSR, fapt ce poate fi explicat prin tipul markerilor elaborați pe regiuni genice, asociate sintezei metaboliților secundari în trihomii glandulari și care nu fac parte din sistemul poligenic de reglare al caracterelor morfologice cantitative.

Asocieri corelative moderate au fost observate între genele sesquiterpen-sintetaze exprimate în flori și cei 9 compuși majoritari ($r(AB) = 0,56$), între genele monoterpen-sintetaze ($r(AB) = 0,57$) și sesquiterpen-sintetazele ($r(AB) = 0,65$) active în frunze – cu monoterpenele (7 compuși în concentrații $< 7\%$), precum și genele sesquiterpen-sintetaze ($r(AB) = 0,63$) exprimate în flori – cu conținutul sesquiterpenelor (15 compuși). Aceste corelații indică asupra unui mecanism de control a biosintezei compușilor terpenici la nivelul activității transcripționale a genelor *TPS*.

Cea mai mare corelație ($r(AB) = 0,85$) a fost stabilită între conținutul de monoterpene și sesquiterpene în uleiului esențial, fapt ce poate fi datorat particularității enzimelor de a sintetiza un număr larg de terpenoide folosind diverse substraturi provenite din ambele căi metabolice.

Totodată, conținutul în sesquiterpene (13 compuși în concentrații <12%) este relaționat cu 2 parametri morfologici (*lungimea frunzei* și *a ramurilor*) studiați (r (AB)= 0,52), iar cel în monoterpene (19 compuși în concentrații <8%) corelează negativ cu 3 parametri morfologici (*lungimea frunzei*, *a ramurilor* și *numărul de ramuri/plantă*, r (AB)= -0,45), ceea ce denotă că variabilitatea fitochimică a acestor compuși în subpopulații depinde inclusiv de diversitatea caracterelor morfometrice investigate.

Asocieri corelative mari între parametrii morfologici cu conținutul de terpenă (11 corelații) și corelații de intensitate puternică între conținutul de transcripti ai genelor TPS cu cel al terpenelor (24 corelații) au fost puse în evidență și prin aplicarea **coeficientului de corelație a rangurilor (Spearman)**. Astfel, au fost constatate corelații între:

- conținutul de β -cariofilen și gena *Ovtps3* ($r_s=0,78$) expresată în flori;
- conținutul de *trans*- β -ocimen și *Ovtps7* expresată în flori ($r_s=0,93$);
- parametrul *lungimea ramurilor* și conținutul de *p*-cimen ($r_s=0,75$);
- *diametrul tulpinii* în pereche cu conținutul a 2 precursori ai *carvacrolului* și *timolului*: γ -terpinen ($r_s=0,71$) și *cis*- β -ocimen ($r_s=0,68$) dar și cu *germacren D* ($r_s=0,86$);
- *numărul de noduri/tulpină* și conținutul în γ -terpinen ($r_s=0,68$), *germacren D* ($r_s=0,71$), β -bisabolen ($r_s=0,86$) etc.

Dependențele corelative observate indică asupra posibilității de utilizare a acestor caractere în calitate de marker în selecția plantelor bogate în compuși terpenici de interes.

Astfel, în baza particularităților distinctive și corelative ale diversității molecular-genetice, biochimice și morfologice ale plantelor, s-au asociat pe bază de similaritate subpopulațiile Or1 și Or2; Or3, Or4 și Or5; Or6 și Or7, ultimele fiind cele mai distanțate/ diferențiate. Plantele din subpopulațiile Or1, Or2, Or6 sunt bogate în compuși fenolici nevolatili. Or3, Or4 și Or5 se caracterizează prin cea mai mare diversitate a locilor asociați sintezei terpenelor, sugerând asupra unui potențial semnificativ de adaptare la factori stresogeni. Astfel, plantele din flora spontană (rezervația Orheiul Vechi) prezintă caracteristici de interes care pot fi explorate atât ca surse de variație molecular-genetică cu potențial pentru conservarea *in situ* și *ex situ* a germoplasmei de *O. vulgare* ssp. *vulgare*, cât și ca surse de materie primă în scopuri comerciale.

CONCLUZII GENERALE

Pentru prima dată au fost realizate studii complexe ale diversității structural-funcționale la specia *O. vulgare* ssp. *vulgare* L. din flora spontană a Republicii Moldova (rezervația Orheiul Vechi) la nivel morfologic (10 parametri), molecular-genetic (genotipare RAPD, EST-SSR), biochimic (metaboliți secundari) și fiziologic (expresia genelor *TPS*).

1. Au fost identificate particularități morfologice (capitolul 3) distinctive ale plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din habitatul natural (varietatea culorii florilor, valori reduse pentru înălțimea plantelor, lungimea ramurilor, lățimea frunzei, distanța internodurilor – caractere xeromorfe de adaptare), cuantificate relațiile asociative dintre caracterele morfologice cantitative (cele mai multe corelații statistic semnificative pentru înălțimea plantelor, numărul de frunze/nod și diametrul tulpinii) și estimat rolul parametrilor morfologici în diferențierea intra- (*distanța internodurilor*) și interpopulațională (*lățimea frunzelor* reprezintă un diferențiator morfologic al populațiilor studiate) [19].

2. Evaluarea diversității moleculare intraspecifice (capitolul 4) a permis să identificăm 6 primeri SSR (*OR10*, *OR13*, *OR40*, *OR44*, *OR75*, *OR81*), care pun în evidență alele specifice pentru indivizii din flora spontană în subpopulațiile Or1, Or3, Or4 și Or5 și 4 primeri (*OR09*^{GST=0,42}, *OR14*^{GST=0,34}, *OR64*^{GST=0,55} și *OR81*^{GST=0,393}), care relevă un grad înalt de diferențiere moleculară între subpopulațiile din flora spontană și cele din colecție. S-a constatat nivelul ridicat al variabilității moleculare la indivizii din flora spontană (45% cu markeri RAPD și 65% cu EST-SSR), care indică asupra faptului că exploatarea și fragmentarea habitatelor nu a afectat semnificativ diversitatea în interiorul populației, ceea ce este important pentru păstrarea unui potențial sporit de adaptare la diferite condiții de mediu [20, 28].

3. Studiul biochimic al extractelor vegetale a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* (capitolul 5) a demonstrat că în fracția compușilor polifenolici predomină acizii polifenolcarboxilici (70%), iar bioacumularea flavonoidelor variază la nivel intrapopulațional (între 10-40%) și corelează cu gradientul altitudinal și direcția de expoziție a versantului Butuceni de pe care au fost colectate plantele [21].

4. În compoziția uleiului volatil (paragraful 5.3) au fost puși în evidență 38 de compuși inclusiv 20 de monoterpene, 15 sesquiterpene, iar valorile cantitative ale sesquiterpenelor prevalează cu 23-70% față de monoterpene. Au fost identificați 9 compuși majoritari: *β-cariofilen*, *oxid de cariofilen*, *sabinen*, *germacren D*, *cis-β-ocimen*, *τ-gurjunen*, *β-bisabolen*, *γ-terpinen*, *p-cimen*, care caracterizează valoarea aromatică a uleiului volatil a speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* reprezentând o chemovarietate a plantelor din flora spontană a Republicii Moldova (rezervația

Orheiul Vechi).

5. Analiza activității transcripționale a 7 gene *TPS* (capitolul 6) la plantele speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* a relevat o variabilitate în funcție de organ și subpopulație, fiind constatat un conținut mai mare al sesquiterpen-sintetazelor, comparativ cu cel al monoterpen-sintetazelor, atât în frunze (de cca 3,3 ori), cât și în flori (de 1,7 ori). Ponderea cea mai mare în caracterizarea populației indigene o au genele *Ovtps1*, *Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps5* și *Ovtps6* din frunze și *Ovtps1*, *Ovtps3* din flori, iar profilul de co-expresie (diferențiat în frunze și în flori) evidențiat este determinat de factorii fiziologici și de mediu, care se datorează unor procese polimerice, pleiotropice și epistatice de interacțiune a genelor [27].

6. Evaluarea asocierilor corelative (capitolul 7) între parametrii morfologici, molecular-genetici, biochimici și fiziologici a pus în evidență particularități de discriminare a plantelor sau asemănare în funcție de biotopul colectării lor: Or1 și Or2 prelevate de la cea mai mare altitudine a versantului Butuceni (42, respectiv, 45m); Or3, Or4 și Or5 colectate aproximativ de la aceeași altitudine (26-23m) și Or7, care este identificată într-o regiune de câmpie fiind diferențiată după majoritatea parametrilor morfometrici investigați față de celelalte subpopulații.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Rezultatele prezentate în această lucrare sunt recomandate pentru a fi implementate în curricula universitară pentru studii superioare de licență la disciplinele: *Fiziologia plantelor*, *Biochimie*, *Biostatistică* și *Biologie moleculară*.

2. Compușii chimici specifici (*β*-cariofilen/ *germacren D*/ *sabinen*/ *oxid de cariofilen*/ *cis-β*-*ocimen*/ *p-cimen*/ *τ-gurjunen*) care caracterizează valoarea aromatică a uleiului volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană (rezervația Orheiul Vechi) reprezintă o chemovarietate și sunt recomandați pentru utilizare ca „marker” în autentificare.

3. Primerii funcționali EST-SSR sunt utilizați în Laboratorul Genomică, Centrul Genetică Funcțională (USDC), iar 8 dintre ei se recomandă a fi aplicați în studii moleculare ulterioare privind diversitatea intra- și interpopulațională asociată metabolismului secundar la specia *O. vulgare* L.

4. Primerii elaborați pentru determinarea nivelului de expresie a genelor responsabile de biosinteza terpenelor se recomandă a fi utilizați în scopuri de testare și selectare a genotipurilor de perspectivă.

BIBLIOGRAFIE

1. AZIZI, A. et al. Correlations between genetic, morphological and chemical diversities in a germplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. In: *Chemistry & Biodiversity*. 2012, vol. 9, pp. 2784-2801.
2. BACHTROG, D. et al. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-evidence from *Drosophila melanogaster*. In: *Molecular Biology and Evolution*. 2000, vol. 17(9), pp. 1277-1285.
3. CEAPOIU, N. *Genetica și evoluția populațiilor biologice*. In: Editura Academiei Republicii Socialiste România. București, 1976, 281 p.
4. CROCOLL, C. et al. The terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. In: *Plant Molecular Biology*. 2010, vol. 73(6), pp. 587-603.
5. GONCEARIUC, M. și al. Genotipuri perspective de *Origanum vulgare* ssp.vulgare L. și *Origanum vulgare* ssp. hirtum (link) Ietswaart. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2014, nr. 1, vol. 322, pp. 41-50.
6. HEMCINSCHI LUNGU, A. *Contribuții la studiul unor specii indigene de Galium și Ajuga*: rezumat. tz. de doct. șt. farmacologice. Iași, 2010. 56 p.
7. IBRAHIM, L. et al. Characterization and identification of *Origanum* spp. from Lebanon using morphological descriptors. In: *World Research Journal of Agricultural Biotechnology*. 2012, vol. 1, pp. 04-09.
8. IETSWAART, J. H. *A Taxonomie Revision of the Genus Origanum (Labiatae)*. In: Leiden Botanical Series: Leiden University Press. 1980, vol. 4, 153 p.
9. JOLLIFFE, I. T, CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2016, p. 1-16.
10. KETTENRING, J. R. The practice of cluster analysis. In: *Journal of Classification*. 2006, vol. 23, pp. 3-30.
11. KOFIDIS, G., BOSABALIDIS, A. M., MOUSTAKAS, M. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). In: *Annals of Botany*. 2003, vol. 92, pp. 635-645.
12. KOSAKOWSKA, O., CZUPA, W. Morphological and chemical variability of common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) occurring in eastern Poland. In: *Herba Polonica*. 2018, vol. 64(1), pp. 11-21.
13. LUKAS, B., NOVAK, J. The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*). In: *Gene*. 2013, vol. 528(2), pp. 163-169.
14. MAKAR, N., PRASANNA, S. B., SINGLA, H. Comparative evaluation of antifungal activity of piper betel leaf oil, *Origanum vulgare* essential oil and fluconazole suspension on *Candida albicans* – An *In Vitro* Study. In: *Journal of Indian Association of Public Health Dentistry*. 2017, vol. 15, pp. 89-93.
15. MECHERGUI, K. et al. Morphological and Molecular Evaluation of Genetic Diversity of Wild Tunisian Oregano, *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* Desf. Ietswaart. In: *Asian Journal of Biology*. 2017, vol. 3(2), pp. 1-15.
16. MORSHEDLOO, M. R. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. *gracile* at different phenological stages and plant parts. In: *Journal of Food Processing and Preservation*. 2017, vol. 42(2), pp. 1-8.
17. MUSTEAȚĂ, GR., ROȘCA, N., BARANOVA, N. Unele aspecte tehnologice privind cultivarea *Origanum* ssp. *hirtum* în Moldova. În: *Teze, al IV-lea Simpozion național cu participare internațională: Biotehnologii avansate – realizări și perspective*, 3-4 octombrie, 2016, Chișinău, pp. 98.
18. MUTU, A. Aspecte ale cercetării actuale și de perspectivă a plantelor medicinale și aromatice în Republica Moldova. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Științe reale și ale naturii*. 2017, nr.1(101), pp. 83-88.
19. MUTU, A. Diversitatea morfologică a populațiilor de *Origanum vulgare* L. din Republica Moldova. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. Nr. 1(334), 2018, pp. 85-96.

20. MUTU, A. Variabilitatea genetică în cadrul diferitor populații de *O. vulgare*. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Științe reale și ale naturii*. 2014, nr. 1(71), pp. 76-81.
21. MUTU, A., GILLE, E., CLAPCO, S. Evaluarea fitochimică a unor extracte vegetale de *Origanum* sp. În: *Materialele Conferinței Științifice a Doctoranzilor (cu participare internațională) „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei”*. Ediția a V-a, Volumul II. 25 mai, 2016. pp. 207-212.
22. NEGRU, A. Determinator de plante din flora Republicii Moldova. Chișinău: Universul, 2007, 391 p.
23. NOVAK, J. Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* expressed sequence tag. In: *Molecular Ecology Resources*. 2008, vol. 8, pp. 599-601.
24. NURZYŃSKA-WIERDAK, R. Herb yield and chemical composition of common oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil according to the plant's developmental stage. In: *Herba Polonica*. 2009, vol. 55(3), pp. 55-62.
25. PAZOUKI, L., NIINEMETS, Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. In: *Frontiers in Plant Science*. 2016, vol. 7, pp. 1-16.
26. PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. Genalex 6.5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research – an update. In: *Bioinformatics*. 2012, vol. 28, pp. 2537-2539.
27. PORT, A., DUCA, M., MUTU, A. Expresia unor terpen-sintetaze în flori și frunze la *Origanum vulgare* (ssp. *vulgare*). În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2019, nr. 1(337), pp. 74-83.
28. PORT, A., MUTU, A., CIOCÂRLAN, N., DUCA, M. Studiul variabilității genetice la *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* prin analiza componentelor principale. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2018, nr. 3(336). pp. 95-108.
29. POSTICĂ, Gh. *Peisajul Cultural Orheiul Vechi*. Chișinău: CEP USM, 2010, 138 p.
30. RADUŠIENĖ, J., STANKEVIČIENĖ, D., VENSKUTONIS, R. Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. from Lithuania. In: *Acta Horticulturae*. 2005, vol. 1(675), pp. 197-203.
31. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.: New York, vol. I-III, 2001, 1885 p.
32. SHAFIEE-HAJIABAD, M., NOVAK, J., HONERMEIER, B. Content and composition of essential oil of four *Origanum vulgare* L. accessions under reduced and normal light intensity conditions. In: *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2016, vol. 89, pp. 126-134.
33. SINGH, P., KOTHIAL, P., RATAN, P. Pharmacological and phytochemical studies of *Origanum vulgare*: A review. In: *International Research Journal of Pharmacy*. 2018, vol. 9(6), pp. 30-34.
34. SIVICKA, I., ŽUKAUSKA, I., ADAMOVIČS, AL. Aspects of morphological diversity of oregano in Latvia. In: *Modern Phytomorphology*. 2013, vol. 4, pp. 61-64.
35. SKOULA, M., HARBORNE, J. B. Taxonomy and chemistry of *Origanum*. In: KINTZIOS, S. E. ed. *Oregano: The genera Origanum and Lippia, Medicinal and aromatic plants - industrial profiles*. vol. 25. USA: Taylor and Francis CRC Press, 2002. pp. 67-108.
36. THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. In: *Current Opinion in Plant Biology*. 2006, vol. 9, pp. 297-304.
37. XIE, X., KIRBY, J., KEASLING, J. D. Functional characterization of four sesquiterpene synthases from *Ricinus communis* (castor bean). In: *Phytochemistry*. 2012, vol. 78, pp. 20-28.
38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Articole în reviste științifice naționale

1. MUTU, A. Variabilitatea genetică în cadrul diferitor populații de *O. vulgare*. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2014, nr. 1(71), p. 76-81. ISSN 1814-3237.
2. MARTEA, R., MUTU, A., CLAPCO, S., BUDEANU, O., GILLE, E. Evaluation of genetic diversity of *Origanum* genus species. In: *Journal of Botany*, 2014, vol. VI, nr. 2(9), p. 125-130. ISSN 1857-095X.
3. MUTU, A., BUDEANU, O., MARTEA, R., CLAPCO, S., GILLE, E. RAPD molecular marker study of the intraspecific variability of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* naturally occurring in Moldova. In: *Journal of Botany*, 2014, vol. VI, nr. 2(9), p. 23-28. ISSN 1857-095X.
4. MUTU, A. Aspecte ale cercetării actuale și de perspectivă a plantelor medicinale și aromatice în Republica Moldova. În: *Studia universitatis moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2017, nr.1(101), p. 83-88. ISSN 1814-3237.
5. MUTU, A. Diversitatea morfologică a populațiilor de *Origanum vulgare* L. din Republica Moldova. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. Nr. 1(334), 2018, p. 85-96. ISSN 1857-064X.
6. PORT, A., MUTU, A., CIOCÂRLAN, N., DUCA, M. Studiul variabilității genetice la *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* prin analiza componentelor principale. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, 2018, nr. 3(336), p. 95-108. ISSN 1857-064X.
7. PORT, A., DUCA, M., MUTU, A. Expresia unor terpen-sintetaze în flori și frunze la *Origanum vulgare* (ssp. *vulgare*). În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, 2019, nr. 1(337), p. 74-83. ISSN 1857-064X.

Articole în culegeri de lucrări ale conferințelor naționale

8. MUTU, A., GILLE, E., CLAPCO, S. Evaluarea fitochimică a unor extracte vegetale de *Origanum* sp. În: *Materialele Conferinței Științifice a Doctoranzilor (cu participare internațională) „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei”*. Ediția aV-a, Volumul II. 25 mai, 2016. p. 207-212.

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe naționale și internaționale

9. BUDEANU, O., GILLE, E., MUTU, A. Genetic intraspecific polymorphism analysis for the elaboration of molecular markers of some medicinal and aromatic plants (MAP) genotypes. In: *Abstract book of International Plant Breeding Congress*, 10-14 November 2013, Antalya, Turkey, p. 279.
10. CALMÎȘ (MUTU), A. Metode de evaluare a activității antioxidante. *Biotehnologii avansate – realizări și perspective, al III-lea Simpozion național cu participare internaț.*, 24-25 octombrie, Chișinău, 2013, p. 38.
11. MUTU, A., BUDEANU, O., MARTEA, R., GILLE, E., PORT, A., DUCA, M. Genetic variability in natural populations and cultures of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*. In: *Abstract book of Phytochemical Society of Europe Meeting - Phytochemicals in Medicine and Pharmacognosy*, 27-30 April, Piatra Neamt, Romania, 2014, p. 107. ISBN-13 978-0-9565472-4-8.
12. MUTU, A., BUDEANU, O., CLAPCO, S., MARTEA, R. Intraspecific diversity estimation in some species of medicinal plants. In: *Abstract book of International Plant Breeding Congress*, 1-5 November. Antalya, Turkey, 2015, p. 301.
13. MUTU, A. *Origanum* – plants with multiple nutritive and phytoterapeutical uses. In: *Abstract book. Life sciences in the dialogue of generations: Connections between universities, academia and business community. International Conference dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutes of the ASM*. March, 25, Chisinau, Republic of Moldova, 2016, p. 89. ISBN978-9975-933-78-0.
14. PORT, A., MUTU, A., CIOCÂRLAN, N., DUCA, M. Contribution of the some microsatellite markers in the genetic variability of populations of *Origanum vulgare* L. In: *Book of Abstracts. International Scientific Congress Conference of Agriculture and Food engineering*, October 18-19, 2018, p. 75-76, Iasi, Romania.

ADNOTARE

Mutu Ana „Diversitatea structurală și funcțională la *Origanum vulgare* L.”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2020.

Structura tezei: teza include introducerea, 7 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 291 de titluri, 9 anexe, 136 de pagini text de bază, 45 de figuri, 25 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 14 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L., diversitate inter- și intrapopulațională, markeri moleculari, chemovarietate, terpen-sintetază, metabolism secundar.

Scopul lucrării constă în studiul diversității structural-funcționale a plantelor speciei *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană a Republicii Moldova (rezervația Orheiul Vechi) prin prisma unor indici corelativi de creștere și dezvoltare, precum și aspecte ale activității de transcripție a terpen-sintetazelor și de acumulare a metaboliților secundari.

Obiectivele cercetării: evidențierea particularităților morfologice și fiziologice ale plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare*; evaluarea polimorfismului molecular intraspecific prin genotipare RAPD și EST-SSR; studiul variabilității compușilor metabolismului secundar și stabilirea profilului chimic al uleiului volatil; estimarea activității transcripționale a unor gene ce codifică terpen-sintetazele implicate în biosinteza produșilor metabolismului secundar; identificarea particularităților corelative ale diversității morfologice, molecular-genetice, biochimice și fiziologice ale plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană.

Noutatea și originalitatea științifică. S-au efectuat cercetări complexe molecular-genetice asupra biosintezei compușilor biochimici principali ai uleiului esențial de *O. vulgare* ssp. *vulgare*. Studiile au pus în evidență nivelul de expresie al genelor implicate în căile de sinteză a terpenelor și evaluarea morfologică, moleculară și fiziologică a subpopulațiilor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană a Republicii Moldova. Astfel, abordarea analitică, în aspectul integrării informațiilor biologice (date morfologice, biochimice și molecular-genetice), devine esențială pentru studierea speciei și oferă amelioratorilor o perspectivă deosebită, cu referire la elucidarea mecanismelor ce stau la baza caracterelor cu relevanță economică.

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în *fundamentarea* cunoștințelor privind studiul diversității structural-funcționale a plantelor de *O. vulgare* din flora spontană autohtonă, pe baze științifice temeinice, *care a permis* identificarea nivelului ridicat al variabilității morfologice, molecular-genetice și fiziologice în cadrul populației indigene, *indicând asupra* unei capacități sporite de adaptare la condițiile de mediu și valorificării potențialului biologic pentru conservarea resursei vegetale de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Semnificația teoretică. Investigațiile realizate au adus un plus substanțial de informație științifică privind variabilitatea morfologică, molecular-genetică și biochimică a speciei spontane *O. vulgare* ssp. *vulgare* dintr-un areal geografic anterior neexplorat. De asemenea, constatările concluzive cu referire la profilul de expresie a 7 terpen-sintetaze în frunze și flori, asocierile corelative cu conținutul în terpen și derivații acestora prezintă contribuții teoretice în elucidarea proceselor de biosinteză și interconexiune biochimică a metaboliților secundari.

Valoarea aplicativă. Informațiile obținute prin asocierea corelativă a parametrilor morfologici, biochimici și fiziologici asigură suportul științific primar al unor investigații ulterioare cu potențial de transfer tehnologic. Au fost identificați compuși (terpene), particularități morfologice și moleculare (amprente RAPD, SSR) cu potențial de discriminare și autentificare a plantelor, elemente esențiale în selecția asistată de markeri. Genotipurile cu o largă diversitate genetică și conținut înalt în metaboliți secundari, relevante în flora spontană pot fi în programe de valorificare eficientă a resursei vegetale de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Implementarea rezultatelor științifice. Markerii RAPD, EST-SSR și primerii elaborați pentru determinarea nivelului de expresie a genelor terpen-sintetaze sunt utilizați în studiul speciei *O. vulgare* în cadrul Centrului Genetică Funcțională și sunt recomandați pentru studii molecular-genetice și fiziologice ulterioare. Rezultatele expuse în lucrare pot fi folosite ca suport de referință în programele de ameliorare și strategiile de conservare ale speciei. Totodată, acestea reprezintă material științifico-didactic pentru cursurile de fiziologie a plantelor, biochimie, biologie moleculară și biostatistică.

ABSTRACT

Mutu Ana – "Structural and functional diversity in *Origanum vulgare* L.", PhD thesis in Biological Sciences, Chişinău, 2020.

Structure of the thesis: The thesis include introduction, 7 chapters, general conclusions and recommendations, 291 references, 136 basic text pages, 25 tables, 45 figures and 9 annexes. The obtained results are published in 14 scientific papers.

Key words: *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L., inter- and intrapopulational diversity, molecular markers, chemotype, terpene synthase, secondary metabolism.

The aim of the paper is to study the structural and functional diversity of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* plants in the spontaneous flora of the Republic of Moldova (Orheiul Vechi reserve) in terms of correlative indexes of growth and development, as well aspects of the transcription activity of terpene synthases and accumulation secondary metabolites.

Objectives of the research: highlighting the morphological and physiological peculiarities of the *O. vulgare* ssp. *vulgare*; evaluation of intraspecific molecular polymorphism by RAPD and EST-SSR genotyping; study of the variability of secondary metabolism compounds and the determination of the volatile oil chemical profile; estimating transcriptional activity of genes encoding terpenic synthases involved in the biosynthesis of secondary metabolite products; identifying the correlative peculiarities of morphological, molecular-genetic, biochemical and physiological diversity of *O. vulgare* ssp. *vulgare* plants in the native natural habitat.

Scientific novelty and originality. Comprehensive genetic and molecular research on the biosynthesis of the main biochemical compounds of essential oil of *O. vulgare* have been performed. The studies have highlighted the level of expression of the genes involved in terpene synthesis pathways and the evaluation of subpopulations of *O. vulgare* ssp. *vulgare* the belonging from spontaneous flora of the Republic of Moldova. Thus, the analytical approach to the integration of biological information (morphological, biochemical and molecular data), becomes essential for the study of the species and gives to breeders a special perspective, referring to the elucidation of the mechanisms underpinning the economically relevant characters.

The most important solved scientific problem consist in the *fundamentation* of the knowledge regarding the structural-functional diversity of the plants of *O. vulgare* ssp. *vulgare* from the native spontaneous flora, *which allowed*, the identification of the high level of the morphological, molecular-genetic and physiological variability, within the population of the natural habitat, *indicating* on an increased capacity to adapt to the environmental conditions and on the exploitation of a biological potential for the conservation of the vegetal resource of *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Theoretical significance. The carried out investigations provided substantial scientific information on the morphological, molecular and biochemical variability of *O. vulgare* ssp. *vulgare* from a previously unexplored geographic area. Also, the concluding findings with regard to the expression profile of 7 terpene synthase, the correlative associations with terpene content and their derivatives have theoretical contributions to elucidating the biosynthesis and biochemical interconnection processes of the secondary metabolites.

Applicative value of the work. The information has been obtained by correlative association of morphological, biochemical and physiological parameters provides the primary scientific support for the development of further investigations with potential technological transfer. Compounds (terpenes), morphological and molecular features (RAPD, SSR fingerprints) have been identified with potential for discrimination and plant authentication, essential elements in marker-assisted selection. Genotypes with a wide genetic diversity and high content in secondary metabolites identified from spontaneous flora may be promoters in programs to efficiently harness the plant resource of *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Implementation of scientific results. RAPD, EST-SSRs markers, and primers developed to determine the level of expression of terpene synthase genes are used in the study of *O. vulgare* in the Center of Functional Genetics and are recommended for subsequent genetic and molecular studies. The results can be used as reference support in breeding programs and strategies of species conservation. At the same time, they represent scientific-didactic material for plant physiology courses, biochemistry, molecular biology and biostatistics.

АННОТАЦИЯ

Муту Ана «Структурное и функциональное разнообразие *Origanum vulgare* L.», диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинев, 2020.

Структура диссертации: Работа включает введение, семь глав, общие выводы и рекомендации, библиографию из 291 источника, 9 приложений, 136 основных текстовых страниц, 45 рисунков, 25 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 14 научных работах.

Ключевые слова: *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L., меж- и внутривидовая популяционная изменчивость, молекулярные маркеры, хемотип, терпен-синтетаза, вторичный метаболизм.

Целью работы является изучение структурно-функционального разнообразия *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* из спонтанной флоры Республики Молдова (заповедник «Старый Орхей») с точки зрения корреляционных показателей роста и развития, а также аспектов транскрипционной активности терпен-синтетаз и накопление вторичные метаболитов.

Задачи исследования: выявление морфологических и физиологических особенностей местных растений *O. vulgare* ssp. *vulgare*; внутривидового молекулярного полиморфизма с помощью RAPD и EST-SSR генотипирования; изучение разнообразия компонентов вторичного метаболизма и определение химического профиля эфирного масла; оценка транскрипционной активности генов, кодирующих терпен-синтетазы, участвующих в биосинтезе продуктов вторичного метаболизма; выявление корреляционных особенностей морфологического, молекулярно-генетического, биохимического и физиологического разнообразия растений *O. vulgare* ssp. *vulgare* из спонтанной флоры.

Новизна и научная оригинальность. Проведены комплексные генетические и молекулярные исследования биосинтеза основных биохимических соединений эфирного масла *O. vulgare*. Исследования позволили выявить уровень экспрессии генов, участвующих в путях синтеза терпенов, и оценить субпопуляций *O. vulgare* ssp. *vulgare* из спонтанной флоры Республики Молдова. Таким образом, аналитический подход к интеграции биологической информации (морфологических, биохимических и молекулярных данных) становится необходимым для изучения видов и дает селекционерам особую перспективу, касающуюся выяснения механизмов, лежащих в основе экономически значимых признаков. **Решенная научная проблема** заключается в обосновании знаний о структурно-функциональном разнообразии растений *O. vulgare* ssp. *vulgare* из спонтанной флоры, что позволило выявить высокий уровень морфологической, молекулярно-генетической и физиологической изменчивости в популяции, указывающий на повышенную способность адаптироваться к условиям окружающей среды и использование биологического потенциала для сохранения растительного ресурса *O. vulgare* ssp. *vulgare*. **Теоретическая значимость.** Проведенные исследования предоставили существенную научную информацию о морфологической, молекулярной, биохимической и физиологической изменчивости *O. vulgare* ssp. *vulgare* из ранее не изученного географического района. Кроме того, заключительные результаты, касающиеся профиля экспрессии семи терпен-синтетаз, корреляционных связей с содержанием терпенов, вносят теоретический вклад в выяснение процессов биосинтеза и биохимической взаимосвязи вторичных метаболитов. **Прикладная ценность работы.** Информация, полученная путем корреляционной связи морфологических, молекулярных, биохимических и физиологических параметров, обеспечивает первичную научную поддержку для развития дальнейших исследований с технологической передачей. Соединения (терпены), морфологические и молекулярные особенности (RAPD, SSR) были идентифицированы с возможностью дискриминации и аутентификации растений, которые являются важными элементами в селекции. Генотипы с широким генетическим разнообразием и высоким содержанием вторичных метаболитов, идентифицированных из спонтанной флоры, могут быть продвинуты в программах для эффективного использования растительного ресурса *O. vulgare* ssp. *vulgare*. **Внедрение научных достижений.** Маркеры RAPD, EST-SSR и праймеры, разработанные для определения уровня экспрессии генов терпен-синтетаз, используются при исследовании *O. vulgare* в Центре Функциональной Генетики и рекомендуются для последующих генетико-молекулярных исследований. Результаты, изложенные в работе, могут быть использованы в программах селекций и стратегиях сохранения вида. В то же время они представляют собой научно-образовательный материал для курсов физиологии растений, биохимии, генетики и биостатистики.

MUTU ANA

**DIVERSITATEA STRUCTURALĂ ȘI FUNCȚIONALĂ
LA *ORIGANUM VULGARE* L.**

164.02. – FIZIOLOGIE VEGETALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 19 decembrie 2019

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj 40 ex.

Coli de tipar: 2,0

Comanda nr.

Print-Caro SRL, str. Astronom N. Donici, 14, Chișinău