

**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)

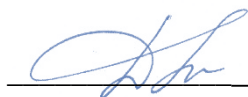
MUTU ANA

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

164.02. – FIZIOLOGIE VEGETALĂ

Teză de doctor în științe biologice

Conducători științifici

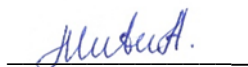


DUCA Maria
doctor habilitat în științe biologice,
profesor universitar,
academician



GILLE Elvira
doctor în științe biologice,
profesor universitar

Autor



MUTU Ana

CHIȘINĂU, 2020

© Mutu Ana, 2020

CUPRINS

ADNOTARE (română, engleză, rusă)	5
LISTA ABREVIERILOR	8
LISTA TABELELOR	9
LISTA FIGURILOR	10
INTRODUCERE	12
1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND STUDIUL SPECIEI <i>ORIGANUM VULGARE</i> L. CA PLANTĂ MEDICINALĂ ȘI AROMATICĂ	17
1.1. Distribuție, conservare, cultivare și utilizare comercială	17
1.2. Diversitatea morfologică, biochimică și molecular-genetică a speciei <i>O. vulgare</i>	24
1.3. Particularități distinctive ale metabolismului secundar la specia <i>O. vulgare</i>	35
1.4. Concluzii la capitolul 1	41
2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE	42
2.1. Materialul de studiu și condițiile de colectate	42
2.2. Metodele de cercetare	43
2.3. Concluzii la capitolul 2	52
3. STUDIUL MORFOLOGIC COMPARATIV AL PLANTELOR DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i>	53
3.1. Caracteristica particularităților fenotipice ale plantelor din flora spontană și colecție	53
3.2. Estimarea coeficientului de variație și corelație a parametrilor morfologici	58
3.3. Identificarea caracterelor morfologice cu cea mai mare contribuție în diversitatea intra- și interpopulațională	61
3.4. Concluzii la capitolul 3	68
4. DIVERSITATEA MOLECULARĂ INTRA- ȘI INTERPOPULAȚIONALĂ LA SPECIA <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i>	70
4.1. Genotiparea cu markeri RAPD	70
4.2. Variabilitatea secvențelor microsatelite (EST-SSR)	72
4.3. Stabilirea relațiilor molecular-genetice dintre subpopulațiile speciei <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	83
4.4. Concluzii la capitolul 4	90
5. VARIABILITATEA FITOCHIMICĂ A PLANTELOR DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i> DIN FLORA SPONTANĂ	93
5.1. Analiza calitativă a extractelor vegetale	94
5.2. Evaluarea cantitativă a substanțelor biologic active	95

5.3. Compoziția chimică a uleiului volatil de <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	98
5.4. Concluzii la capitolul 5	107
6. ACTIVITATEA TRANSCRIȚIONALĂ A UNOR GENE CE CODIFICĂ TERPEN-SINTETAZE	109
6.1. Analiza terpen-sintetazelor în băncile de gene	110
6.2. Activitatea transcripțională a monoterpen-sintetazelor	113
6.3. Activitatea transcripțională a sesquiterpen-sintetazelor	117
6.4. Concluzii la capitolul 6	122
7. PARTICULARITĂȚI CORELATIVE ALE DIVERSITĂȚII MOLECULAR-GENETICE, BIOCHIMICE ȘI MORFOLOGICE A PLANTELOR DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> SSP. <i>VULGARE</i>	123
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	135
BIBLIOGRAFIE	137
ANEXE	160
Anexa 1. Parametrii morfologici ai subpopulațiilor speciei <i>O. vulgare</i> .ssp. <i>vulgare</i>	160
Anexa 2. Coeficienții de corelație <i>Pearson</i> între parametrii morfologici la cele 10 subpopulații	161
Anexa 3. Frecvența alelelor locilor EST-SSR la plantele de <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	162
Anexa 4. Exemple de profile EST-SSR la plantele de <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	164
Anexa 5. Amprente moleculare EST-SSR	166
Anexa 6. Valori generate de ACP privind genotiparea cu EST-SSR	167
Anexa 7. Expresia relativă a genelor <i>TPS</i> la <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> , unități convenționale ..	168
Anexa 8. Act de implementare a rezultatelor științifice în instruire	169
Anexa 9. Act de implementare a rezultatelor științifice în cercetare	170
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	171
CV-UL AUTORULUI	172

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 șapte 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 Genetic 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 seven 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, 7 глав, общие выводы и рекомендации, библиографию из 291 источников, 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 внутривидовое разнообразие, 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 оценку 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.

LISTA ABREVIERILOR

ACP	Analiza Componentelor Principale
AGE	electroforeza în gel de agaroză (<i>Agarose Gel Electrophoresis</i>)
BLAST	instrumentul de căutare a aliniamentului local de bază (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CSS	Cromatografie pe Strat Subțire (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
CTAB	bromură de cetiltrimetilamoniu (<i>Cetyltrimethyl Ammonium Bromide</i>)
EDTA	acidul etilendiaminetetraacetic (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EHW	Echilibrul <i>Hardy-Weinberg</i>
EST	secvențe expresate marcate (<i>Expressed Sequence Tags</i>)
FPP	farnesil pirofosfat (<i>Farnesyl Pyrophosphate</i>)
GBNI	Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”
GC-MS	Cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectroscopie de masă (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GPP	geranil pirofosfat (<i>Geranyl Pyrophosphate</i>)
HPLC	cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
NCBI	Centrul Național pentru Informații Biotehnologice (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
PAGE	electroforeza în gel de poliacrilamidă (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	perechi de baze
PCR	reacția de polimerizare în lanț (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PIC	conținutul informației polimorfe (<i>Polymorphic Information Content</i>)
PMA	Plante Medicinale și Aromatice
RAPD	ADN polimorf amplificat arbitrar (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RT-qPCR	reacția de polimerizare în lanț în timp real sau cantitativă (<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SBA	Substanțe Biologic Active
SSR	repetări de secvențe scurte (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
TAE	Tris-Acetate-EDTA (<i>Tris-Acetate-Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA (<i>Tris-Borate-Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
TPS	Terpen-sintetază (<i>Terpene Synthase</i>)
UPGMA	metoda de grupare a perechilor neponderate în baza mediilor aritmetice (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>)
UV	raze ultraviolete (<i>Ultraviolet</i>)

LISTA TABELELOR

	pag.
Tabelul 1.1. Taxonomia genului <i>Origanum</i> L. după Ietswaart J. H. (1980)	18
Tabelul 1.2. Tipurile de trihome capitate întâlnite în familia <i>Lamiaceae</i>	27
Tabelul 2.1. Primerii utilizați pentru analiza RAPD	48
Tabelul 2.2. Primerii utilizați pentru analiza EST-SSR	49
Tabelul 2.3. Primerii utilizați în identificarea secvențelor codificatoare a genelor de interes	50
Tabelul 3.1. Coeficientul de variație a valorilor medii a parametrilor morfologici la subpopulațiile de <i>O. vulgare</i> din flora spontană (Or1-Or7)	59
Tabelul 3.2. Coeficientul de variație a valorilor medii a parametrilor morfologici la subpopulațiile de <i>O. vulgare</i> din colecția GBNI (Ch8-Ch10)	59
Tabelul 3.3. Coeficienții de corelație <i>Pearson</i> între parametrii morfologici la cele zece subpopulații de <i>O. vulgare</i> studiate	61
Tabelul 3.4. Valorile contribuției (%) parametrilor în cadrul componentelor principale (CP1-CP4) ale analizei ACP	64
Tabelul 4.1. Particularități ale 11 secvențe microsatelite analizate la specia <i>O. vulgare</i>	76
Tabelul 4.2. Indici de diversitate alelică în baza primerilor EST-SSR	77
Tabelul 4.3. Valorile parametrilor diversității moleculare în baza locilor microsateliți la nivel de subpopulație/populație	80
Tabelul 4.4. Estimarea unor indici de diversitate inter- și intrapopulațională	82
Tabelul 4.5. Combinațiile de variabile corelate cu primele componente principale (CP)	86
Tabelul 5.1. Conținutul de polifenoli și flavonoide (g/100 g s.u.) determinat spectrofotometric în extractele vegetale de <i>O. vulgare</i>	96
Tabelul 5.2. Conținutul de polifenoli și flavonoide determinat prin HPLC (mg/100 g s.u.)	97
Tabelul 5.3. Compuși volatili identificați prin GC-MS la <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	99
Tabelul 5.4. Compuși sesquiterpenici identificați prin GC-MS la <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	100
Tabelul 5.5. Monoterpenele cu un conținut mai mare de 1%	101
Tabelul 5.6. Sesquiterpenele cu un conținut mai mare de 1%	102
Tabelul 6.1. EST-uri de interes și gradul de similaritate al acestora cu alte secvențe genice	111
Tabelul 7.1. Valorile coeficienților de corelație <i>Spearman</i> (r_s) între parametrii morfologici cu conținutul a 9 compuși terpenici	125
Tabelul 7.2. Valorile coeficienților de corelație <i>Spearman</i> (r_s) între conținutul sumar al compușilor terpenici cu cel al transcripților sintetizați în frunze	127
Tabelul 7.3. Valorile coeficientului de corelație <i>Spearman</i> (r_s) între conținutul monoterpenelor și cel al transcripților genelor studiate	128
Tabelul 7.4. Valorile coeficientului de corelație <i>Spearman</i> (r_s) între conținutul sesquiterpenelor și cel al transcripților genelor studiate	129

LISTA FIGURILOR

	pag.
Fig. 1.1. Distribuția geografică a speciei <i>Origanum vulgare</i> L.	19
Fig. 1.2. Morfologia schematică a trihomelor glandulare la genul <i>Origanum</i> L.	27
Fig. 1.3. Principalii compuși terpenici identificați în uleiul esențial de <i>O. vulgare</i>	37
Fig. 1.4. Compuși polifenolici identificați în extractele vegetale de <i>O. vulgare</i>	38
Fig. 2.1. Curbe de calibrare pentru compușii biochimici identificați în extractele vegetale	45
Fig. 2.2. Exemplu de cromatogramă HPLC obținută la specia <i>O. vulgare</i> (Or1)	46
Fig. 2.3. Exemplu de cromatogramă GC-SM la uleiul volatil de <i>O. vulgare</i> (Or1)	47
Fig. 3.1. Fenotipul plantelor speciei <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> din flora spontană	54
Fig. 3.2. Variabilitatea culorii florilor la subpopulațiile de <i>O. vulgare</i> studiate	54
Fig. 3.3. Cele zece subpopulații de <i>O. vulgare</i> luate în studiu	55
Fig. 3.4. Variația parametrilor morfologici la cele 10 subpopulații de <i>O. vulgare</i>	56
Fig. 3.5. Valorile medii ale coeficientului de variație (V, %) la populația prelevată din flora spontană (A) și din colecție (B)	60
Fig. 3.6. Valorile proprii și procentul din varianța totală explicată de CP	62
Fig. 3.7. Corelații între variabile și componentele principale	63
Fig. 3.8. Coordonatele observațiilor (subpopulațiilor) și a variabilelor (parametrii morfometrici) pe dimensiunile ACP (axele CP1 și CP2, post-rotatie)	64
Fig. 3.9. Coordonatele observațiilor (subpopulațiilor) și a variabilelor (parametrii morfometrici) pe dimensiunile ACP (axele CP3 și CP4, post-rotatie)	65
Fig. 3.10. Dendrograma obținută în baza valorilor medii ale parametrilor morfologici	66
Fig. 4.1. Numărul de ampliconi specifici și polimorfi generați prin RAPD	71
Fig. 4.2. Exemple de profile RAPD obținute pentru specia <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	72
Fig. 4.3. Frecvența alelelor locilor EST-SSR în populația din flora spontană (A) și a celei din colecție (B)	78
Fig. 4.4. Analiza varianței moleculare (AMOVA) a subpopulațiilor speciei <i>O. vulgare</i>	81
Fig. 4.5. Valorile proprii și procentul din varianța totală explicată de CP	84
Fig. 4.6. Corelații între variabile și componentele principale	85
Fig. 4.7. Contribuția (%) variabilelor pe componentele principale	87
Fig. 4.8. Coordonatele observațiilor (scorurile factoriale) în ACP pre- și post-rotatie	88
Fig. 4.9. Vizualizarea proiecției variabilelor (frecvența alelelor) și a subpopulațiilor	89
Fig. 4.10. Repartizarea clusteriană a subpopulațiilor de <i>O. vulgare</i> în baza locilor microsatețiți	90
Fig. 5.1. Cromatogramele pe strat subțire pentru flavonoide, acizi polifenolcarboxilici (A) și compuși triterpenici (B) în subpopulațiile naturale de <i>O. vulgare</i>	95
Fig. 5.2. Ponderea procentuală a acizilor polifenolcarboxilici în conținutul de polifenoli totali a extractelor vegetale de <i>O. vulgare</i>	96
Fig. 5.3. Monoterpenele și sesquiterpenele identificate prin GC-MS	100
Fig. 5.4. Compuși terpenici în extractele vegetale de <i>O. vulgare</i> (concentrații $\geq 2\%$)	103
Fig. 5.5. Compușii terpenici cu contribuție procentuală mare în variabilitatea chimică a subpopulațiilor de <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	104

Fig. 5.6.	Variația concentrației de sesquiterpene în extractele vegetale de <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> (flora spontană) în funcție de regiunea geografică	107
Fig. 6.1.	Căile metabolice de formare a compușilor terpenici și sintetazele implicate în proces (după Chen F., 2011)	112
Fig. 6.2.	Activitatea transcripțională a genei <i>Ovtps1</i> (GU385980) în frunze (A) și flori (B)	114
Fig. 6.3.	Activitatea transcripțională a genei <i>Ovtps2</i> (GU385978) în frunze (A) și flori (B)	115
Fig. 6.4.	Activitatea transcripțională a genei <i>Ovtps5</i> (GU385971) în frunze (A) și flori (B)	116
Fig. 6.5.	Activitatea transcripțională a genei <i>Ovtps7</i> (GU385967) în frunze (A) și flori (B)	116
Fig. 6.6.	Activitatea transcripțională a genei <i>Ovtps3</i> (GU385976) în frunze (A) și flori (B)	117
Fig. 6.7.	Activitatea transcripțională a genei <i>Ovtps4</i> (GU385974) în frunze (A) și flori (B)	118
Fig. 6.8.	Activitatea transcripțională a genei <i>Ovtps6</i> (GU385970) în frunze (A) și flori (B)	119
Fig. 6.9.	Profilul general de co-expresie a terpen-sintetazelor în frunze și flori (A) și distribuția subpopulațiilor în baza activității de transcripție a <i>EST</i> -urilor studiate (B)	120
Fig. 7.1.	Analiza corelativă a parametrilor morfologici și a compușilor terpenici identificați în uleiul volatil de <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	124
Fig. 7.2.	Analiza corelativă a datelor moleculare (frecvența alelelor) între conținutul compușilor terpenici (A) și a transcripțiilor <i>EST</i> (B)	127
Fig. 7.3.	Analiza corelativă între conținutul compușilor terpenici și al transcripțiilor <i>EST</i>	130

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei

Plantele medicinale și aromatice (PMA) reprezintă surse inepuizabile și accesibile de principii bioactive. Acestea asigură valențele de utilizare multiplă în industria farmaceutică, nutraceutică, cosmetologie, fapt ce condiționează cererea crescândă în materie primă la nivel global. Conform Organizației Mondiale a Sănătății, 80% din populația țărilor în curs de dezvoltare utilizează medicina tradițională. Aproximativ 25% din constituenții medicamentelor de generație nouă reprezintă compuși de origine vegetală [290]. Sporirea numărului de persoane care optează pentru tratamentul naturist, precum și al companiilor care se ocupă de procesarea PMA, determină exploatarea necontrolată a plantelor din flora spontană.

Pe teritoriul Republicii Moldova se întâlnesc aproximativ 350 de specii de PMA [24], majoritatea dintre care sunt incluse în Cartea Roșie. Investigațiile PMA, la nivel național, actualmente sunt direcționate spre studiul biochimic al extractelor vegetale, crearea și menținerea colecțiilor de germoplasmă, obținerea și evaluarea genotipurilor noi de PMA, elaborarea hibridilor adaptați la condițiile de cultivare din Republica Moldova etc.

Printre speciile de PMA de importanță economică majoră se enumeră *Origanum vulgare* L. (familia *Lamiaceae*), care se caracterizează printr-un conținut înalt de uleiuri esențiale cu compoziție variată și proprietăți curative multiple. Specia *O. vulgare* reprezintă o plantă erbacee aromatică, originară din zona mediteraneană, care are o suprafață foarte mare de distribuție: Europa, Asia, Africa de Nord, America de Nord etc. În ultimii ani, această plantă a atras tot mai mult atenția consumatorilor datorită proprietăților antimicrobiene, antifungice și antioxidante care se aplică, preferențial, în scopuri terapeutice, fapt ce a determinat creșterea solicitărilor pe piața mondială [27, 191, 201, 213, 241, 243, 271]. În cadrul Programului European de Cooperare pentru Resursele Genetice ale Plantelor (ECPGR MAP), specia a fost inclusă în lista „*Priority Species*” a PMA din Europa [245].

În Europa, numeroase specii de PMA întrebuințate în scop comercial sunt prelevate din populațiile biocenozelor native. În literatura de specialitate se observă o tendință de sporire a investigațiilor molecular-genetice complementar la cele biochimice, în scopul identificării unor genotipuri valoroase în flora spontană și introducerii acestora în cultură [166, 219, 229, 230, 231, 256]. Aceste realități impun elaborarea unor strategii eficiente de conservare a diversității speciilor de interes, corelate cu gestionarea sustenabilă a resurselor naturale, amprentarea genetică a populațiilor naturale, identificarea rolului lor în funcționarea ecosistemelor și a valorii economice etc. [16].

Este cunoscut faptul că factorii ambientali și condițiile de creștere a plantelor influențează considerabil calitatea și cantitatea principiilor active. În multe cazuri, schimbările de mediu induc capacitatea de a genera un răspuns fenotipic imediat, cu rol esențial în apariția polifenismului

determinat ecologic în cadrul populației, iar ulterior și a diferențierii genetice. Prin diverse investigații realizate pe parcursul a mai multor ani s-a constatat un nivel înalt de variabilitate morfologică [128], genetică [41] și chimică [150, 239] a plantelor speciei *O. vulgare* din diferite habitate, fapt care a determinat necesitatea unei diferențieri și clasificări consacrate. Dintre cele șase subspecii existente subspecia *hirtum* este pe larg valorificată în scopuri fitoterapeutice și alimentare, datorită în special compușilor *carvacrol*, *timol*, *p-cimen* și *terpinen* (monoterpene) din uleiul esențial. Subspecia *O. vulgare* ssp. *vulgare* răspândită în majoritatea țărilor europene (habitatul natural) este mai puțin studiată, fiind caracterizată de o compoziție chimică a uleiului volatil bogată în sesquiterpene. În habitatul natural al Republicii Moldova, se întâlnește ssp. *vulgare* și numeroase varietăți ale acesteia în dependență de condițiile climaterice [8, 19]. Din anul 2000, specia a fost introdusă în cultura comercială fiind documentate culturi pe suprafețe industriale (de peste 300 ha, în zonele de centru și de nord), preponderent ssp. *hirtum* și *vulgare*. Plantele indigene de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din Republica Moldova sunt caracterizate printr-o distribuție limitată și surse reduse de materii prime fiind și mai puțin studiate spre deosebire de alte țări în care sunt pe larg explorate științific și economic [74, 182, 219]. Investigațiile asupra ssp. *vulgare* care până nu de mult se bazau preponderent pe descrierea sistematică, ecologică, răspândirea geografică, actualmente includ abordări molecular-genetice și biochimice de studiu, creând posibilitatea obținerii direcționate a substanțelor biologice active (SBA) de interes industrial. Pentru a caracteriza variabilitatea diferitor populații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* cu importanță agro-economică pe scară largă sunt utilizați markerii moleculari și biochimici [73].

Deoarece diferențele fenotipice nu întotdeauna se bazează pe schimbări genetice ereditare, fiind determinate de condițiile pedoclimatice, cele mai eficiente metode de apreciere a polimorfismului sunt metodele de analiză moleculară (RFLP, RAPD, AFLP, SSR etc.). Variația moleculară existentă în cadrul populațiilor de *O. vulgare* indigene, consecință a recombinării genetice și mutațiilor, a fluxului de gene intra- și interpopulațional, a derivei și eroziunii genetice, constituie baza adaptării la condițiile de mediu și totodată condiția esențială pentru menținerea populației și supraviețuirea subspeciei. Flora spontană este o sursă valoroasă de variabilitate molecular-genetică, morfologică și fitochimică iar valorificarea trebuie să fie realizată prin corelarea cercetărilor fundamentale, botanice, biochimice, moleculare etc., care să argumenteze științific calitatea deosebită și eficiența economică a acesteia. Reieșind din rezultatele analizelor morfologice, biochimice și molecular-genetice efectuate în studiul de față și din cele raportate anterior, de mare interes științific sunt resursele vegetale de *O. vulgare*, care s-au format în condiții ecologice de limită, caracterizate prin cantități reduse de precipitații și perioade de secetă și situate la altitudini mici. Evaluarea structurii moleculare inter- și intrapopulaționale a subspeciei prin aplicarea markerilor moleculari poate contribui hotărâtor la evaluarea impactului schimbărilor climatice din trecut, la identificarea și conservarea populațiilor

valoroase. Studiile corelative fenotipice, biochimice și de fiziologie moleculară expuse în această lucrare pot servi ca platformă pentru valorificarea eficientă a speciei, obținerea direcționată a SBA de interes industrial și conservarea germoplasmei de *O. vulgare* ssp. *vulgare* endemice.

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 de *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), analiza 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*”

Sumarul tezei

Lucrarea cuprinde adnotarea prezentată în limbile – română, engleză și rusă, lista abrevierilor, tabelelor și figurilor, introducere, șapte capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie, declarația privind asumarea răspunderii și CV.

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

În **Capitolul I** se prezintă o sinteză comparativă a cercetărilor efectuate în domeniul plantelor medicinale și aromatice. Se analizează importanța corelării studiilor fenotipice, biochimice și de biologie moleculară în vederea identificării, ameliorării și introducerii în cultură a formelor noi de PMA cu caractere economic valoroase.

Astfel, în cadrul acestui capitol s-au urmărit următoarele aspecte:

- *încadrarea sistematică, răspândirea și valoarea economică a speciei O. vulgare;*
- *sinteza cercetărilor privind diversitatea morfologică, biochimică și molecular-genetică a speciei;*
- *evidențierea particularităților distinctive ale metabolismului secundar la O. vulgare.*

Capitolul II cuprinde informația privind caracteristica și condițiile de colectare a materialului biologic. Conține descrierea metodologiei utilizate pentru realizarea studiului: metode morfologice (morfometrice), biochimice (spectrofotometrice și cromatografice), metode de biologie moleculară (extragerea ADN, ARN-ului, cuantificarea și electroforeza PAGE și AGE) pentru amprentarea moleculară prin genotipare RAPD și EST-SSR privind estimarea polimorfismului, descrierea variabilității și determinarea expresiei genelor realizată prin PCR cantitativ precedat de transcripția inversă, în baza ARN-ului obținut de la plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Capitolul III prezintă investigațiile realizate la nivel intra- și interpopulațional, urmărind:

- *particularitățile distinctive ale fenotipului plantelor de O. vulgare în baza analizelor biometrice macroscopice;*
- *identificarea și cuantificarea relațiilor de asociere dintre caracterele morfologice cantitative;*
- *estimarea contribuției parametrilor morfologici în diferențierea subpopulațiilor de O. vulgare.*

În **Capitolul IV** au fost realizate cercetări la nivel molecular în scopul determinării unei corelații între variațiile morfologice intraspecifice și profilele ADN la plantele autohtone de *O. vulgare* ssp. *vulgare* luate în studiu, fiind trasate următoarele obiective specifice:

- *amprentarea moleculară a plantelor de O. vulgare în scopul identificării polimorfismului molecular;*
- *identificarea locilor și a variantelor alelice cu contribuții semnificative în diferențierea molecular-genetică a subpopulațiilor din flora spontană și din colecție;*
- *analiza structurii moleculare a două populații de O. vulgare ssp. vulgare..*

Capitolul V este consacrat cercetării variabilității biochimice a extractelor vegetale de *O. vulgare ssp. vulgare* din flora spontană, în scopul identificării unor chemovarietăți/forme cu caracteristici valoroase, care ar putea servi ca surse autohtone de ulei esențial sau extracte vegetale bogate în principii bioactive, pentru a fi incluse în potențialele programe de ameliorare a culturilor PMA. În acest context, obiectivele specifice au fost:

- *identificarea unor compuși nevolatili (flavonoide și fenoli) cu proprietăți antioxidante;*
- *analiza cantitativă a compușilor polifenolici prin metode cromatografice și spectrofotometrice;*
- *determinarea amprentei gaz-cromatografice a uleiului volatil de O. vulgare ssp. vulgare și stabilirea chemovarietății plantelor din habitatul natural al rezervației naturale Orheiul Vechi.*

Capitolul VI relevă cercetările transcriptomice asupra subpopulațiilor de *O. vulgare ssp. vulgare* prelevate din flora spontană a Republicii Moldova (rezervația Orheiul Vechi), inclusiv:

- *analiza informației privind terpen-sintetazele în băncile de gene;*
- *cuantificarea nivelului de transcripti a genelor monoterpen-sintetaze (Ovtps1, Ovtps2, Ovtps5, Ovtps7);*
- *cuantificarea nivelului de transcripti a genelor sesquiterpen-sintetaze (Ovtps3, Ovtps4, Ovtps6).*

Capitolul VII reprezintă un capitol de sinteză a datelor în care s-a identificat congruența matricilor de disimilaritate a parametrilor analizați. Acest capitol completează cu elemente relevante informațiile, analizate în prezenta lucrare, atât în aspectul cunoașterii structurii molecular-genetice a populației de *O. vulgare* indigene și a variabilității fitochimice a unor metaboliți secundari cu rol fiziologic în adaptarea plantelor, cât și în aspect aplicativ al evaluării germoplasmei în perspectiva ameliorării, conservării și exploatării resursei vegetale autohtone de *O. vulgare ssp. vulgare*.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele obținute sunt reflectate în 14 lucrări științifice (inclusiv 5 fără coautori): 7 articole în reviste naționale recenzate, 1 articol în culegeri științifice și 6 comunicări în cadrul unor manifestări științifice naționale și internaționale.

Volumul și structura tezei. Teza include adnotare, introducere, șapte capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia expusă pe 23 de pagini (291 de surse), 45 de figuri și 25 de tabele.

În **Concluzii generale și Recomandări practice** sunt prezentate concluziile studiului de față și a posibilităților de implementare în practică a rezultatelor obținute.

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

Conform Organizației Mondiale a Sănătății, 80% din populația țărilor în curs de dezvoltare utilizează medicina tradițională, ponderea cea mai mare revenind medicamentelor care conțin derivate din plante. Aproximativ 25% din constituenții medicamentelor de generație nouă reprezintă compuși de origine vegetală [290].

Valorificarea PMA nu se poate realiza fără existența unor cercetări fundamentale, morfologice, genetice, biochimice, farmacologice etc., care să argumenteze științific calitatea deosebită și eficiența economică a acestora.

Unul dintre cele mai importante genuri care include un număr vast de specii de PMA este genul *Origanum* L. Cea mai frecvent întâlnită și utilizată specie a genului este *O. vulgare* L., care datorită SBA din uleiul esențial cu acțiuni antioxidantă și antimicrobiană este solicitată în industria farmaceutică, cosmetologie, aromoterapie, culinarie etc. Astfel, în cadrul acestui capitol s-au urmărit următoarele aspecte:

- încadrarea sistematică, răspândirea și valoarea economică a speciei *O. vulgare*;
- sinteza cercetărilor privind diversitatea morfologică, biochimică și molecular-genetică a speciei;
- evidențierea particularităților distinctive ale metabolismului secundar la *O. vulgare*.

1.1. Distribuție, conservare, cultivare și utilizare comercială

Speciile genului *Origanum* L. reprezintă PMA cu o valoare economică și o importanță comercială mare, cunoscute și studiate la nivel mondial [99, 178]. În pofida importanței comerciale semnificative un număr impunător de specii ale acestui gen sunt incluse în lista plantelor rare, amenințate de dispariție, fiind considerate plante endemice. Multe centre internaționale colectează resurse vegetale de *O. vulgare*, în special, pentru scopuri de conservare și cercetare. Cercetările efectuate pe plan mondial evidențiază particularități specifice privind sistematica și morfologia genului, particularitățile fiziologice și relațiile cu factorii de mediu, cât și posibilitățile de ameliorare genetică, precum și de cultivare în diferite sisteme agricole.

Repere taxonomice și distribuție. *Origanum* L. este unul dintre cele mai răspândite și variabile genuri din familia *Lamiaceae* (ordinul *Labiales*). Genul a fost subiectul unor studii taxonomice intense iar până în secolul trecut au fost folosite două concepte diferite de clasificare. Unii autori urmau conceptul original al lui Bentham (1834) și identificau ca genuri separate pe *Amaracus* Benth., *Majorana* Benth. și *Origanum* Benth. Alții au urmat conceptul lui Linnaeus

(1754), care a considerat *Origanum* singurul gen, care includea toate formele cu particularități morfologice similare. Actualmente, reviuul „A taxonomic revision of the Genus *Origanum*” a lui Ietswaart J. H (1980) este acceptat pe scară largă. El a împărțit genul în trei grupuri, zece secțiuni și 38 de specii. Ulterior au fost descrise alte cinci specii crescând numărul total de specii la 43 și 18 hibrizi [78, 79, 94] (Tabelul 1.1).

Tabelul 1.1. Taxonomia genului *Origanum* L. după Ietswaart J. H. (1980)

Grupul	Secțiunea	Număr de specii
A	<i>Amaracus</i> Bentham	7
	<i>Anatolicon</i> Bentham	8
	<i>Brevifilamentum</i> Ietswaart	7
	<i>Longitubus</i> Ietswaart	1
B	<i>Chilocalyx</i> Ietswaart	4
	<i>Majorana</i> Bentham	3
C	<i>Campanulaticalyx</i> Ietswaart	6
	<i>Elongatispica</i> Ietswaart	3
	<i>Origanum</i>	1
	<i>Prolaticorolla</i> Ietswaart	3

Majoritatea speciilor din genul *Origanum* (arbuști, plante anuale, bienale sau perene) sunt distribuite în regiunea mediteraneană, în zone muntoase sau stâncoase, pe soluri adesea calcaroase. Specia, care se include în secțiunea monospecifică *Origanum*, cea mai răspândită pe glob sub denumirea comună de „oregano” (denumire comercială) este *O. vulgare* (sovârf sau maghiran). Aceasta are o distribuție largă în Europa, Asia, Africa de Nord și în America de Nord (Figura 1.1, A, B) [130, 155].

Actualmente în baza caracterelor morfologice specifice (numărul glandelor secretoare, bracteelor, dimensiunea și culoarea bracteelor, a frunzelor și florilor etc.), a compoziției uleiului esențial, cât și a productivității, studiile taxonomice documentează șase subspecii [155]:

1. *O. vulgare* L. ssp. *vulgare*: Europa, Iran, India, China;
2. *O. vulgare* L. ssp. *glandulosum* (**Desfontaines**) Ietswaart: Algeria, Tunisia;
3. *O. vulgare* L. ssp. *gracile* (**Koch**) Ietswaart: Afganistan, Iran, Turcia, Rusia;
4. *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* (**Link**) Ietswaart: Albania, Croația, Grecia, Turcia;
5. *O. vulgare* L. ssp. *viridulum* (**Martrin- Donos**) Nyman: Afganistan, China, Croația, Franța, Grecia, India, Iran, Italia, Pakistan;
6. *O. vulgare* L. ssp. *virens* (**Hoffmannsegg, Link**) Ietswaart: Insulele Azore, Baleare, Canare; Madeira, Maroc, Portugalia, Spania.

Sporirea numărului de persoane care optează pentru tratamentul naturist, cât și al

companiilor care se ocupă de procesarea PMA, determină exploatarea necontrolată a plantelor din flora spontană.

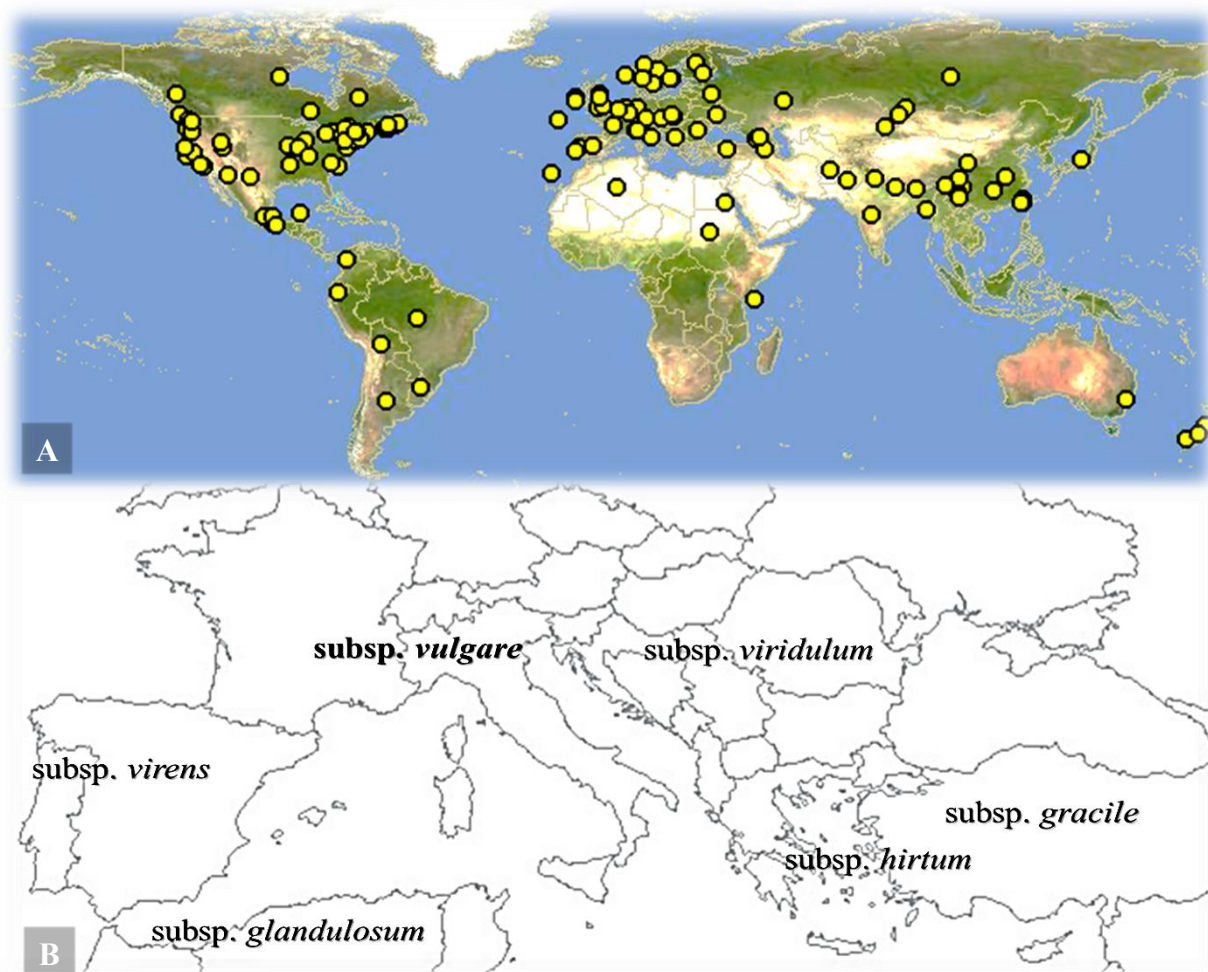


Fig. 1.1. Distribuția geografică a speciei *Origanum vulgare* L.

Notă: A – răspândirea speciei pe glob [287];

B – distribuția după Kokkini S. (1997) a celor șase subspecii de *O. vulgare*.

Aceste realități impun dezvoltarea unor programe de selecție, ameliorare și conservare a germoplasmei pe baze științifice temeinice, care ar contribui într-o anumită măsură și la stoparea eroziunii resurselor genetice vegetale. Astfel de strategii și direcții de cercetare vizează: **conservarea „in situ”** (arii protejate, rezervații științifice și naturale, parcuri naționale etc.) și **„ex situ”** (colecții și bănci de gene, grădini botanice etc.); identificarea biotopurilor care asigură supraviețuirea speciilor cu grad ridicat de vulnerabilitate; descifrarea amprentei genetice a acestor populații; identificarea rolului lor în funcționarea ecosistemelor și a valorii economice; proiectarea experimentelor de restabilire a populațiilor naturale; elaborarea și implementarea unor programe naționale și internaționale cu participarea universităților, grădinilor botanice, stațiunilor de cercetări agricole, horticoale etc.

În Europa, numeroase specii de PMA folosite în scop comercial sunt colectate din populațiile biocenozelor native. În acest context, în literatura de specialitate se observă o tendință de sporire a cercetărilor morfofiziologice corelate cu cele biochimice și molecular-genetice [166, 219, 229, 230, 231, 256] în scopul identificării unor forme valoroase din flora spontană și **introducerea acestora în cultură**.

Specia *O. vulgare* în habitatul natural al Republicii Moldova este puțin studiată, spre deosebire de alte țări în care, plantele de *O. vulgare* indigene, sunt pe larg explorate științific și economic: Albania [113, 140, 141], Italia [75], Tunisia [49, 181, 182], Iran [33, 195, 262], Grecia [29, 155, 269], Ungaria [74], Lituania [186, 219], Polonia [157, 270] etc.

În rezultatul unor studii au fost selectate din flora spontană (Israel și Grecia) două specii: *O. vulgare* și *O. syriacum* și ulterior cultivate (Israel) în scopuri comerciale. Selectarea acestor forme de înaltă calitate a fost rezultatul disponibilității unei mari diversități genetice care caracterizează populațiile naturale de *Origanum* L. În Israel, colecțiile de germoplasmă sunt conservate atât ca plante/material vegetal proaspăt de *O. vulgare*, cât și ca semințe [218].

În rezultatul efectuării unor studii ecologice preliminare privind aclimatizarea dar și proprietățile calitative ale speciilor de *Origanum* sp. a fost introdusă în cultură [169], în peninsula Istria (regiunea de vest a Croației), specia *O. heracleoticum* L. originară din Grecia.

Speciile genului *Origanum* L. au fost utilizate în Turcia încă din cele mai vechi timpuri, înregistrările datează încă din secolul al VII-lea î.Hr. Astfel, în flora spontană a Turciei studiile atestă prezența a 23 de specii de *Origanum* sp. [87, 151]. Cultivarea speciilor este foarte populară în Turcia și în ultimii ani s-a observat o creștere semnificativă a suprafeței dedicate acestei culturi. Cu toate că, Turcia este unul dintre principalii exportatori de *Origanum* sp. din lume, o cantitate mică din această cultură este, de asemenea, utilizată în țară. Cea mai mare cantitate de *Origanum* sp. importă SUA din Turcia, ale cărei importuri corespund aproximativ 50% din totalul exportului turc [169].

Caracteristicile pedoclimatice ale Albaniei relevă condiții ideale pentru răspândirea speciilor de *Origanum* L. în flora spontană, fiind considerată una dintre cele mai importante centre de variabilitate a genului, ca urmare a selecției naturale. În Albania sunt identificate trei specii indigene: *O. vulgare*, larg răspândită în partea de nord a Albaniei; *O. heracleoticum* L. și *O. majorana* răspândite în partea de sud a Albaniei. Ulterior, au urmat cercetări ample realizate asupra speciilor prelevate din flora spontană în scopul identificării varietăților cu caractere economic valoroase [96, 113, 140, 141].

La nivel național extractele vegetale de PMA (familia *Lamiaceae*) cu conținut înalt al SBA reprezintă obiectul investigațiilor, de mai mulți ani, a unor instituții de cercetare și universități,

printre care se enumeră: *Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor* (IGFPP) (Laboratorul Plante Aromatice și Medicinale, Laboratorul Biochimia Plantelor), *Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”* (GBNI) (Laboratorul Resurse vegetale), *Institutul de Chimie* (Centrul Chimie Organică și Biologică), *Universitatea de Stat din Moldova* (Centrul de cercetări Științe ale vieții), *Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”* (Centrul Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale), *Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”* (Centrul Genetică Funcțională) etc. Colaboratorii instituțiilor au realizat diferite cercetări pentru specii și varietăți de plante medicinale în scopul identificării formelor cu proprietăți farmacologice importante și valoare economică înaltă [1, 3, 6, 9, 10, 12, 68, 91, 115, 117].

În flora spontană a Republicii Moldova au fost identificate 28 de genuri și 82 de specii de PMA care aparțin familiei *Lamiaceae* [67]. Printre PMA de cultură sau din flora spontană a Republicii Moldova, care au făcut subiectul celor mai multe investigații ale cercetătorilor autohtoni în special sub aspectul taxonomic, morfologic, biochimic, și mai puțin genetic se numără speciile: *Salvia sclarea* [3, 6, 9], *Ocimum basilicum* [4, 10, 115], *Hyssopus officinalis* [117, 193], *Mentha* sp. [2, 5, 68, 285], *Origanum vulgare* [3, 8, 17, 116, 172].

Conform cercetătorilor autohtoni Negru A. (2007) și Goncariuc M. (2014) în flora spontană a Republicii Moldova se întâlnește specia *O. vulgare* ssp. *vulgare* și numeroase varietăți ale acesteia în dependență de condițiile climaterice. Subspecia este întâlnită atât în flora spontană, cât și cea cultivată. Suprafața cultivată este relativ redusă: în colecțiile particulare, în micile gospodării țărănești, în unitățile de cercetare sau în unele societăți comerciale cu preocupări pentru cultura plantelor medicinale, condimentare sau aromatice [8, 16, 19]. Mențiunile din literatura de specialitate, în acest sens, sunt puține și incomplete, de aceea este oportună efectuarea unor cercetări mult mai ample. Prin aceste cercetări se urmărește introducerea în cultură, în mod sistematizat, prin aplicarea unor tehnologii standard. Astfel, importanța culturii rezultă din importanța alimentară și cea economică, dar și din importanța științifică, referitoare la perenitatea speciei (în arealele de origine). Creșterea valorii economice a speciei se datorează uleiului esențial, ce posedă proprietăți antimicrobiene, citotoxice și antioxidante, condimentare și se aplică, preferențial, în scopuri terapeutice, fapt ce duce la creșterea nivelului de **utilizare comercială**.

O. vulgare este o specie cu o aromă bine cunoscută pentru multe preparate culinare internaționale dar are și proprietăți antioxidante pentru sănătatea omului [48, 98, 203, 213, 216], fapt datorat conținutului de ulei esențial în părțile aeriene ale plantei, cât și a compoziției uleiului esențial. Calitățile senzoriale unice și efectele preparatelor pe bază de *Origanum* sp. au fost, de asemenea, testate cu succes pentru potențialul de conservare a alimentelor [56, 77, 202].

Mai multe studii *in vivo* au demonstrat eficiența uleiurilor esențiale extrase din *O. vulgare*

pentru înlocuirea promotorilor de creștere în hrana animalelor, care vor fi interzise pentru viitor în Uniunea Europeană [88, 180, 187, 196].

Privind evaluarea potențialului de conservare a speciei *O. vulgare*, o atenție sporită în literatura de specialitate a fost pusă pe cercetarea proprietăților farmacologice promițătoare: antidiabetice, anticarcinogene, antibacteriene, hepatoprotectoare și antioxidante [27, 54, 56, 90, 160, 174, 204, 261], care sunt datorate uleiului esențial extras din plante și sunt dovedite științific prin numeroase studii *in vitro* și *in vivo* [213, 216, 241].

În elaborarea preparatelor cosmetologice s-au depus eforturi substanțiale în identificarea și utilizarea substanțelor de origine naturală. Astfel, descoperirea unor compuși din plante cu proprietăți utile și care pot fi exploatați în formulele cosmetice moderne a mărit interesul față de cultivarea PMA. De exemplu, unele studii au constatat acțiunea inhibitoare asupra procesului de hiperpigmentare a pielii datorită compușilor identificați în uleiul eteric de *O. vulgare*, care ulterior a fost utilizat în industria cosmetică datorită efectului de înălbire a pielii [61, 159].

Proprietatea antifungică a uleiului de *O. vulgare*, asupra dezvoltării unor ciuperci care pot contamina alimentele, a fost demonstrată printr-un studiu în care mediul de cultură a fost tratat cu ulei esențial de 2%. Astfel, activitatea antifungică s-a atestat în cazul tulpinilor de: *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor circinelloides*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus versicolor*, dar a permis creșterea selectivă a *Rhizopus stolonifer* și *Penicillium citrinum* [233]. În baza unor cercetări realizate *in vitro*, rezultatele cărora au contribuit la promovarea medicinei tradiționale, s-a stabilit că uleiul esențial de *O. vulgare* poate prezenta o bună alternativă pentru tratamentul candidozei datorită activității sale antifungice apreciabile asupra speciilor de *Candida* spp. Prin urmare, uleiul de *O. vulgare* poate fi utilizat în calitate de agent antifungic ca remediu naturist și ca o alternativă pentru pacienții alergici la omologii sintetici în tratarea candidozei, fiind accesibil, fezabil din punct de vedere economic și mai puțin toxic [69, 168].

În baza unui spectru larg de studii privind activitatea antibacteriană, *O. vulgare* pare să fie una dintre speciile cu cel mai mare potențial inhibitor. În evaluarea potențialului antimicrobian, care are o importanță deosebită în gastronomie sau în prevenirea unor boli la om, trebuie luați în considerare numeroși factori care influențează eficacitatea uleiului esențial sau a unui extract vegetal. Acești factori includ: originea speciei, concentrația și compoziția uleiului esențial/ extractului vegetal, modul de dispersie a uleiului/ extractului în mediu, concentrația tulpinilor bacteriene testate în mediul de cultură și sensibilitatea acestora, dar și metoda utilizată – *in vitro* sau *in vivo* – pH-ul, temperatura etc. [48, 195].

Un număr destul de mare de lucrări științifice au fost publicate privind proprietățile

antioxidante ale speciei *O. vulgare*. Consumul alimentar al preparatelor de *O. vulgare*, bogate în compuși antioxidanți, determină inhibarea eficientă a radicalilor liberi care sunt generați de căile metabolice din organism și, în cantități suficiente, previne daunele celulare și bolile la om [187, 196, 250, 281]. Studii privind utilizarea potențială a preparatelor pe bază de *O. vulgare* ca protectori ai lipidelor nesaturate în alimentație, relevă posibilitatea înlocuirii substanțelor sintetice, cum ar fi BHT – hidroxitoluen butilat [228]. Cu toate acestea, aplicațiile industriale limitate sunt determinate de aromele caracteristice ale uleiului eteric de *O. vulgare*, care influențează caracteristicile senzoriale ale alimentelor prelucrate, astfel ar fi necesare etape de dezodorizare a uleiului [189] care ulterior își pierde proprietățile antioxidante.

În același context, numeroase studii, în care s-au stabilit efecte antioxidante puternice sau moderate ale speciei în sistemele de model teoretic, au luat în considerare aspectele practice privind utilizarea extractelor vegetale de *O. vulgare* ca stabilizatoare pentru diferite uleiuri comestibile (uleiuri vegetale sau de pește). Astfel, frunzele măcinate de *O. vulgare* au inhibat oxidarea lipidică a uleiului de pește (*Scomber scombrus*) stocat la 40°C în întuneric, la concentrații de 0,5% și la 1%, la fel de eficient ca *BHA* și *TBHQ* (terț-butilhidrochinonă) [260].

Efectele antioxidante ale speciei *O. vulgare* au fost studiate atât prin utilizare directă ca stabilizatori ai grăsimilor, cât și, indirectă, ca aditivi pentru hrana animalelor, în scopul îmbunătățirii duratei de conservare a alimentelor [266].

În cadrul unor cercetări s-au demonstrat că extractele de *O. vulgare* au activitate antivirală sau efecte imunostimulatoare. Cu toate acestea, s-au obținut puține rezultate privind mecanismele de activitate imunomodulatoare. S-a constatat că extractele pe bază de etanol din plantele de *O. vulgare* au inhibat propagarea intracelulară a virusului ECHO (enterovirus) și au prezentat, de asemenea, o activitate de inducere a interferonului *in vitro* [111, 249].

Un amestec de preparate din PMA: rozmarin, salvie, cimbru și sovârf a demonstrat o activitate inhibitorie a infecției cu virusul imunodeficienței umane (HIV) la concentrații foarte scăzute ale virusului [35].

Uleiul esențial de *O. vulgare*, fiind administrat prin alimentație șoarecilor, a indus activitatea glutathion S-transferazei (GST) în diferite țesuturi. Sistemul enzimatic GST este implicat în detoxificarea substanțelor cancerigene chimice și joacă un rol important în prevenirea carcinogenezei, fapt ce ar explica potențialul anticancerigen al uleiului esențial de *O. vulgare*. Acest ulei a prezentat un nivel ridicat de citotoxicitate asupra a patru tipuri de celule, incluzând două derivate de carcinoame (carcinomul laringian și carcinomul de col uterin) [246].

Investigațiile asupra activității insecticide împotriva dăunătorilor nocivi ai plantelor au relevat diverse rezultate [48, 206, 253]. *O. vulgare* este una dintre speciile folosite tradițional în

sudul Franței pentru a controla răspândirea gărgâriței (*Acanthoscelides obtectus*) în culturile de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.) [220]. De asemenea, a fost evaluată toxicitatea compușilor terpenici a uleiului eteric de *O. vulgare* asupra insectelor dăunătoare la porumb (*Sitophilus zeamais*) [52]. Karan T. și colab. într-un studiu recent (2018) a stabilit un efect insecticid, foarte toxic al uleiului esențial de *O. vulgare* prin metoda fumigantă pentru gărgârița orezului (*Sitophilus oryzae*) și cariul cerealelor (*Rhizopertha dominica*). S-a constatat că uleiul esențial este foarte eficient împotriva ambelor specii de insecte. După tratarea *S. oryzae* cu ulei esențial, a fost observată o mortalitate de 72% și 88% la 48 h și respectiv 72 h. În cazul speciei *R. dominica* a fost determinată o mortalitate de 94% și 96% la 48 h și respectiv 72 h. Prin urmare, aceste rezultate sugerează că uleiul esențial de *O. vulgare* poate fi util în depozitarea cerealelor și gestionarea culturilor în câmp [143,144].

Atribute importante ale PMA sunt considerate și proprietățile toxice față de nematozii plantelor, care oferă noi aplicații în domeniul programelor de îngrijire a culturilor în câmp [46, 129, 200].

În timp ce majoritatea speciilor *Origanum* sp. comercializate sunt prelevate în cea mai mare parte încă din flora spontană, apare pericolul eroziunii genetice și dezvoltarea culturilor eterogene, o situație nedorită care ar putea fi schimbată prin extinderea cultivării speciilor cu caractere valoroase. Variabilitatea naturală a speciei *O. vulgare* ne oferă o gamă largă de biotipuri privind selecția și cultivarea ulterioară în programele de reproducere.

1.2. Diversitatea morfologică, biochimică și molecular-genetică a speciei *O. vulgare*

Este cunoscut faptul că factorii ambientali și condițiile de creștere a plantelor medicinale influențează considerabil caracterele morfologice, calitatea și cantitatea substanțelor biologice active etc. În multe cazuri, schimbările de mediu induc capacitatea de a genera un răspuns fenotipic imediat, cu rol esențial în apariția polifenismului determinat ecologic în cadrul populației, iar ulterior și a diferențierii genetice.

Diversitatea lumii vegetale poate fi evaluată prin intermediul markerilor genetici morfologici, biochimici și moleculari [73], ultimii, datorită faptului că sunt linkați direct cu genomul și nu sunt afectați de condițiile de mediu, sunt cele mai eficiente instrumente de analiză. Markerii moleculari sunt utilizați cu succes pentru estimarea polimorfismului molecular (intra- și interspecific), amprentarea varietăților, stabilirea distanțelor genetice, caracterizarea fondului de germoplasmă, selecția asistată de markeri etc. Diversitatea intraspecifică constituie elementul cheie al evoluției plantelor, în măsura în care asigură capacitatea lor de a se adapta la noile condiții de mediu, de a supraviețui și a coloniza habitate de amplitudine ecologică largă [267].

Prin diverse investigații realizate pe parcursul mai multor ani au relevat un nivel înalt de variabilitate morfologică [41, 60, 128, 182], genetică [42, 181, 270] și chimică [75, 150, 166, 187, 188, 239] a plantelor de *O. vulgare* din diferite habitate, fapt care a determinat necesitatea unei diferențieri și clasificări consacrate.

Specia *O. vulgare* se distinge printr-o **diversitate morfologică** și fitochimică pronunțată care creează dificultăți considerabile în programele de ameliorare și explorare a potențialului biosintetic, ceea ce a condus la diferențierea a șase subspecii în clasificarea taxonomică acceptată în prezent [130]. Conceptul actual al clasificării este totuși discutat, deoarece apariția unor diferențe morfologice subtile determină discriminarea taxonomică a subspeciilor [74]. Astfel, a fost elaborată o listă de descriptori pentru caracterele morfologice în scopul facilitării procedurii de discriminare și clasificare a speciilor, subspeciilor, varietăților etc. [99, 128, 178]. Prin utilizarea a celor 27 de descriptori morfologici, au fost analizate șaptezeci de populații de *O. vulgare* colectate din flora spontană montană din 37 de regiuni din Liban, identificând două specii: *O. syriacum* L. și *O. ehrenbergii* Boissier, iar șapte populații au fost considerate varietăți ale speciei *O. syriacum* L. [128]. În baza unui număr mai mare de descriptori (60 de descriptori) a fost evaluată și diversitatea morfologică a populațiilor de *O. vulgare* din Letonia. Parametrii analizați care au accentuat variabilitatea morfologică înaltă a celor 44 de populații au fost: înălțimea plantelor, numărul de ramuri pe plantă, densitatea ramificațiilor, culoarea suprafeței superioare și inferioare a frunzei, densitatea florilor și culoarea corolei [245].

Un alt studiu, realizat pe 26 de populații de *O. vulgare* (ssp. *vulgare* și ssp. *hirtum*) prelevate din câmpul experimental al Universității Agricole din Tirana (Albania) a relevat diferențe morfologice accentuate la nivelul caracterelor: înălțimea plantei, numărul ramurilor, numărul de frunze pe tulpină, numărul internodurilor, densitatea frunzelor, lungimea pețiolului, inflorescenței etc. În baza acestor caractere morfologice cele 26 de populații de *O. vulgare* au fost grupate în cinci clase care s-au caracterizat prin diferite particularități morfologice. Evaluarea caracterelor calitative și cantitative scoate în evidență interacțiunea genotip-fenotip-mediul înconjurător [139].

A fost constatat că variabilitatea morfologică a speciei se manifestă în funcție de poziționarea geografică. Un exemplu de evidențiere a variației morfologice la nivel geografic a speciei *O. vulgare* a fost pus în evidență în flora spontană a Greciei. Dintre cele trei subspecii de *O. vulgare* întâlnite în această țară, ssp. *hirtum* este, în special, răspândită în zonele de insule și sudul continentului, în timp ce în zona nordică a Greciei, caracterizată de un climat continental mediteranean, predomină ssp. *viridulum* și ssp. *vulgare* [155].

În același timp, Andi S. A. și colab. (2011) au studiat populații indigene din zona de Nord

a Iranului, fiind descrise caracteristicile valoroase pentru programele de ameliorare, precum și în scopuri medicinale. S-a evaluat diversitatea morfologică a 144 de genotipuri din douăzeci și patru de populații de *O. vulgare* dintre care ssp. *vulgare* și ssp. *viride*. În acest studiu, au fost evaluate 32 de caractere cantitative și calitative. Prin aplicarea Analizei Componentelor Principale (ACP) a fost evidențiată o pondere de circa 86% a variației în cazul următoarelor caractere: lungimea internodului, frunzelor, inflorescenței, culoarea corolei, lungimea și lățimea caliciului, lungimea pețiolului etc. Rezultatele au arătat corelații semnificative între plantele studiate care demonstrează o mare diversitate în cadrul acestor populații [33].

Variabilitatea intraspecifică a speciei *O. vulgare*, prelevată și din flora spontană a Lituaniei, a fost identificată la nivel fenotipic prin analize morfometrice. Au fost relevate diferențe statistic semnificative pentru majoritatea caracterelor analizate. În baza caracterelor morfologice, populațiile au fost atribuite subspeciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* [219].

O particularitate morfologică destul de importantă a speciei *O. vulgare* este prezența glandelor secretoare de ulei esențial, numite **trihome**. Se cunoaște că din moment ce acestea secretă cea mai mare parte din uleiul esențial, numărul redus de glande este corelat cu un conținut scăzut de ulei volatil.

Trihomele pot fi structuri glandulare și neglandulare cu anatomie diferită și funcții diverse. O trihomă glandulară (peltată și capitată) din punct de vedere structural și funcțional este compusă dintr-o regiune bazală, o regiune tulpină și o regiune cap sau secretorie (regiuni uniceleulare sau multiceleulare) și, în plus, celule epidermice care înconjoară radial regiunea bazală. Structura trihomelor capitate este mult mai simplă decât cea a trihomelor sesile, au o răspândire foarte largă și prezintă o mai mare variabilitate morfologică. Werker E. și colab. (1985) au identificat trei tipuri principale de glande capitate în *Lamiaceae*, tip I (scurt) cu o celulă bazală, 1-2 celule tulpină și 1-2 celule apicale (rotunde, ovoide sau formă de pară), tip II (mediu) cu 1-2 celule tulpină și o celulă apicală (formă de pistil) și de tip III (lung) cu o celulă bazală, 2-5 celule tulpină și o celulă apicală (rotundă). În cadrul familiei *Lamiaceae* pot fi întâlnite trihome de tip I (genul *Satureja*, *Mentha*, *Thymus*, *Coridothymus*, *Rosmarinus*, *Nepeta*) de tip II (*Majorana*, *Micromeria*, *Melissa*, *Origanum*, *Ocimum*, *Calamintha*) sau de tip III (*Salvia*, *Plectranthus*, *Teucrium*). În Tabelul 1.2. sunt prezentate specii din familia *Lamiaceae* cu diferite tipuri de glande capitate distribuite pe suprafața frunzei [275].

Astfel pentru specia *O. vulgare* se disting 2 tipuri de trihome glandulare din cele 3 existente (Figura 1.2, Tabelul 1.2). Comparativ cu trihomele glandulare sesile care sunt considerate a fi implicate exclusiv în producția de uleiuri esențiale, s-a raportat că și celelalte tipuri de trihome identificate în familia *Lamiaceae* secretă ulei esențial [37, 51, 236].

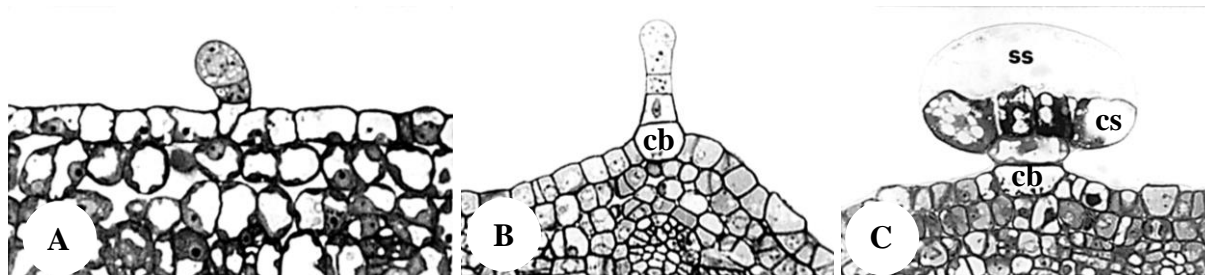


Fig. 1.2. Morfologia schematică a trihomelor glandulare la genul *Origanum* L.

Notă: **A** – Glandă capitată secretoare de tip 1 cu o celulă; **B** – Glandă capitată secretoare de tip 2 cu două celule; **C** – Glandă peltată (sesilă) cu 4 celule secretoare. cb – celulă bazală; cs – celule secretoare; ss – spațiu subcuticular de acumulare a uleiului esențial [53].

Trihomele sesile se deosebesc prin faptul că au în structura lor între 12-18 celule secretoare și un spațiu vast subcuticular care are rolul de a acumula uleiul esențial sintetizat. În cadrul speciei *O. vulgare* s-a constatat o variabilitate pronunțată a trihomelor privind suprafața de distribuție, structura și dimensiunea lor [237, 238]. Un alt studiu realizat la nivel morfologic asupra diferitor forme de *O. vulgare* a demonstrat prezența unui număr de trihome neglandulare și glandulare de aproape 2 ori mai mare pe suprafața frunzelor la formele cu flori unisexuate feminine decât la cele bisexuale [284].

Tabelul 1.2. Tipurile de trihome capitate întâlnite în familia *Lamiaceae* [53]

Specia	Tip I	Tip II	Tip III	Referințe
<i>Mentha piperita</i>	+			Maffei et al., 1989 [167]
<i>Thymus vulgaris</i>	+			Bruni și Modenesi, 1983 [58]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	+			Werker et al., 1985 [275]
<i>Nepeta racemosa</i>	+	+		Bourett et al., 1994 [55]
<i>Majorana syriaca</i>	+	+		Werker et al., 1985 [275]
<i>Melissa officinalis</i>	+	+		Werker et al., 1985 [275]
<i>Origanum vulgare</i>	+	+		Werker et al., 1985 [274]
<i>Ocimum basilicum</i>	+	+	+	Werker et al., 1993 [273]
<i>Salvia officinalis</i>	+		+	Werker et al., 1985 [275]
<i>Plectanthrus ornatus</i>	+		+	Ascensao et al., 1999 [37]
<i>Teucrium siculum</i>	+			Servettaz et al., 1994 [235]

Cercetările referitoare la numărul și dimensiunea trihomelor de *O. vulgare* efectuate în Grecia, arată că un număr redus este caracteristic pentru plantele din partea sudică a țării. La nivel morfologic ssp. *hirtum* se caracterizează prin bractee mici de culoare verde și flori albe, ssp. *vulgare* este ușor de distins după bracteele mari de culoare mov, roz și roșii, în timp ce ssp. *viridulum* se caracterizează prin bracteele mari, verzi [155].

În acest context, cercetătorii din Italia și-au pus drept obiectiv de a determina corelația dintre producția uleiului esențial și numărul/ densitatea trihomelor glandulare. Ei au investigat

morfologia trihomelor neglandulare și glandulare, distribuția lor pe organele vegetative și reproductive a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* (3 populații) colectate din regiunea Veneto de la diferite altitudini (nord-estul Italiei). S-a evidențiat o corelație invers proporțională între conținutul uleiului esențial și altitudine, aceeași observație a fost atestată și în cazul densității trihomelor/ altitudine, fiind demonstrată prin analize microscopice. Astfel, cele trei populații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* investigate au demonstrat o variabilitate interpopulațională mare asociată cu gradul de altitudine joasă, mijlocie și înaltă, sugerând posibilitatea apariției diferitor biotipuri asociate cu nivelurile altitudinale [112].

Unul dintre cele mai recente studii realizate pe populații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* a fost efectuat de cercetătorii din Polonia. Scopul lor a fost de a determina diversitatea morfologică și biochimică a 14 populații de *O. vulgare* introduse în condiții *ex situ*. Populațiile au demonstrat un nivel ridicat al diversității morfologice în funcție de trăsăturile examinate, de exemplu: înălțimea plantei, numărul de ramuri pe plantă, numărul de internoduri pe tulpină. Un caracter morfologic important a fost masa vegetală proaspătă a plantei care a variat în limitele 249,0-896,6 g per plantă. Parametrii care au variat cel mai mult au fost numărul de ramuri per plantă și masa vegetală proaspătă [157].

Subspecia *O. vulgare* ssp. *vulgare* indigenă a fost studiată și în Ungaria urmărindu-se evaluarea diversității morfologice a 11 populații colectate din 5 raioane caracterizate prin diferite altitudini, cât și condițiile pedoclimatice variate. Populațiile au demonstrat o variabilitate morfologică destul de semnificativă, fiind identificate și flori de culoare albă în una din populațiile analizate, caliciu și bractee de culoare verde. Pentru subspecia analizată această culoare nu este specifică, fapt determinat de răspunsul parametrilor morfologici la condițiile biotopului de colectare, de tipul de reproducere a speciei, fiind o plantă cu polenizare încrucișată, necontrolat în cazul acestui studiu [74].

Uleiul esențial de *O. vulgare* este deosebit de apreciat pentru valoarea sa terapeutică și alimentară [27, 29]. Proprietățile uleiului volatil sunt direct corelate cu compoziția lui, atât din punct de vedere calitativ cât și cantitativ. Valoarea specifică a uleiului de *O. vulgare*, în special cea terapeutică, rezultă prin acțiunea sinergetică a tuturor componentelor săi. Luând în considerare aceste aspecte, studiile actuale se axează în ultimii ani pe cercetarea compoziției uleiului esențial al speciilor *Origanum* sp.

Uleiul esențial al speciilor din genul *Origanum* L. variază în funcție de cantitatea totală extrasă, precum și de compoziția lui. În baza conținutului de ulei esențial, ce diferă în cadrul speciilor, în literatura de specialitate se descriu trei grupe principale [263]:

- specii sărace în uleiuri esențiale, cu un conținut de ulei esențial mai puțin de 0,5% - *O.*

laevigatum și *O. vulgare* ssp. *vulgare*;

- specii cu un conținut de ulei esențial între 0,5 și 2 % - *O. microphyllum*;
- specii bogate în uleiuri esențiale, cu un conținut de ulei esențial mai mare de 2 % - *O. vulgare* ssp. *hirtum* și *O. onites* [102, 155, 269].

O **diversitate biochimică** foarte mare se întâlnește chiar și în cadrul unei singure specii, cum ar fi *O. vulgare* L. Diferite studii au constatat că variabilitatea biochimică a speciei este în funcție de poziționarea geografică sau sezonul de colectare a plantelor [155, 269].

De asemenea, datorită condițiilor climatice, care prezintă diferențe de la an la an, compoziția chimică a unei culturi dintr-o anumită zonă nu este identică, fapt care determină apariția unor dificultăți în cultivarea lor. Componentele biotopului, reprezentate de factorii climatici, exercită o permanentă acțiune de control în funcționarea biocenozei pe terenurile cultivate cu plante medicinale, aromatice sau condimentare. La această acțiune, biocenoza răspunde prin reacții ecofiziologice specifice, de care depinde parcurgerea fazelor de vegetație și formarea recoltei de material vegetal (frunze și inflorescențe).

De remarcat că, populațiile de *O. vulgare* din nordul Italiei, care au fost analizate în aspectul descrierii conținutului de ulei esențial și compoziția sa. Acestea au stat la baza identificării a 64 de compuși, plantele studiate fiind distribuite, în baza compoziției chimice, în trei grupe. Prima categorie prezintă un conținut ridicat de compuși incluși în căile biosintetice, precum sunt *carvacrol/timol*; al doilea grup este caracterizat printr-o diversă varietate de sesquiterpene și un conținut ridicat de *linalol* și al treilea – prin lipsa compușilor sesquiterpenici [75]. Cercetări similare au fost efectuate și în regiunea de sud a Italiei fiind determinată o diversitate largă a profilelor biochimice la 25 de populații de *O. vulgare* prelevate din diferite localități [177].

Astfel, în ceea ce privește compoziția uleiului esențial, speciile din genul *Origanum* L. se caracterizează prin prezența dominantă a următorilor compuși:

- *linalol*, *terpinen-4-ol* și *hidrat de sabinen*, uleiul esențial de *O. majorana* [62];
- *carvacrol*, *timol*, uleiul esențial de *O. vulgare* ssp. *hirtum* și *O. onites* [155, 259, 269];
- sesquiterpene, uleiul esențial de *O. vulgare* ssp. *vulgare* [75, 134].

În ceea ce privește specia *O. vulgare* există numeroase cercetări care relevă variabilitatea biochimică a uleiului esențial privind cele șase subspecii:

- ssp. *hirtum* este cea mai bogată în *carvacrol* și *timol* [155, 205, 247, 264];
- ssp. *glandulosum* Ietswaart este bogată în compuși monoterpenici, în special *timol*, *carvacrol* și derivații lor [126, 178];
- ssp. *gracile* Ietswaart și ssp. *viride* Hayek au fost determinate a fi bogate în compuși aciclici, sesquiterpenoizi sau *carvacrol/timol* [34];

▪ ssp. *vulgare* și ssp. *virens* Letswaart sunt bogate în compuși aciclici și sesquiterpene [102, 157, 219];

▪ cu excepția ssp. *viride*, compușii *sabinen* sunt absenți sau prezența lor este incertă la alte subspecii [44, 248].

Un exemplu de variabilitate chimică a uleiului esențial de *O. vulgare* a fost demonstrat de cercetările lui Afsharypuor S. și colab. (1997) privind compoziția uleiului volatil al *O. vulgare* ssp. *viride*, colectată din flora spontană a Iranului [28], care s-a caracterizat prin prezența compușilor dominanți ca: *acetat de linalil*, *sabinen*, β -*cariofilen* (chemotipuri) și diferă substanțial de compoziția uleiului esențial al aceleiași subspecii naturale din zona balcanică (Bulgaria, Albania, Turcia, Grecia, Iugoslavia) – chemotip de *carvacrol* sau cultivată în Israel (chemotip de *timol* – cea mai mare cantitate în compoziția uleiului aparține *timolului*). De asemenea, au fost investigate populații indigene de *O. vulgare* ssp. *vulgare* colectate din provincia Mazandaran (Iran) privind compoziția chimică a uleiului esențial relevând un profil al compușilor biochimici total diferit. Compusul cu cea mai mare cantitate a fost *timolul* (chemotip de *timol* – 37,13%), urmat de γ -*terpinen* (9,67%), *carvacrol* (9,57%), *carvacrol metil eter* (6,88), *cis- α -bisabolen* (6,80%), *eucaliptol* (3,82%), *p-cimen* (3,58%) și *elemol* (2,04%) [262].

Unii autori au raportat identificarea de chemotip *linalol* la specia *O. vulgare* [75, 102]. De asemenea, conținutul uleiului esențial, izolat din părțile aeriene a populațiilor indigene de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din Lituania, a variat foarte mult (0,25-1,51%). Rezultatele analizelor (GC și GC-MS) au arătat o compoziție bogată a uleiului esențial dar și o diversitate înaltă la nivelul compoziției chimice. Astfel, populațiile de *O. vulgare* colectate au fost definite și grupate în 4 chemotipuri: *sabinen*, β -*ocimen*, β -*cariofilen* și *germacren D* [219].

Mockute D. și colab. (2003) au efectuat cercetări asupra *O. vulgare* ssp. *vulgare* prelevată tot din flora spontană a Lituaniei (considerate chemotipuri de β -*ocimen* și *germacren D*). Studiul a relevat cantități diferite a compușilor uleiului esențial extras din diferite părți aeriene a celor 8 populații indigene: inflorescențe și frunze împreună cu tulpini. Rezultatele au arătat că inflorescențele conțin cantități mai mari de *sabinen* și *trans- β -ocimen* și cantități mai mici de β -*ocimen* decât în frunze și tulpini. Același lucru s-a observat și în cazul chemotipului *germacren D*. Valoarea medie cantitativă a compusului *cis- β -ocimen* în uleiul esențial din frunze+tulpini a fost de 3 ori mai mare (15,3%) decât cea din inflorescențe (4,1%). Anterior, cercetătorii din Lituania au identificat 3 chemotipuri ale uleiului esențial (β -*ocimen*, β -*cariofilen* și *germacren D*) analizând zece populații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* colectate din flora spontană a diferitor localități [185]. Investigații realizate de cercetătorii din Italia [183] și Franța [60] au arătat că uleiurile esențiale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* pot fi clasificate în nouă chemotipuri. Însă, studiile din Italia au fost

efectuate asupra inflorescențelor și au evidențiat patru chemotipuri: *p-cimen*, *terpinen-4-ol*, *timol* și *β -cariofilen*. În Franța cercetările privind compoziția chimică a uleiurilor esențiale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* au fost efectuate asupra extraselor din frunze. Comparând rezultatele investigațiilor efectuate asupra aceleiași subspecii, doar un singur chemotip de ulei de esențial identificat în frunze (*sabinen*, *β -ocimen*, *hidrat de cis-sabinen*, *terpinen-4-ol*, *germacren D* și *β -cariofilen*) a avut aceeași compoziție chimică cu cea a chemotipului din inflorescențe (*terpinen-4-ol*).

Unul dintre cele mai recente studii realizate pe populații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* a fost efectuat de cercetătorii din Polonia. Scopul lor a fost de a determina diversitatea morfologică și biochimică a 14 populații de *O. vulgare* introduse în condiții *ex situ*. Populațiile au demonstrat un nivel ridicat al diversității chimice a uleiului esențial în funcție de parametrii cantitativi și calitativi ai compușilor identificați, de exemplu: *sabinen*, *1,8-cineol*, *linalol*, *p-cimen*, *β -cariofilen* și *oxid de cariofilen*, fiind compuși dominanți în uleiul esențial analizat. Majoritatea populațiilor au fost definite ca chemotip de „*sabini*” bogate în sesquiterpene [157].

În Republica Moldova de asemenea au fost realizate cercetări asupra conținutului chimic al uleiului esențial de *O. vulgare*. În cadrul unui studiu au fost supuse analizelor biochimice cinci genotipuri de *O. vulgare* ssp. *vulgare* și cinci genotipuri de ssp. *hirtum* selectate din colecția de PMA a IGFPP. Astfel, componentele majore al uleiului esențial de *O. vulgare* ssp. *vulgare* identificate în toate cele 5 genotipuri au fost: *germacren D*, *β -cariofilen*, *γ -elemen*, în timp ce *β -bisabolena* este componenta majoră în patru genotipuri. Pentru *O. vulgare* ssp. *hirtum*, componentele majore sunt: *carvacrolul*, urmat de *p-cimen* și *γ -terpinen*. S-a demonstrat, de asemenea, și variabilitatea conținutului de polifenoli în genotipurile evaluate pentru ambele subspecii. Este important de remarcat că, în acest studiu s-a observat o corelație negativă între conținutul de ulei esențial cu conținutul de polifenoli [115].

În contextul studiilor analizate, putem menționa că, cunoașterea compoziției chimice a uleiului esențial de *O. vulgare* oferă posibilitatea de a selecta varietăți cu diferite caractere cantitative sau calitative a uleiului (chemovarietăți) de interes economic pentru introducerea în cultură.

Factorii abiotici, cum ar fi umiditatea, temperatura, topografia, factorii selectivi edafici și /sau biotici (fauna și flora asociată), influențează căile metabolice de biosinteză a terpenelor și contribuie la apariția diferitor variații în profilele fitochimice a uleiului esențial, fapt ce contribuie la procesul de selecție a celor mai valoroase chemotipuri care ar prezenta interes la nivel industrial.

Pentru gestionarea sustenabilă a resurselor naturale, elaborarea unor strategii eficiente de conservare a biodiversității, ameliorarea materialului săditor, alăturat cunoașterii caracteristicilor morfologice și biochimice este absolut indispensabilă explorarea caracteristicilor genetice

intraspecifice. **Diversitatea molecular-genetică** reprezintă fundamentul pe care acționează evoluția, influențează potențialul de adaptare al populațiilor și speciilor la condițiile mediului înconjurător. Cunoașterea diversității genetice, cât și a factorilor care influențează această diversitate, reprezintă o prioritate pentru cercetările actuale și, totodată, ne ajută să înțelegem baza moleculară a diferitor fenomene biologice în plante fiind utilă și în procesul de conservare a resurselor genetice [118]. În cele din urmă, existența diversității genetice constituie o premisă în ameliorarea unor caractere de importanță economică și permite crearea unor varietăți superioare care să satisfacă necesitățile societății. Biodiversitatea la nivel de specie se referă la varietatea alelelor și combinații ale acestora, reflectată în diferențe fenotipice – trăsături morfologice (ex. culoarea, forma florii la plante), biochimice (ex. structura proteinelor, proprietățile izoenzimelor) etc. Mecanismele primordiale ce determină modificarea combinațiilor de alele în diferite populații, dar și heterogenitatea populațiilor sunt selecția naturală, driftul genetic, mutația și fluxul de gene [20, 130].

Cele mai eficiente instrumente în acest context sunt markerii moleculari, aplicați cu succes în evaluarea polimorfismului genético-molecular la un șir de plante medicinale [30, 83, 145, 225, 258, 268]. Un marker molecular poate fi definit ca un caracter observabil, prin tehnici moleculare, care ne oferă informații (de ex. lungimea, secvența) despre o regiune de ADN (de ex. o genă, o porțiune dintr-o genă sau o zonă care nu codifică). Tehnicile moleculare de bază aplicate în mod obișnuit în studii ecologice, evolutive, taxonomice, filogenetice ale plantelor sunt: **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), **RAPD** (*Random Amplified Polymorphic DNA*), **SSR** (*Simple Sequence Repeats*) and **AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). În ultimii ani, a apărut o nouă clasă de tehnici avansate, bazate pe secvențe de ADN, derivate prin combinarea tehnicilor de bază anterioare: **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*), **SSCP** (*Single Strand Conformation Polymorphism*), **CAPS** (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), **SCAR** (*Sequence Characterized Amplified Region*), **ISSR** (*Inter Simple Sequence Repeat*) etc. [154]. Markerii sunt clasificați în funcție de particularitatea de evidențiere a polimorfismului genetic: dominanți (markeri care permit evidențierea polimorfismului polilocus, adică la gene diferite sau cromozomi diferiți) și codominanți (markeri care permit evidențierea polimorfismului monolocus). Datorită simplității tehnicii RAPD-PCR (cu markeri dominanți), a faptului că necesită cantități extrem de mici de ADN și a capacității de a releva un grad înalt de polimorfism, aceasta a fost aplicată cu succes la studiul diferitor specii de PMA inclusiv la specia *O. vulgare* [17, 36, 91, 145, 152, 182, 207, 225, 258, 259, 268].

Totuși, markerii ideali în studiul variabilității moleculare ar fi caracterizați de următoarele proprietăți: polimorfism ridicat, codominanță, distribuție uniformă în genom, specificitate

(evidențierea diferențelor între indivizii înrudiți), neinfluențați de condițiile de mediu, necostisitori și ușor de utilizat [265]. Markerii codominanți determină corelația univocă între particularitatea fenotipică și alelele unei regiuni din genom, astfel, evidențiază prezența unor gene care codifică enzime implicate în metabolismul primar și secundar la plante.

Unii dintre cei mai des utilizați markerii moleculari de natură codominantă sunt secvențele simple înalt repetitive de ADN sau SSR care reprezintă secvențe scurte formate de obicei din 2-5 perechi de baze, repetate în tandem, care flanchează o secvență unică de ADN. Avantajul markerilor SSR comparativ cu celelalte tipuri de markerii este gradul foarte ridicat de polimorfism. Markerii de tip SSR dezvoltați prin sondarea întregului genom, aparent nu au nici-o legătură cu regiunile codificatoare (genele). Cele mai multe studii privind specia *O. vulgare* au fost efectuate pentru a identifica relațiile molecular-genetice, diversitatea molecular-genetică și compoziția de ulei esențial [41, 96, 158, 165, 166]. În același timp, evaluarea caracteristicilor genetice ar facilita analiza și descrierea complexă a speciei.

Printre primele cercetări realizate asupra speciilor din genul *Origanum* L. prin aplicarea tehnicii RAPD-PCR a fost efectuată de Klocke E. și colab. (2002) care a studiat diversitatea genetică a speciei *O. majorana*. Primerii RAPD au fost testați cu succes și în autenticitatea speciilor *Origanum* sp. Aplicați asupra a 84 de probe de *Origanum* sp. comercializate la nivel internațional au permis detectarea mai multor specii: *Satureja montana*, *Origanum majorana*, *Cistus incanus*, *Rhus coriaria*, *Rubus* sp. și controlul calității lor [171]. Astfel, primerii dominanți pot fi folosiți în calitate de test complementar în *screening*-ul farmacognozic și fitochimic. Un alt studiu la nivel molecular, prin utilizarea markerilor RAPD, asupra speciei *O. onites* a avut ca scop major cercetarea structurii genetice în corelație cu compoziția chimică a uleiului esențial. În acest studiu au fost investigate 14 clone de *O. onites* prelevate din vestul și sud-vestul Turciei [259]. Cercetările au relevat lipsa unor corelații între rezultatele analizei RAPD și a datelor obținute privind compoziția chimică a uleiului esențial. Aceste rezultate au scos în evidență faptul că similaritatea genetică ar putea să nu reflecte întotdeauna corelații dintre trăsăturile fenotipice, compoziția uleiului și alte caractere, observație raportată anterior și de către Masi L. și colab. (2006) [175]. În schimb utilizarea markerilor RAPD a permis discriminarea varietăților de *O. onites* din Turcia, și poate fi folosit cu succes pentru selectarea și îmbunătățirea varietăților cultivate.

Recent, un alt studiu, efectuat cu aplicarea tehnicii RAPD-PCR, de asemenea, a relevat utilitatea markerilor în discriminarea a cinci populații indigene de *O. vulgare* ssp. *glandulosum* prelevate din regiunea de nord a Tunisiei. Diversitatea speciei cercetate a fost evaluată utilizând și unsprezece trăsături morfologice cantitative, care au evidențiat o variabilitatea morfologică înalt

semnificativă a populațiilor analizate. Analiza componentelor principale și dendrograma construite în baza ambelor seturi de date au grupat populațiile de *O. vulgare* ssp. *glandulosum* în 2 clustere majore, în funcție de arealul lor geografic [181].

În ultimii ani, markerii RAPD au fost aplicați cu succes, în studiul diferitor specii de *Origanum* sp., de către cercetătorii științifici pentru atingerea diferitor obiective de cercetare: Gounaris Y. și colab. (2002) caracterizează markerii RAPD ca instrumente moleculare care pot fi utilizate în identificarea genetică a taxonilor *O. onites* și *O. vulgare* [120]; s-au aplicat în studiul variabilității genetice și relația filogenetică în cadrul genului a speciei *O. vulgare* ssp. *hirtum* de către Katsiotis A. (2009); în Slovenia au fost utilizați în evaluarea diversității genetice a populațiilor native de *O. vulgare* ssp. *vulgare* [251]; de asemenea primerii RAPD au fost testați și de către cercetătorii din Republica Moldova asupra speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* colectate din flora spontană în vederea estimării polimorfismului genetic [17, 191].

Astfel, markerii dominanți RAPD pot fi utilizați cu succes ca instrumente de identificare în programele de conservare a biodiversității speciei *O. vulgare*.

Considerați a fi unii dintre cei mai utili în studiul variabilității genetice, primerii SSR sunt superiori primerilor RAPD deoarece se caracterizează prin capacitatea de a evidenția indivizii homozigoți de cei heterozigoți (codominanță).

Odată cu progresele înregistrate în genomică, s-a reușit dezvoltarea unei noi categorii de markeri SSR, care sunt situați în secvențele informaționale ale genelor (exoni) exprimate în diferite condiții de mediu sau diferite perioade ontogenetice. Acești markeri se numesc EST (*Expressed Sequence Tag*) – SSR și prezintă un polimorfism mai redus decât markerii de tipul SSR [95, 127]. Totuși, avantajul EST-SSR față de SSR constă în identificarea variației din secvențele informaționale exprimate la un anumit moment dat în timp.

Monoterpenele fenolice derivate prin calea metabolică „*cimil*” sunt responsabile de calitatea uleiului esențial de *O. vulgare* [247]. Recent, în cadrul unei cercetări axate pe identificarea enzimelor care reglează această cale biosintetică, numite *terpen-sintetaze* (*TPS*), a fost creată o bibliotecă de secvențe expresate marcate (*EST*). Aceste secvențe au fost izolate din celulele secretoare ale glandelor epidermale care sunt responsabile pentru producerea și stocarea terpenelor [72]. Prin urmare, secvențele EST reprezintă un punct de plecare ideal pentru a dezvolta markeri de tip SSR. Novak J. și colab. (2008) au creat primul set de markeri EST-SSR dintre care 13 au prezentat un nivel înalt al polimorfismului genetic pentru speciile genului *Origanum* sp.

Un studiu recent a pus în aplicare treisprezece markeri EST-SSR dezvoltați anterior [198], obiectivul fiind evaluarea diversității genetice și diferențierea a 5 populații native de *O. vulgare* ssp. *glandulosum* din Tunisia. Rezultatele au reflectat un deficit de heterozigoție în populația totală

excepție a făcut doar o singură populație caracterizată printr-un exces de heterozigoție. Deși analizele statistice au demonstrat o diferențiere semnificativă între populații, indicii F_{ST} de diferențiere genetică între populații au arătat valori scăzute de 0,048 și 0,115, ceea ce indică prezența unei baze genetice comune pentru cele cinci populații tunisiene de *O. vulgare* [182].

Studii complexe, în baza diferitor tehnici moleculare precum: AFLP [40, 41, 163]; SAMPL [43]; EST-SSR [132, 164, 254]; SRAP [30, 254]; SSR [26]; ISSR [31], au fost efectuate la specii din genul *Origanum* L. pentru identificarea relațiilor genetice, evaluarea diversității moleculare, studiul biodiversității și conservarea germoplasmei economic valoroase, studii taxonomice și relații filogenetice

În acest context, gradul de favorabilitate al culturilor depinde de interacțiunea genotipului cu condițiile locale de mediu. Studiile privind diversitatea genetică sunt foarte importante în proiectarea programelor de ameliorare a varietăților în managementul germoplasmei și în strategiile de conservare a PMA. Variația moleculară existentă în cadrul populațiilor de *O. vulgare* indigene, fiind o consecință a recombinării genetice și mutațiilor, a fluxului de gene intra- și interpopulațional, a derivei și eroziunii genetice, constituie baza adaptării la condițiile de mediu și totodată condiția esențială pentru menținerea și supraviețuirea subspeciei autohtone. Flora spontană este o sursă valoroasă de variabilitate moleculară, morfologică și fitochimică iar valorificarea trebuie realizată prin corelarea cercetărilor fundamentale, botanice, biochimice, farmacologice, moleculare etc., care să argumenteze științific calitatea deosebită și eficiența economică a acesteia.

1.3. Particularități distinctive ale metabolismului secundar la specia *O. vulgare*

Organismele asigură biodiversitatea lumii vii, prezentând un grad ridicat de chemodiversitate care este datorată prezenței unui număr vast de compuși chimici de natură organică cu masă moleculară mică. Acești compuși organici sunt cunoscuți sub denumirea de metaboliți secundari rolul cărora este puțin elucidat. PMA reprezintă o sursă esențială, bogată în metaboliți secundari, iar datorită prezenței acestora, s-a acordat o atenție sporită în ultimii ani utilizării acestor plante în industrie, medicină sau agricultură. Astfel, au fost inițiate și dezvoltate numeroase studii privind biosinteza și posibilele activități biologice ale metaboliților secundari [59]. Proprietățile senzoriale și terapeutice valoroase ale speciilor de *Origanum* sp. se bazează în special pe uleiul esențial, amestec complex de cca 30 până la 50 terpene, secretat și acumulat în trihomele de tip glandular (Figura 1.2) care acoperă părțile aeriene ale plantelor (frunze, caliciu, corola, staminele și pistilul florilor).

Proprietățile uleiurilor volatile sunt direct corelate cu compoziția lor, atât din punct de vedere calitativ cât și cantitativ. Specia *O. vulgare* este bogată în ulei esențial caracterizat în special

de prezența terpenelor ca componente principale: *carvacrol* și/ sau *timol* (împreună cu cantități considerabile de *terpinen* și *p-cimen*) sau de *linalol*, *terpinen-4-ol* și *hidrat de sabinen* în dependență de subspecie [155, 259].

Terpenele (cunoscute și ca terpenoizi sau izoprenoizi) formează cel mai mare grup de substanțe organice, **compuși ai metabolismului secundar**, cu peste 30 000 de structuri diferite în componența cărora intră diferite hidrocarburi și derivații lor oxigenați. Formula lor generală este $(C_5H_8)_n$ și rezultă prin polimerizarea *izoprenului*. Astfel, terpenele se clasifică în dependență de numărul moleculelor de izopren pe care le conține [84]:

- Hemiterpene –dintr-o singură structură izoprenică (C_5H_8);
- Monoterpene – din 2 izoprene ($C_{10}H_{16}$);
- Sesquiterpene – din 3 izoprene ($C_{15}H_{24}$);
- Diterpene – din 4 izoprene ($C_{20}H_{32}$);
- Norisoprenoizi – compuși cu treisprezece molecule de carbon (C_{13}) etc.

În cadrul speciei *O. vulgare* (chiar și a diferitor populații/varietăți), compoziția calitativă și cantitativă a uleiului esențial este destul de diversă fiind descrise diferite chemotipuri (monoterpene sau sesquiterpene ca compuși majoritari). Chemotipul (chemovarietatea) unui ulei esențial este o referință precisă care indică componenta biochimică majoritară și distinctă prezentă în ulei. Este un element reperat grație unei analize cromatografice și spectrofotometrice care recunoaște și identifică compușii principali și permite să distingem uleiuri esențiale extrase din aceeași varietate botanică dar cu o compoziție biochimică diferită.

Compușii uleiului esențial pot fi clasificați, de asemenea, în dependență de structura biochimică (Figura 1.3):

- monoterpene aciclice: de exemplu *β -mircen*, *trans- β -ocimen* etc.;
- monoterpene ciclice: *sabinen* etc.;
- monoterpene fenolice: *p-cimen*, *timol*, *carvacrol*;
- sesquiterpene: *β -cariofilen*, *β -bisabolen*, *germacren D* etc. [248].

Datorită interesului comercial colosal, cercetarea științifică s-a axat mult în direcția studiului compușilor volatili. Compușii terpenici, cum ar fi *timolul* și *carvacrolul*, care sunt componentele identificate în cantități majore la speciile de *Origanum* sp. bogate în ulei esențial, au proprietăți antioxidante remarcabile [180, 201, 228]. Rezultate interesante au fost obținute de către cercetătorii din Polonia, unde Skwarek T. și colab. încă din 1994 au descoperit că extractele de *O. vulgare*, atunci când sunt aplicate asupra virusului ECHO au indus formarea unei substanțe cu activitate asemănătoare interferonului [249]. De asemenea, compușii fenolici au demonstrat activitate inhibitorie ridicată asupra germinării și producției de *Penicillium digitatum* [76].

Un alt studiu a evaluat eficacitatea *timolului*, *carvacrolului*, *linalolului* și *cariofilenului*, în condiții *in vitro* și *in vivo* împotriva fitopatogenilor ca: *Monilinia laxa*, *M. fructigena* și *M. fructicola*, compuși identificați în *O. vulgare* ssp. *hirtum* și care reprezintă agenții cauzali ai putregaiului brun de fructe și de porumb. De asemenea, au fost realizate numeroase studii care au descris proprietatea antifungică și antibacteriană a *carvacrolului* și *timolului* din uleiul esențial de *O. vulgare* asupra diferitor specii patogene: *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus megaterium*, *Salmonella hadar* [38, 89, 97].

Recent, s-au efectuat cercetări care au demonstrat proprietatea toxică sau repelentă a uleiului esențial de *O. vulgare* asupra insectelor care determină răspândirea diferitor agenți patogeni producând îmbolnăviri la om și la animale [109, 279]. Noi perspective a substanțelor volatile din plantele de *O. vulgare* susțin rolul direct al acestora în schimbările comportamentale ale insectelor sociale (*Myrmica scabrinodis*) prin intermediul modulației de sinteză a aminelor biogene. Astfel, s-a observat în cadrul acestor investigații creșterea nivelului de dopamină, tiramină și serotonină la furnicile expuse tratării cu terpenoidele identificate în extractele vegetale de *O. vulgare*. Această manipulare comportamentală ar putea spori fidelitatea partenerului și protecția plantelor [170].

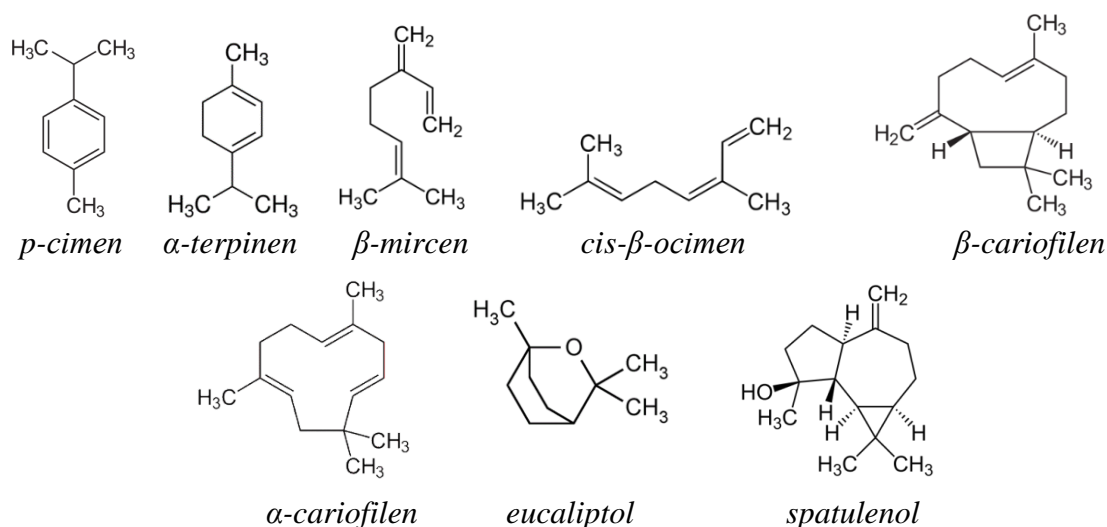


Fig. 1.3. Principalii compuși terpenici identificați în uleiul esențial de *O. vulgare*

Compușii fenolici sunt cel mai frecvent menționați ca SBA, responsabili pentru efectul antioxidant. Activitatea antioxidantă se bazează și pe polaritatea compușilor, în funcție de tipul și polaritatea solventului de extracție. Uleiul esențial de *O. vulgare* a demonstrat capacitatea de a forma radicali liberi stabili în reacția cu superoxidul de potasiu. Monoterpenele, *carvacrol* și *timol*, au fost identificate ca molecule care reacționează cu anionul superoxid (O_2^-), probabil prin donarea atomilor de hidrogen și formarea speciilor paramagnetice stabile (radicali liberi). Activitatea

antioxidantă s-ar putea datora atât grupării non-fenolice a compușilor, cât și grupării fenolice. Grupul de compuși non-fenolici acționează ca agenți de eliminare a radicalilor liberi și sunt eficienți în stadiile incipiente de oxidare. Grupul de compuși fenolici participă în întreruperea proceselor de lanț responsabile de consumul oxigenului [189].

Compoziția chimică și proprietățile uleiului volatil sunt cele mai detaliat cercetate, în timp ce alte substanțe biologice active nevolatice prezente în extractele vegetale de *O. vulgare* li se acordă mai puțină atenție. Astfel, în ultimii ani, alte două grupe majore de compuși fenolici ai metabolismului secundar identificați în extractele *O. vulgare* au devenit obiectivul major al investigațiilor de către cercetători (Figura 1.4), și anume: acizii polifenolcarboxilici (*acidul rozmarinic*, *acidul cafeic*, *acidul clorogenic* etc.) și flavonoidele (*rutozidă*, *luteolină*, *apigenol* etc.) datorită activității antioxidante sporite observată în diferite studii [187, 204, 228].

Acizii polifenolcarboxilici sunt compuși organici din clasa fenolilor, care conțin două sau mai multe grupe hidroxil legate de un radical aromatic (fenil) și o grupare funcțională carboxil (-COOH).

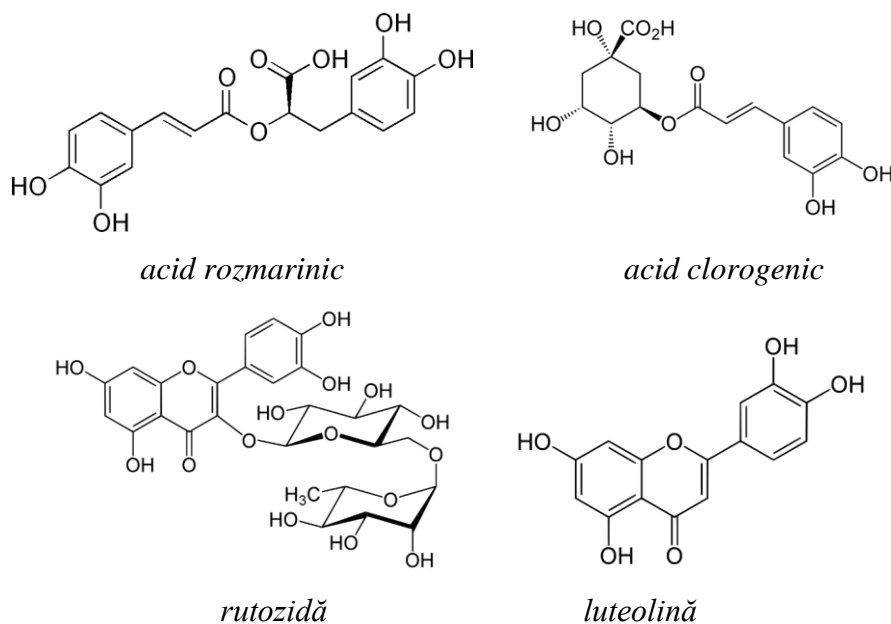


Fig. 1.4. Compuși polifenolici identificați în extractele vegetale de *O. vulgare*

În prezent a crescut interesul pentru compușii polifenolici care se găsesc în produsele naturale pe bază de plante medicinale. Studii recente au arătat că PMA utilizate în industria alimentară sunt o sursă bună de polifenoli antioxidanți care ulterior acestea s-au direcționat spre studiul compoziției lor fenolice și proprietăților antioxidante [25]. Activitatea antioxidantă a extractelor de *O. vulgare*, a fost studiată în diferite sisteme model [14, 222]. În extractele de *O. vulgare* s-a identificat anterior, acidul cafeic; quercetinul [125]; acidul rozmarinic [234, 240].

Un număr mare de studii au raportat acțiunea antibacteriană a extractelor vegetale care

conțin acizi polifenolcarboxilici (*acidul cinamic, cafeic, p-hidroxibenzoic, vanilic* etc.) în calitate de substanțe biologice active [248].

Flavonoidele reprezintă o altă clasă de compuși cu structură polifenolică de origine vegetală, considerați, de asemenea, metaboliți secundari ai plantelor. Toate flavonoidele derivă din aminoacizii aromatici, fenilalanina și tirozina, cu C₁₅ și scheletul de bază – C₆-C₃-C₆, două nuclee aromatice unite prin intermediul unei catene formate din trei atomi de carbon. Marea majoritate a flavonoidelor sunt derivați ai *fenilbenzopiranului* (numit și nucleu flavanic) [121, 276].

Flavonoidele prezintă un interes deosebit datorită proprietăților benefice asupra organismului uman. Acestea pot influența asupra celulelor canceroase prin mecanisme, cum ar fi declanșarea proceselor ce conduc la apoptoză (moartea programată a celulei), împiedicarea diviziunii celulare prin depolimerizarea microtubulilor, inhibarea procesului de angiogeneză, și respectiv proliferării tumorilor [184, 244]. Luteolina, component ce se conține în extractul vegetal de *O. vulgare*, a fost considerată responsabilă pentru inducerea unei substanțe asemănătoare interferonului. De asemenea, flavonoidele au capacitatea de a regla răspunsul inflamator prin neutralizarea unor radicali liberi sau reglarea unor procese celulare implicate în inflamație [105] etc.

În afară de o gamă largă de SBA cu proprietăți terapeutice importante, în extractele vegetale de *O. vulgare* se întâlnesc și compuși nedorți (toxici). Arbutina este unul dintre acești compuși care se conține în extractele vegetale și este preferabil de evitat în dieta umană. Hidrochinona, un metabolit al arbutinului, s-a dovedit a fi hepatotoxică, nefrototoxică, mutagenă și carcinogenă în diverse studii efectuate pe animale [212]. În plus, a fost publicată o ipoteză care afirmă prezența unei interacțiuni între fenol și hidrochinonă descriși ca factori cauzali în leucemie [179]. Până în prezent, studiul diversității inter- și intraspecifice a substanței arbutinice în *O. vulgare* este redus.

O gamă largă de SBA, printre care terpenoide, flavonoide, taninuri, uleiuri esențiale sau componente ale acestora (precum *carvacrolul*), prezente la specia *O. vulgare* în cantități relativ mari, au fost considerate o sursă potențială de biocide naturale [93].

Cercetările din țara noastră s-au axat pe diverse analize și testări a extractelor fitochimice de *O. vulgare*. Casian I. și colab. (2013) au evaluat compoziția substanțelor fenolice ale unor specii de PMA din familia *Lamiaceae*. Extractele etanolice ale speciei *O. vulgare* au prezentat printre cele mai impunătoare cantități de acizi hidroxicinamici (*acid clorogenic*) și glicozide flavonice (*apigenina*). De asemenea, s-a depistat un conținut destul de înalt de acid rozmarinic, fapt pentru care specia studiată poate servi ca sursă potențială de substanțe SBA și produse farmaceutice cu acțiuni farmacologice determinate de proprietățile acizilor hidroxicinamici [3].

Terpenele reprezintă clasa de compuși cu un mare potențial economic. Genele care

participă în mecanismele de reglare a căilor de biosinteză a terpenelor sunt *terpen-sintetazele* (TPS). Terpenele sunt substanțe organice formate din blocuri universale de cinci molecule de carbon, *izopentildifosfat* (IDP) și izomerul lui, *dimetilalil difosfat* (DMADP), ambele sintetizate prin calea MEP (*2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat*) din plastide și calea MVA (*mevalonat*) localizată în citoplasmă [65, 257]. Calea biosintetică începe cu condensarea compușilor DMADP și IDP cu ajutorul enzimelor numite prenil-transferaze pentru a forma numeroși compuși intermediari cu diferită lungime a lanțului carbonic: *geranil difosfat* (GDP) precursorul monoterpenelor (C₁₀); DMADP și două unități de IDP fuzionează pentru a forma *farnesil difosfat* (FDP), precursorul majorității sesquiterpenelor (C₁₅); *geranil-geranil difosfat* (GGDP) care este precursorul diterpenelor (C₂₀); *scualena* este considerată precursorul triterpenelor. Aceste reacții metabolice intermediare și cele ulterioare sunt însoțite în continuare de către o clasă largă de enzime numite *terpen-sintetaze* (TPS), incluzând: *hemiterpen-sintetazele* responsabile de formarea hemiterpenelor (C₅), *monoterpen-sintetazele* (*mTPS*) pentru monoterpene; *sesquiterpen-sintetaze* (*sTPS*) pentru sesquiterpene și *diterpen-sintetazele* – diterpene [64, 208]. Astfel calea MVA asigură precursori pentru sesquiterpenele volatile, în timp ce prin calea MEP se obțin monoterpenele și diterpenele volatile [92]. În calitate de enzime cheie în biosinteza monoterpenelor și sesquiterpenelor, enzimele TPS catalizează reacțiile de oxidare și etapele de ciclizare a precursorilor pentru fiecare clasă de terpene [72, 84, 119, 255, 256]. Aceste enzime sunt responsabile de diversitatea structurală a mono- și sesquiterpenelor. Studii anterioare au demonstrat că calea MEP este principala cale care dă naștere unităților IDP pentru biosinteza *carvacrolului* monoterpenic [84, 256]. Există enzime TPS care catalizează formarea unui singur compus terpenic, dar există, de asemenea, multe enzime TPS care au capacitatea de a sintetiza amestecuri de produse complexe cu stereospecificitate ridicată [82].

Terpen-sintetazele contribuie la formarea unui grup divers de metaboliți terpenici datorită cărui fapt se distinge o superfamilie de gene *TPS* cu 8 subfamilii mari (TPSa, TPSb, TPSc, TPSd, TPSe, TPSf, TPSg, TPSH), cu o capacitate caracteristică de a forma mai multe produse finale și reglarea spațial-temporală în timpul procesului metabolic ca răspuns la factorii biotici și abiotici.

Majoritatea monoterpen-sintetazelor izolate din Angiosperme aparțin subfamiliei TPSb [64]. Secvența nucleotidică și secvențele scurte expresate de ADNc (*EST*) ale plantelor model, cum ar fi *Arabidopsis*, *Zea mays*, *Medicago* și *Picea*, prezintă familii mari de terpen-sintetaze, rezultate din cicluri de duplicare a genelor, mutații multiple și probabil divergențe funcționale. Familia genelor *TPS* din *Arabidopsis* reprezintă un bun exemplu al acestor procese evolutive [39].

Au fost izolate două gene expresate în rădăcină care codifică *1,8-cineol sintetaza* și (*Z*)-*g-bisabolen sintetaza* [63, 221]. Fiecare genă existând sub forma a două copii, care au similaritatea

secvenței de aminoacizi de 100 și 91%, respectiv, indicând duplicări tandem evolutive.

Progresele recente în clonarea mai multor gene de biosinteză a terpenelor, exprimarea lor în sistemele heterologe și caracterizarea funcțională a enzimelor corespunzătoare au contribuit în mare măsură la îmbunătățirea înțelegerii funcțiilor *TPS*-lor și reglarea genelor implicate în căile de biosinteză a terpenelor atât în angiosperme, cât și în gimnosperme [64, 84, 146, 173, 208].

Examinarea specificităților substratului enzimelor terpen-sintetaze a indicat existența a cel puțin 9 enzime în *Vitis vinifera*. În mod analog, la speciile *Santalum* sp. există șapte enzime terpen-sintetaze confirmate. Crocoll C. și echipa sa de cercetare (2010) au studiat două cultivare de *O. vulgare* (d06-01 și f02-04) pentru a identifica terpen-sintetazele responsabile de formarea terpenelor în *O. vulgare*, și au generat biblioteci de ADNc din speciile cultivate. Astfel, au fost descrise șapte gene *TPS* presupuse a fi monoterpen- și sesquiterpen-sintetaze [72].

1.4. Concluzii la capitolul 1

1. În timp ce majoritatea speciilor de *Origanum* sp. comercializate sunt prelevate în cea mai mare parte încă din flora spontană, apare pericolul eroziunii genetice și dezvoltarea culturilor eterogene, o situație nedorită care ar putea fi schimbată prin extinderea cultivării speciilor cu caractere valoroase. Variabilitatea naturală a speciei *O. vulgare* ne oferă o gamă largă de biotipuri privind selecția și cultivarea ulterioară în programele de reproducere [16];

2. Studiile privind diversitatea molecular-genetică sunt foarte importante în proiectarea programelor de ameliorare a varietăților (culturilor) în managementul germoplasmei și în strategiile de conservare a PMA iar markerii RAPD și SSR pot fi utilizați în calitate de tehnici de amprentare moleculară eficiente în programele de conservare a biodiversității speciei *O. vulgare* ssp *vulgare* [172];

3. Investigațiile speciei *Origanum vulgare* L. care până nu demult se bazau preponderent pe descrierea sistematică, ecologică, răspândirea geografică, utilizarea în medicina tradițională, actualmente includ și abordări genetice, biochimice, transcriptomice, ceea ce creează posibilitatea de a obține direcționat substanțe biologice active (SBA) de interes industrial sau de a selecta varietăți cu diferite caractere cantitative sau calitative a uleiului (chemotipuri/chemovarietăți) de interes economic pentru introducerea în cultură [16];

4. În contextul studiilor analizate, se poate menționa că studiul și cunoașterea potențialului biologic al germoplasmei autohtone de *O. vulgare* (ssp. *vulgare*) oferă posibilitatea valorificării acesteia prin ameliorarea caracterelor prețioase.

2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE

Activitățile experimentale realizate în scopul analizei diversității structurale și funcționale la plantele speciei *O. vulgare* s-au desfășurat pe parcursul anilor 2013-2017, fiind proiectate investigații la nivel morfologic, biochimic și molecular-genetic. Cercetările expuse în prezenta lucrare au fost realizate în laboratoarele Centrului Genetică Funcțională (CGF), Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir” (USDC) și al Centrului de Cercetări Biologice „Stejarul” departamentul Biologie vegetală și experimentală, Piatra Neamț, România.

Au fost utilizate protocoale standard, promovate de literatura de specialitate, cu unele modificări, fiind optimizate în funcție de specificul obiectivelor de studiu.

2.1. Materialul de studiu și condițiile de colectare

Materialul biologic de cercetare reprezintă plantele speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* (sovârf), care aparține genului *Origanum* L., familia *Lamiaceae*. Conform cercetătorilor autohtoni Negru A., (2007) și Goncariuc M., (2014) caracteristic pentru flora spontană a Republicii Moldova este specia *O. vulgare* subspecia *vulgare* și numeroase varietăți ale acesteia în dependență de condițiile climaterice [8, 19]. În Republica Moldova această specie este întâlnită pe dealuri uscate, margini de drum și locuri cu o luminozitate moderată/însorite.

Condiții de colectare. Pentru investigarea diversității structurale și funcționale la specia *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană a Republicii Moldova au servit plante grupate în subpopulații, grupuri de indivizi din cadrul unei populații geografice, izolate și caracterizate prin particularități fenotipice și morfologice specifice [20]. Astfel, au fost prelevate 7 subpopulații din rezervația cultural-naturală Orheiul Vechi, notate convențional Orhei: Or1, Or2, Or3, Or4, Or5, Or6 și Or7.

Selectarea și identificarea teritoriului pentru prelevarea subpopulațiilor din flora spontană, cât și monitorizarea fazei de vegetație a plantelor de *O. vulgare* s-a realizat prin câteva expediții. Astfel, subpopulațiile speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* au fost colectate în faza de înflorire deplină (90%) în scopul realizării obiectivelor propuse în lucrarea de față [199, 214, 247]. Identificarea botanică a plantelor s-a bazat pe modelul de descriere a speciei de către Ietswaart J. H. (1980) iar exemplare de plante sunt păstrate în ierbarul Centrului de Genetică Funcțională (USDC). Rezervația Orheiul Vechi este situată la distanța de 50 km nord-est de orașul Chișinău (estimarea distanței între populații). Caracterul pitoresc al spațiului este accentuat de 8 podișuri unul dintre care este podișul (versantul) Butuceni. Versantul se află în partea centrală a spațiului peisagistic la altitudinea de 100-115 m, iar rolul principal în formarea reliefului revin rocilor cenușii dure (sol calcaros) [23], de unde au fost colectate 6 subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* selectate și identificate în baza

caracterelor fenotipice diferite, izolarea prin distanța de minim 30 m una față de alta cât și în baza diferitor altitudini: Or1-42m, Or2-45m, Or3-26m, Or4-23m, Or5-23m, Or6-22m. Rezervația se mai caracterizează și prin prezența tipului fluvial de relief (de luncă sau șes) de pe care s-a identificat subpopulația Or7 (sol argilo-nisipos) la o altitudine de 74 m. Un aspect important este și direcția de expoziție a versanților, subpopulațiile au avut expunere spre nord (Or3, Or4, Or5 și Or6) și spre nord-est (Or1, Or2 și Or7) (<http://geoportal.md/>). În cadrul subpopulației plantele au fost colectate aleatoriu. Pentru analizele ulterioare au fost colectate câte 20 de plante individuale din fiecare subpopulație investigată.

În cazul a 2 obiective ce vizează diversitatea morfologică și genetică, subpopulațiile din flora spontană au fost investigate în aspect comparativ cu 3 subpopulații de plante din colecția de PMA a Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru”, mun. Chișinău (notate convențional Ch8-Ch10) cu condițiile pedologice determinate – o altitudine de 74 m și tipul de înclinare, expoziția arealului spre est (<http://geoportal.md/>).

Pentru realizarea etapelor de cercetare propuse în calitate de obiect de studiu s-a utilizat diferit material vegetal de la plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare* colectate în perioada de înflorire deplină considerată conform literaturii de specialitate de 90% [214, 247]:

- studiul morfologic s-a realizat pe un total de 200 de plante individuale: 7 subpopulații din flora spontană, a câte 20 de indivizi în subpopulație (total 140 de indivizi) și 3 subpopulații din colecție a câte 20 de indivizi (total 60 de indivizi);

- variabilitatea genetică s-a studiat în baza a două tehnici PCR:

- RAPD-PCR s-a efectuat pe 10 probe de ADN *bulk* (amestec de material vegetal din indivizi) extrase din fiecare subpopulație separat;

- SSR-PCR s-a realizat pe 200 de probe de ADN obținute din fiecare plantă individuală (7x20=140 indivizi din flora spontană și 3x20=60 din colecție);

- analizele biochimice s-au făcut pe 7 extracte vegetale (și ulei esențial) obținute din subpopulațiile colectate din flora spontană, efectuate în 3 repetiții tehnice;

- nivelul de expresie a genelor analizate (RT-PCR) s-a determinat pe probe de ARN extrase din frunze și flori, separat de la fiecare plantă (3 plante, repetiții biologice, din fiecare subpopulație din flora spontană: 3x7=21 de probe biologice).

2.2. Metodele de cercetare

Metode morfologice. Au fost analizați zece parametri morfologici dintre care nouă sunt cantitativi: înălțimea plantelor (HP), diametrul tulpinilor (DT), numărul de ramuri pe plantă (RP), lungimea ramurilor (LR), numărul de frunze pe nod (nodul 5 de la bază, FN), numărul de noduri pe

tulpină (NT), distanța dintre internoduri (DI), lungimea și lățimea frunzelor (frunza matură a nodului 5 de la baza tulpinii) (LF și respectiv IF). Al 10-lea este un parametru morfologic calitativ reprezentat de culoarea florilor, care a fost identificată în conformitate cu RHS Color Chart (UPOV-International Union For The Protection Of New Varieties Of Plants) [286]. Măsurările liniare au fost efectuate cu rigla, iar cu șublerul manual s-a determinat *diametrul tulpinii*.

Metode calitative și cantitative de analiză biochimică. Plantele au fost condiționate și uscate pe cale naturală în spații special amenajate, ferite de acțiunea directă a razelor solare și supuse extracției (cu etanol 90% (V/V), raportul solvent/material vegetal a fost stabilit în conformitate cu Farmacopeea Europeană), iar extractele obținute au fost caracterizate biochimic în cadrul Centrului de Cercetări Biologice „Stejarul” Piatra Neamț, România. Astfel, identificarea și caracterizarea chemovarietăților a fost efectuată în baza studiului compoziției extractelor vegetale prin metode cromatografice calitative: *cromatografia pe strat subțire (CSS)* și cantitative: *cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC)* și *spectrofotometrie (SM)*. Ulterior, s-a analizat compoziția uleiurilor esențiale prin *cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectroscopie de masă (GC-MS)*.

Cromatografia pe strat subțire. Analiza cromatografică a compușilor metabolismului secundar s-a efectuat la extractele vegetale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* obținute pe bază de etanol 90% (pentru identificarea acizilor polifenolcarboxilici și flavonoidelor) și diclormetan (pentru terpene). În calitate de etaloane s-au folosit: *acidul rozmarinic (Ar)*, *acidul cafeic (Acaf)* și *acidul clorogenic (Acl)* din grupul acizilor polifenolcarboxilici; *rutozida (R.)*, *apigenolul (Ap.)* și *luteolina (L.)* din flavonoide; *beta-sitosterolul (B.)*, *stigmaterolul (S.)*, *acidul oleanolic (O.)* și *acidul ursolic (U.)* din compuși terpenici. Faza staționară este reprezentată de plăcile cromatografice cu silicagel (plăci de 10 x 20 cm), iar probele și soluțiile etaloane s-au aplicat pe placă cu ajutorul micropipetelor calibrate. Plăcile uscate au fost supuse dezvoltării în vasul cromatografic saturat timp de circa 1h la 20-30°C, ca dezvoltant servind următorul amestec de solvenți: 100 ml acetat de etil, 11 ml de acid formic, 1000 ml acid acetic, 20 ml H₂O. Vizualizarea probelor a fost realizată după uscarea plăcii, prin expunerea la lumină UV la 365 nm.

Analiza cantitativă pentru compușii antioxidanți prin spectrofotometrie. Determinarea polifenolilor totali prin *metoda Singleton & Rossi*. Principiul metodei constă în colorația specifică pe care o dau în mediu puternic alcalin polifenolii, în prezența reactivului *Folin-Ciocalteu*; colorația albastră ce se formează este colorimetrabilă la 765 nm. Probele (a câte 100 ml extract alcoolic) au fost diluate cu 8,85 ml apa distilată, cantitate ce a depins de concentrația inițială a polifenolilor în extract. S-a adăugat un volum de 0,4 ml reactiv *Folin-Ciocalteu*, iar după omogenizare s-a așteptat 5 minute, apoi s-a adăugat un volum de 1,5 ml carbonat de sodiu 20%. După omogenizare proba a fost lăsată încă 2 ore pentru dezvoltarea și stabilizarea culorii. Rezultatele au fost citite cu ajutorul

spectrofotometrului UV/Vis de model Jenway 6300 la o lungime de undă de 765 nm față de un blank preparat individual pentru fiecare extract ca și proba (fără a crea însă mediu alcalin).

Determinarea acizilor polifenolcarboxilici. Principiul metodei se bazează tot pe crearea mediului alcalin iar acizii polifenolcarboxilici formează cu acidul fosfowolframic o colorație albastră colorimetrabilă la 660 nm. Proba supusă analizei în volum de 3 ml s-a tratat cu 2 ml acid fosfowolframic și s-a omogenizat timp de 2-3 min. Din acest amestec s-a luat 2 ml într-un balon de 25 ml și s-a adus la cotă cu carbonat de sodiu de 20%. După exact 60 de secunde s-a citit intensitatea culorii la 660 nm față de un blank preparat individual pentru fiecare extract ca și proba, utilizând apă distilată în loc de carbonat de sodiu.

Determinarea flavonoidelor. Formarea, de către flavonele extractibile în solvenții hidrofilii, în prezența cationului Al^{3+} a complexilor interni colorați în galben intens pentru care se poate măsura absorbanta la $\lambda = 413$ nm, atunci când exprimarea se face în *luteolină* sau la $\lambda = 430$ nm, atunci când conținutul se exprimă în *rutozidă* (Figura 2.1).

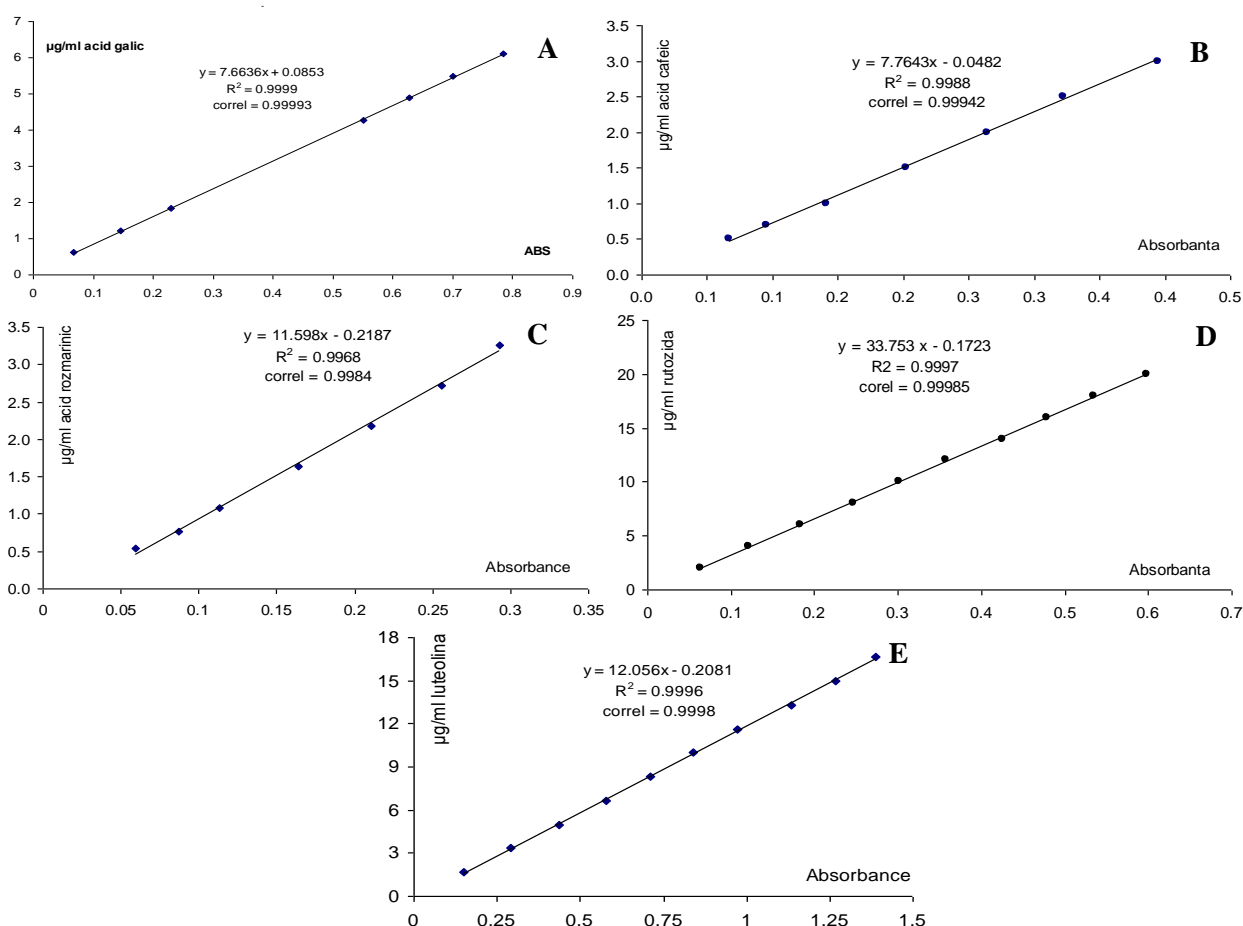


Fig. 2.1. Curbe de calibrare pentru compușii biochimici identificați în extractele vegetale

Notă: **A - Etalon: acid galic**, gama de liniaritate: 0,6-6 $\mu\text{g/ml}$, $R^2 = 0,9999$, corel. (abs.-conc.) = 0,9999;
B - Etalon: acid cafeic, gama de liniaritate: 0,5-3 $\mu\text{g/ml}$, $R^2 = 0,9988$, corel. (abs.-conc.) = 0,9994;
C - Etalon: acid rozmarinic, gama de liniaritate: 0,5-3 $\mu\text{g/ml}$, $R^2 = 0,9968$, corel. (abs.-conc.) = 0,9984;
D - Etalon: rutozidă, gama de liniaritate: 2-20 $\mu\text{g/ml}$, $R^2 = 0,9997$, corel. (abs.-conc.) = 0,9998;
E - Etalon: luteolină, gama de liniaritate: 0,5-16 $\mu\text{g/ml}$, $R^2 = 0,9996$, corel. (abs.-conc.) = 0,9998.

Cota parte din probele de analizat au fost diluate cu etanol 70%, în concordanță cu concentrația inițială a flavonoidelor în extract. La aceasta a fost adăugat acetat de sodiu și clorură de aluminiu în volume cunoscute. Analiza s-a realizat la temperatura camerei (nedepășind 20°C).

Cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC). Extractele vegetale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* pe bază de etanol au fost supuse analizei cantitative prin HPLC pe Agilent 1200 prevăzut cu o coloană de fază inversă Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 μm) și detector UV-Vis cu multidiode (engl. diode-array detector) cu sistem de gradient în baza solvenților hexanici pentru eluare cu 1,0% (v/v) alcool izopropilic. Faza mobilă la un debit de 0,7 ml/min și presiunea de operare de 18 bar. Pentru identificarea și dozarea compușilor în sistemul cromatografic s-au injectat soluțiile substanțelor de referință.

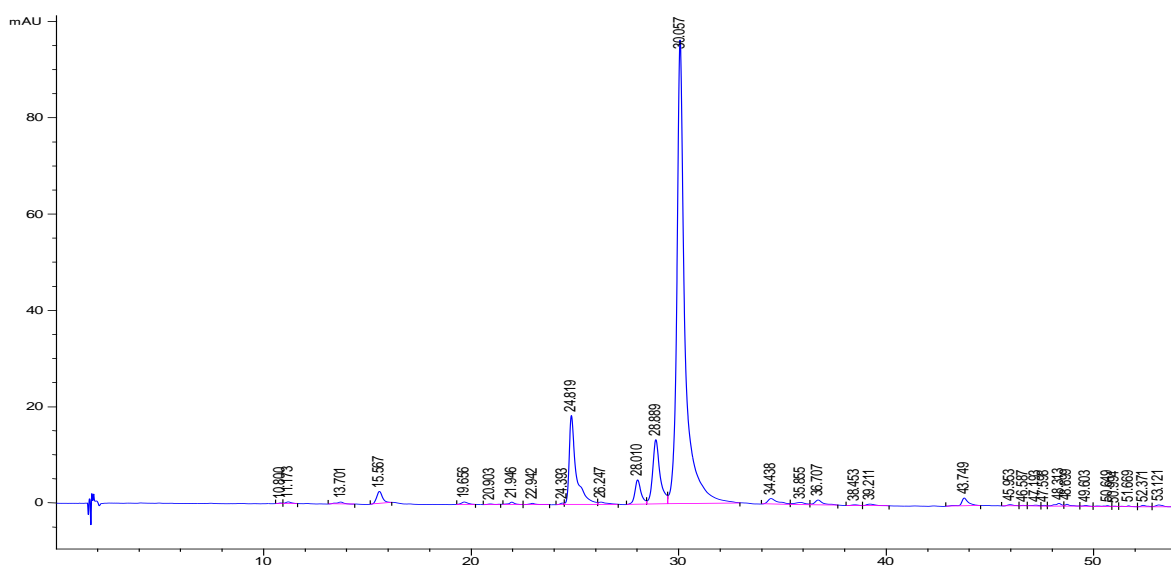


Fig. 2.2. Exemplu de cromatogramă HPLC obținută la specia *O. vulgare* (Or1)

Cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectroscopie de masă (GC-MS). Pentru obținerea uleiului volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare* au fost utilizate 100 g de material vegetal uscat (organe vegetative și generative – planta întreagă), care a fost hidrodistilat cu vapori de apă (metoda *Neo-Clevenger*) în conformitate cu Farmacopeea Română ediția a X-a. La materialul mărunțit s-a adăugat apă distilată în raport de 1:3 iar distilarea s-a desfășurat timp de 3 ore.

Compoziția chimică a uleiului volatil a fost stabilită prin analiza GC-MS (Figura 2.3) cu ajutorul cromatografului de gaze Agilent Technologies tip 1200 prevăzut cu o coloană de fază inversă Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 μm) și detector UV-Vis cu multidiode (engl. diode-array detector). Toate produsele terpenice au fost identificate utilizând softul Agilent Technologies prin compararea spectrelor de masă și a timpilor de retenție cu cele ale standardelor. Astfel, estimarea

concentrației terpenelor în extracte a fost efectuată prin metoda de etalonare absolută, ca soluții standard de terpenă pentru referință. În calitate de fază mobilă a fost utilizat heliul.

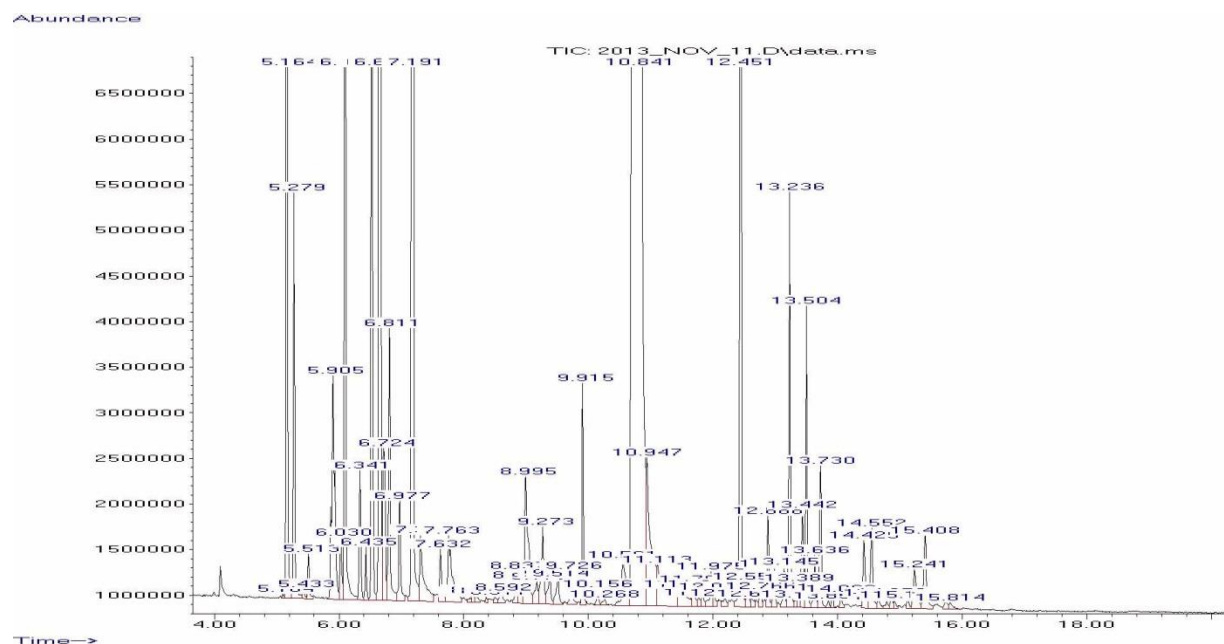


Fig. 2.3. Exemplu de cromatogramă GC-SM la uleiul volatil de *O. vulgare* (Or1)

Metode și tehnici de analiză moleculară. Metodele ce pot fi utilizate în scopul evaluării variabilității genetice în cadrul populațiilor de *O. vulgare* analizate sunt numeroase și variate, atât din punct de vedere al obiectului de studiu, cât și în ceea ce privește complexitatea tehnică și metodologică.

Metode de purificare și determinare a calității și cantității ADN-ului. Probele de ADN total, omogenizate în azot lichid, conform protocolului pe bază de CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*) cu unele modificări [192, 215], utilizând în acest scop soluția tampon CTAB de 2%; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M Na₂-EDTA; PVP 2 % și 0,1% β-mercaptoetanol (v/v). ADN-ul izolat a fost cuantificat calitativ prin analiza electroforetică și cantitativ prin analiza spectrofotometrică, principalele criterii fiind puritatea, integritatea și cantitatea de ADN obținută.

Cuantificarea ADN-ului. Densitatea optică a fost măsurată la λ260 nm și λ280 nm (soluții ADN), cu ajutorul spectrofotometrului T60 UV-VIS, făcându-se raportul dintre cele două rate de absorbție. ADN-ul este detectat cantitativ în soluțiile apoase la λ260 nm, iar banda de absorbție în UV a proteinelor este la 280 nm. ADN-ul este considerat suficient de pur, dacă raportul A_{260/280} este cuprins între 1,8 și 2,0. Valorile < 1,8 indică impurificări cu proteine, iar cele > 2,0 indică alte tipuri de contaminări. Cuantificarea ADN-ului în gel de agaroză (1%) s-a realizat în sistem tampon continuu TAE la 120-140V, în prezența bromurei de etidium cu concentrația de 0,5 mg/ml și soluție tampon de migrare 1x TAE (Tris-acetat-EDTA). Vizualizarea gelului a fost efectuată în raze UV.

Calitatea, cât și gradul de degradare a ADN-ului au fost evaluate în funcție de prezența unei benzi de dimensiuni normale, intense, bine definite.

Metode de evaluare a polimorfismului genetic în baza tehnicii PCR. Tehnicile moleculare de analiză a polimorfismului ADN au evoluat în funcție de scopul urmărit de cercetător și tendințele de automatizare a analizelor. Așa tehnici ca: RAPD, RFLP, SSR, AFLP etc., devin din ce în ce mai pe larg utilizate de diferite laboratoare.

Analiza cu primeri RAPD. Amplificarea a fost realizată în următorul amestec (15 μl): 50-60 ng ADN, dNTP 200 μM de fiecare tip, primer 0,4-0,6 μM, 1,0 unități/per reacție GoTaq ADN-polimeraza (Promega), MgCl₂ – 2,5 mM. Procesul de amplificare a decurs în termociclul automat Applied Biosystem GeneAmp PCR System 9700 (Singapore), conform următorului program: 95°C – 5 min, 35 cicluri: 95°C – 1 min., 34°C – 1 min., 72°C – 1 min., elongarea finală 72°C – 3 min.

Amplificonii au fost analizați prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5% în prezența bromurii de etidiu 0,5 μg/ml [224]. Analiza RAPD a fost realizată cu 27 de primeri decameri (Tabelul 2.1). Producții de amplificare au fost vizualizați cu ajutorul transluminatorului UV și sistemului de documentare a gelului DOC - PRINT-VX2.

Tabelul 2.1. Primerii utilizați pentru analiza RAPD

Primer	Secvența (5'→3')	Temperatura de topire, °C	Primer	Secvența (5'→3')	Temperatura de topire, °C
OPA₁	caggccttc	30	OPH₁₅	aatggcgcag	32
OPA₂	tgccgagctg	34	OPI₁₆	tctccgcct	32
OPA₆	ggt ccc tga c	34	OPJ₀₁	cccggcataa	32
OPA₉	gggtaacgc c	34	OPU₁₁	agacccagag	32
OPA₁₁	caatcgccgt	32	OPK₁₇	cccagctgtg	34
OPA₁₉	caaacgtcg g	32	OPU₀₉	tgtaccctg	32
OPB₀₁	gttctgctcc	32	OLIGO_{A1}	ggtgcgggaa	32
OPB₀₃	catccccct g	34	OLIGO_{A2}	aag agcccgt	32
OPB₁₀	ctgctgggac	34	OLIGO_{A3}	ccc gtcagca	34
OPB₁₃	ttccccgct	34	UBC₂₁₅	tcacacgtgc	32
OPG₅	ctgagacgg a	32	UBC₂₅₀	cgacagtccc	34
OPG₆	gtgctaacc	32	OLIGO₂₈	aggtaactga	30
OPG₁₀	agggccgtct	32	OLIGO₃₉₁	gcgaacctcg	34
OPE₁₇	ctactg ccgt	32			

Analiza cu primeri SSR. Amplificarea a fost realizată în următorul amestec de 20 μl: 140 ng ADN, dNTP 200 μM de fiecare tip, primer 0,9 μM, 1,0 unități/per reacție de DreamTaq Green ADN Polimerază (*Thermo Scientific*), MgCl₂ – 2,5 mM. Procesul de amplificare a decurs în termociclul automat Applied Biosystem PCR Veriti 96-well conform programului: 3 min. la 95°C urmat de 35 cicluri: 95°C - 45 sec., 56°C - 1 min. și 72°C - 2 min.; elongația finală la 72°C pentru 7 min. Analiza SSR a fost realizată cu 11 perechi de primeri (Tabelul 2.2). Separarea produșilor de amplificare s-a

realizat în gel de poliacrilamidă de 8% în prezența bromurii de etidiu – 0,05 µg/ml [224]. Producții de amplificare au fost vizualizați cu ajutorul transluminatorului UV și sistemului de documentare a gelului DOC-PRINT-VX2.

Tabelul 2.2. Primerii utilizați pentru analiza EST-SSR

Nr.	Primer	Secvența (5'→3')	Nr. bazelor azotate	T ⁰ de topire (°C)	Secvența repetitivă
1.	OR09	F-ttgaagcattgttgaggtagatg	24	9,3	(TTTTTC) ₄ (T) ₅ (TTTTTC) ₁
		R-tccaactaggagaaatgtgc	22	0,3	
2.	OR10	F-ttgctccgacatcttcaacc	21	7,9	(ACC) ₁ ATC(ACC) ₄
		R-agcctgctgtgttgatcag	21	9,8	
3.	OR12	F-gcccctgcagtgactctac	20	3,5	(AG) ₇ G(AG) ₃
		R-aaaaggcttcggactcgatc	21	7,9	
4.	OR13	F-gagagaatccaagcctccgc	20	1,4	(AAC) ₇ AGC(AAC) ₁
		R-tgaaggagtccgatgttgacg	21	9,8	
5.	OR14	F-tgtttggtgaaaccgatcc	20	7,3	(GAT) ₈
		R-agacgacgagctccaataacg	21	9,8	
6.	OR27	F-tcagaacaatgaaggccgc	20	7,3	(CCT) ₆
		R-cggtacaggtcaaaccgg	20	1,4	
7.	OR40	F-gccaaggacatccaactg	20	9,4	(GGT) ₄ GTT(GGT) ₁
		R-caactgaacacctccacaatg	22	0,3	
8.	OR44	F-tcaaggtagagctgctgcag	21	1,8	(GAT) ₃ GAA(GAT) ₄
		R-gctttacggaggaagaatggg	21	9,8	
9.	OR64	F-tcccgcctcaagaaatgac	20	7,3	(AAG) ₁ A ₃ (AAG) ₆ A
		R-agagacacgttgatgaaccg	21	9,8	
10.	OR75	F-caagaagaataacggaggagcag	23	0,6	(GCA) ₆
		R-tggagaatttctgatgctcgg	21	7,9	
11.	OR81	F-gaagttcgccgaggctctc	19	1,0	(CTTTT) ₃ AT ₈ (CTTTT) ₁ TT(CTTTT) ₁
		R-caagcacaagaaaatacaatagcac	26	8,5	

Izolarea și cuantificarea ARN-ului total s-a realizat prin omogenizarea materialului în azot lichid și incubare cu reagentul kit TRIzol™ Reagent (*Thermo Scientific*) conform recomandărilor producătorului. Precipitatul de ARN a fost dizolvat în 30 µl de apă sterilă (*Nuclease-free water*) și păstrat pentru analizele ulterioare la temperatura de -80°C.

Controlul calității probelor de ARN total s-a realizat prin metoda spectrofotometrică (puritatea) la λ260, λ280 și λ230 nm și electroforeza (integritatea) în gel de agaroză de 1,2% la 140 V. În calitate de soluție de migrare a fost utilizată soluția apoasă TAE (1X) obținută din reagentul TAE (50X): 400 mM MOPS, 100 mM acetat de sodiu și 10 mM EDTA-Na₂.

Obținerea ADNc (Transcripție inversă). Pentru a obține ADNc calitativ (necontaminat cu ADN genomic), preliminar procesului de revers-transcripție, probele de ARN total (0,6 µg) au fost tratate cu RQ1 RNase-Free DNase (*Thermo Scientific*) 30 min. la 37°C, conform recomandărilor producătorului. Reacțiile de revers-transcripție au fost realizate la amplificatorul (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) prin incubarea probelor de ARN timp de 10 min. la 25°C și 60

min. la 42°C cu kit-ul RevertAid Reverse Transcriptase (*Thermo Scientific*), în prezența primeriilor Oligo (dT)₁₈ (*Thermo Scientific*), Random Hexamer (*Thermo Scientific*) și alte componente ale mixului de reacție conform recomandărilor producătorului. Probele de ADNc obținute, preliminar utilizării în reacțiile de amplificare în calitate de matrice cu primeri specifici, au fost diluate cu apă sterilă (*Nuclease-free water*) în raport de 1:4.

Analiza nivelului de expresie a genelor (Real-Time PCR). Expresia genelor de interes a fost analizată prin metoda PCR-lui cantitativ în timp real (qPCR) la amplificatorul cu detecție automată a fluorescenței DT-96 (DNA technology, Federația Rusă). Reacțiile de amplificare au fost realizate într-un volum de 15 μl care conținea: 0,3 μM de primeri, 2 μl de ADNc și Maxima SYBR Green/ROX PCR Master Mix (*Thermo Scientific*) conform recomandărilor producătorului. Programul de amplificare a constituit: 95°C – 10 min.; 95°C – 15 sec., 62°C – 20 sec. (5 cicluri); 95°C – 20 sec., 58°C – 40 sec. (40 de cicluri). Lipsa produselor de amplificare nespecifică a fost confirmată prin electroforeză în gel de agaroză de 1,2 % soluția tampon – Tris-acetat-EDTA (TAE) conform protocolului standard. În calitate de genă de referință s-a utilizat gena *OvEF1alpha* (numărul de acces în baza de date NCBI: GU385981). Utilizarea genelor de referință este indicată pentru a ține sub control variațiile determinate de cantitatea, calitatea, integritatea ARN-lui și eficiența reacției de revers-transcriere. Pentru identificarea nivelului de expresie relativă a genelor s-a utilizat metoda 2^{-ΔCt} [162] și programul Real Time_PCR v7.3.

Proiectarea primerilor specifici genelor de interes. Secvența nucleotidică a primerilor specifici pentru genele de interes și cea de referință, utilizați în reacțiile de polimerizare prin RT-PCR a fost stabilită pe baza secvenței disponibile în bazele de date ale NCBI (*National Center for Biotechnology Information, ftp://ftp.ncbi.nih.gov*). În Tabelul 2.3. sunt prezentate denumirea și numărul de acces ale genei/EST, secvența primerilor specifici, dimensiunea produsului de amplificare.

Tabelul 2.3. Primerii utilizați în identificarea secvențelor codificatoare a genelor de interes

<i>EST</i>	Primer sens 5'-3'	Primer antisens 5'-3'	Dimensiunea ampliconului, pb
<i>OvEF1alpha</i>	tgccacacttcacacattgc	cggettggtcggaatcatct	141
<i>Ovtps1</i>	agaaatcctctcccagcaaa	agcgggattggtatcggtt	135
<i>Ovtps2</i>	gtggctgagtttggtggaagg	ttggcgttctctaggtattctgc	115
<i>Ovtps3</i>	cgagcgaaccaccgatgta	ccttcgagcatccggtttcc	129
<i>Ovtps4</i>	aggtgccactcgttaactgt	cgacaaatcacacacgatgct	142
<i>Ovtps5</i>	ttgaacgccgtgtccatctc	ggcgtggaaggagatgaaca	133
<i>Ovtps6</i>	gttgtgagcgaaccaccaat	cctccgatacgccttttca	133
<i>Ovtps7</i>	tccttccacagcaaaagca	agcgggcttggtatcgatt	112

Pentru alegerea secvenței optime de oligonucleotide au fost utilizate programul Primer3Web

v. 3.0.0. (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) și aplicația OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/>), respectând criteriile pentru Real-Time PCR cu SybrGreen.

Prelucrarea statistică a datelor experimentale. Parametrii morfologici au fost analizați în baza indicilor: media aritmetică (\bar{x}), dispersia (s^2), abaterea standard (SD), eroarea mediei ($s_{\bar{x}}$), coeficientul de variație (CV, %). Toate datele sunt prezentate ca medie \pm eroarea standard a mediei [283]. Diferențele statistic semnificative între cele 10 subpopulații (nivel intrapopulațional) și între cele două populații (interpopulațional) s-a realizat prin testul t Student ($\alpha=0,05$) pentru dispersii egale sau inegale în funcție de rezultatele testului Fisher (F) de comparare a dispersiilor și al testului ANOVA, folosind instrumentele de analiză ale aplicației Microsoft Office Excel 2010. Măsurarea gradului de variație între caracterele morfologice s-a realizat prin determinarea coeficientului de corelație Pearson (r , $P=0,05$) [210]. Metodele de clusterizare, dendrograma construită în baza coeficientului de distanță Euclidiană și ACP [107, 136], în baza valorilor medii ai parametrilor morfologici s-au obținut prin intermediul softului statistic XLSTAT.

Analiza RAPD. Detectarea și stabilirea mărimii fragmentelor de ADN amplificate a fost realizată cu ajutorul programului TotalLab. Pentru evidențierea polimorfismului generat de fiecare marker s-a utilizat **indicele PIC** (*Polymorphic Information Content*) după Anderson J. A. [32]:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \text{ unde } p_i - \text{frecvența benzii, } i \text{ și } n - \text{numărul de benzi depistate.}$$

EST-SSR. Fragmentele de ADN amplificate, detectate și cuantificate cu ajutorul programului PhotoCap, au fost considerate alele diferite și sunt indicate prin asocierea notației primerului cu dimensiunea ampliconului, de exemplu OR44.170 (fragment cu dimensiunea de 170 pb amplificat cu primerul OR44). În rezultatul analizei profilelor moleculare a fost obținut un tabel cu 16400 de date binare (1 – prezență, 0 – absență), în baza cărora s-a determinat frecvența a 82 de alele identificate pentru 11 loci SSR. Frecvența alelelor a fost determinată prin raportul: $F_a = N/N_t$, unde N reprezintă numărul de alele și N_t este numărul total de alele [288]. Au fost calculați parametri de diversitate genetică folosind softul statistic GenAEx 6.5 [209] și anume: numărul alelelor per subpopulație (A), numărul alelelor specifice (N_s), numărul efectiv de alele (N_e), numărul mediu de alele (N_A), proporția benzilor polimorfe (PBP), proporția locilor polimorfi (PLP), heterozigoția observată (H_o) și așteptată (H_e), indicele PIC și indicele de fixare/ încrucișare (F). GenAEx 6.5 a fost utilizat, de asemenea, pentru a estima analiza varianței moleculare (AMOVA) inter- și intrapopulațională, cât și indicii - H_T , F_{SR} , și G_{ST} . Pentru a genera dendrograma (analiza clusteriană) în baza coeficientului de distanță Euclidiană prin metoda UPGMA a fost utilizată matricea datelor binare în programul XLSTAT. Analiza ACP s-a efectuat în baza frecvenței alelelor și a indicelui de covarianță folosind, de asemenea, programul XLSTAT.

Parametrii biochimici reprezentați de diferiți compuși identificați în extractele vegetale de *O. vulgare* au fost analizați în baza următorilor indici: media aritmetică (\bar{x}), dispersia (s^2), abaterea standard (SD), eroarea mediei ($s_{\bar{x}}$). Toate datele sunt prezentate ca medie \pm eroarea standard a mediei (SEM). Folosind instrumentele de analiză ale softului XLSTAT (<https://www.xlstat.com>) au fost determinate diferențele statistic semnificative între cele 7 subpopulații din flora spontană (nivel intrapopulațional) realizate prin testul ANOVA urmat de testul comparațiilor multiple *Bonferroni* care indică prin diferite litere minuscule în tabele diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații [122].

Activitatea transcripțională a genelor studiate pentru șapte subpopulații a fost analizată în baza indicilor: valoarea expresiei relative calculată după formula $2^{-\Delta Ct}$ [162], în unități convenționale (u.c.), media aritmetică (\bar{x}), dispersia (s^2), abaterea standard (SD), eroarea mediei ($s_{\bar{x}}$). Datele sunt prezentate ca medie \pm eroarea standard a mediei (SEM). A fost aplicat testul ANOVA urmat de testul comparațiilor multiple *Bonferroni* [122] care indică prin diferite litere minuscule în grafice diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații utilizând softul XLSTAT. Coeficientul de corelare a rangului *Spearman* [110] și de corelație liniară *Pearson* (r_s , r , $P = 0,05$) au fost calculați între cantitățile de terpenă și nivelurile de transcripți a genelor folosind instrumentele de analiză ale aplicației Microsoft Office Excel 2010. Folosind softul XLSTAT a fost aplicat Testul *Mantel* [86] în identificarea asocierilor corelative dintre parametrii morfologici, moleculari, biochimici și transcriptomici.

2.3. Concluzii la capitolul 2

Strategia de cercetare a proiectului experimental include următoarele etape:

- identificarea subpopulațiilor de *Origanum vulgare* în baza studiului literaturii de specialitate și prelevarea din flora spontană;
- studiul caracterelor morfologice în scopul determinării diversității fenotipice;
- cercetări biochimice calitative și cantitative a compușilor metabolismului secundar în extractele vegetale ale subpopulațiilor;
- genotiparea speciei în baza unor markeri moleculari (RAPD, EST-SSR) privind studiul variabilității moleculare;
- investigarea nivelului de expresie a genelor cu rol esențial în biosinteza compușilor metabolismului secundar;
- determinarea asocierilor corelative între parametrii studiați în scopul identificării unor aspecte cu rol fiziologic în adaptarea plantelor la condițiile de mediu, cât și a evaluării germoplasmei în perspectiva ameliorării, conservării și exploatării resursei vegetale autohtone de *O. vulgare*.

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

Cunoașterea diversității și a relațiilor genetice între indivizi, în contextul dinamic al factorilor de mediu, inclusiv al managementului antropic al fitocenozelor, este primordială în elaborarea strategiilor eficiente de ameliorare și conservare a resurselor vegetale. Diferite concepte și abordări susțin demersul practic al cercetării variabilității bazat pe date morfologice, biochimice și mai recent, date moleculare, care constituie variabile corelate între ele în cele mai multe cazuri. Astfel, primul obiectiv în *studiul diversității structurale și funcționale la specia O. vulgare ssp. vulgare* reprezintă analiza variabilității morfologice a șapte subpopulații prelevate din flora spontană a rezervației Orheiul Vechi, (notate convențional Or1-Or7) în aspect comparativ cu trei subpopulații din colecția de plante medicinale a Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru” din mun. Chișinău (notate Ch8-Ch10).

Este cunoscut faptul că schimbările de mediu și condițiile de creștere a plantelor, în multe cazuri, induc capacitatea de a genera un răspuns fenotipic imediat, cu rol esențial în apariția polifenismului determinat ecologic în cadrul populației, iar ulterior și al diferențierii genetice. De aceea, pentru a avea o caracteristică morfologică cât mai completă a plantelor din habitatul natural și din cultura experimentală, zece caractere calitative și cantitative au fost investigate: *culoarea florilor*, *înălțimea plantei (HP)*, *diametrul tulpinii (DT)*, *numărul de ramuri pe plantă (RP)*, *lungimea ramurii (LR)*, *numărul de frunze pe nod (FN)*, *numărul de noduri pe tulpină (NT)*, *distanța dintre internoduri (DI)*, *lungimea și lățimea frunzei (LF respectiv IF)* (a 5-a frunză de la bază) la faza de înflorire deplină.

În cadrul investigațiilor prezentate în acest capitol s-au urmărit, la nivel intra- și interpopulațional, următoarele aspecte:

- *particularitățile distinctive ale fenotipului plantelor de O. vulgare în baza analizelor biometrice macroscopice;*
- *identificarea și cuantificarea relațiilor de asociere dintre caracterele morfologice cantitative;*
- *estimarea contribuției parametrilor morfologici în diferențierea subpopulațiilor de O. vulgare.*

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

Plantele de *O. vulgare ssp. vulgare* din cele două populații investigate, versantul Butuceni, rezervația Orheiul Vechi și colecția GBNI, municipiul Chișinău, prezintă caracteristici fenotipice generale descrise pentru *O. vulgare ssp. vulgare* [190]. Astfel, plantele sunt grupate în tufe, care

pornesc dintr-un rizom orizontal cu numeroase rădăcini filiforme (Figura 3.1, C). Tulpinile sunt pubescente, ascendente, ramificate cu lăstari sterili și floriferi. Frunzele sunt de formă ovală, opuse, întregi, acoperite cu peri fini și pețiolate. Florile formează o inflorescență densă corimbiformă cu cime contractate (Figura 3.1, A, B, D). Corola este bilabiată, tubuloasă, infundibuliformă din care se observă androceul format din 4 stamine fertile cu filamente divergente și gineceu cu stil lung (Figura 3.1, A).

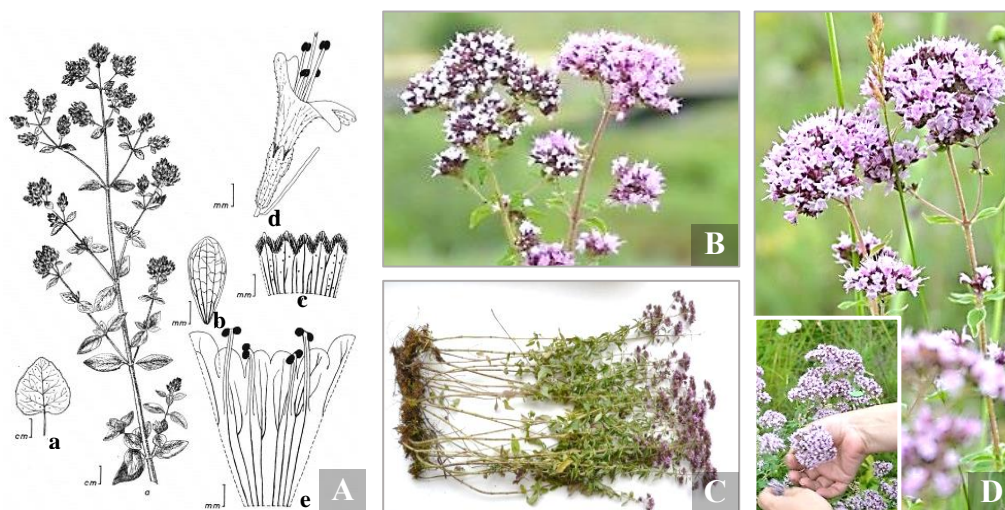


Fig. 3.1. Fenotipul plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană

Notă: A – *O. vulgare* ssp. *vulgare*: a. frunză; b. bractee; c. caliciu; d. floarea cu bractee, vedere laterală; e. corolă [130]; B – exemplu de variabilitate la nivelul caracteristicii morfologice calitative – culoarea inflorescențelor; C – exemplu de plante grupate în tufe, cu același rizom și numeroase rădăcini filiforme; D – aspectul general al inflorescenței în faza de înflorire.

Culoarea florilor determinată în conformitate cu RHS Color Chart (UPOV- International Union For The Protection Of New Varieties Of Plants) [286] la plantele din subpopulațiile rezervației naturale prezintă diferite nuanțe de violet: violet-pal (Or5 și Or7), violet-deschis (Or2, Or3, Or4 și Or6) și violet-purpuriu (Or1) (Figura 3.2).

Culoarea florilor	Subpopulații	
	Or1-Or7	Ch8-Ch10
<i>Alb-roze</i>		8
<i>Roz pal</i>		10
<i>Violet pal</i>	5 7	9
<i>Violet deschis</i>	2 3 4 6	
<i>Violet-purpuriu</i>	1	

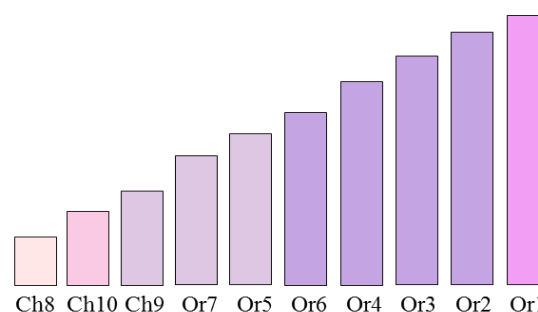


Fig. 3.2. Variabilitatea culorii florilor la subpopulațiile de *O. vulgare* studiate

Spre deosebire de plantele din flora spontană, care au prezentat un anumit grad de

diversitate intrapopulațională după intensitatea uneia și aceleiași culori a corolei – violet, plantele din cultura experimentală (notate Ch8, 9, 10) se caracterizează prin culori alb-roze – Ch8, violet - pal – Ch9 și roz-pal – Ch10 (Figura 3.2 și 3.3).



Fig. 3.3. Cele zece subpopulații de *O. vulgare* luate în studiu

Notă: Or1-Or7 – subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană; Ch8-Ch10 – subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din colecție.

Analiza biometrică a parametrilor morfologici pune în evidență variabilitatea intra- și interpopulațională, manifestată diferit în funcție de caracterul analizat (Figura 3.4., Anexa 1).

Înălțimea plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană prezintă valori medii mai mici (34-55 cm) comparativ cu cele constatate la plantele din colecție (59-79 cm). Subpopulația Or2 are doar 33,7 cm, cu 43-57% mai puțin decât subpopulațiile Ch8-10. Dintre subpopulațiile cultivate, Ch9 cu florile violet-pal are plantele cele mai înalte (78,6 cm). Dintre toate 10 subpopulații, doar Or2, Or3, Or4 și Ch9 prezintă diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$) față de toate subpopulațiile luate în studiu.

Lungimea ramurilor se evidențiază la Or7 (5,5 cm), cu diferențe semnificative față de toate subpopulațiile, cu excepția Ch10 ($p = 0,06$). Plantele din Or1 și Or2 au cele mai mici valori

medii (2,2, respectiv 1,8 cm; $p < 0,05$) și sunt singurele care se diferențiază statistic de toate subpopulațiile. Cele din Ch8, Ch9 și Ch10 nu se deosebesc între ele după *lungimea ramurilor* ($p = 0,06-0,21$), comparativ cu plantele din Or7, care sunt cu 11-22% mai scurte.

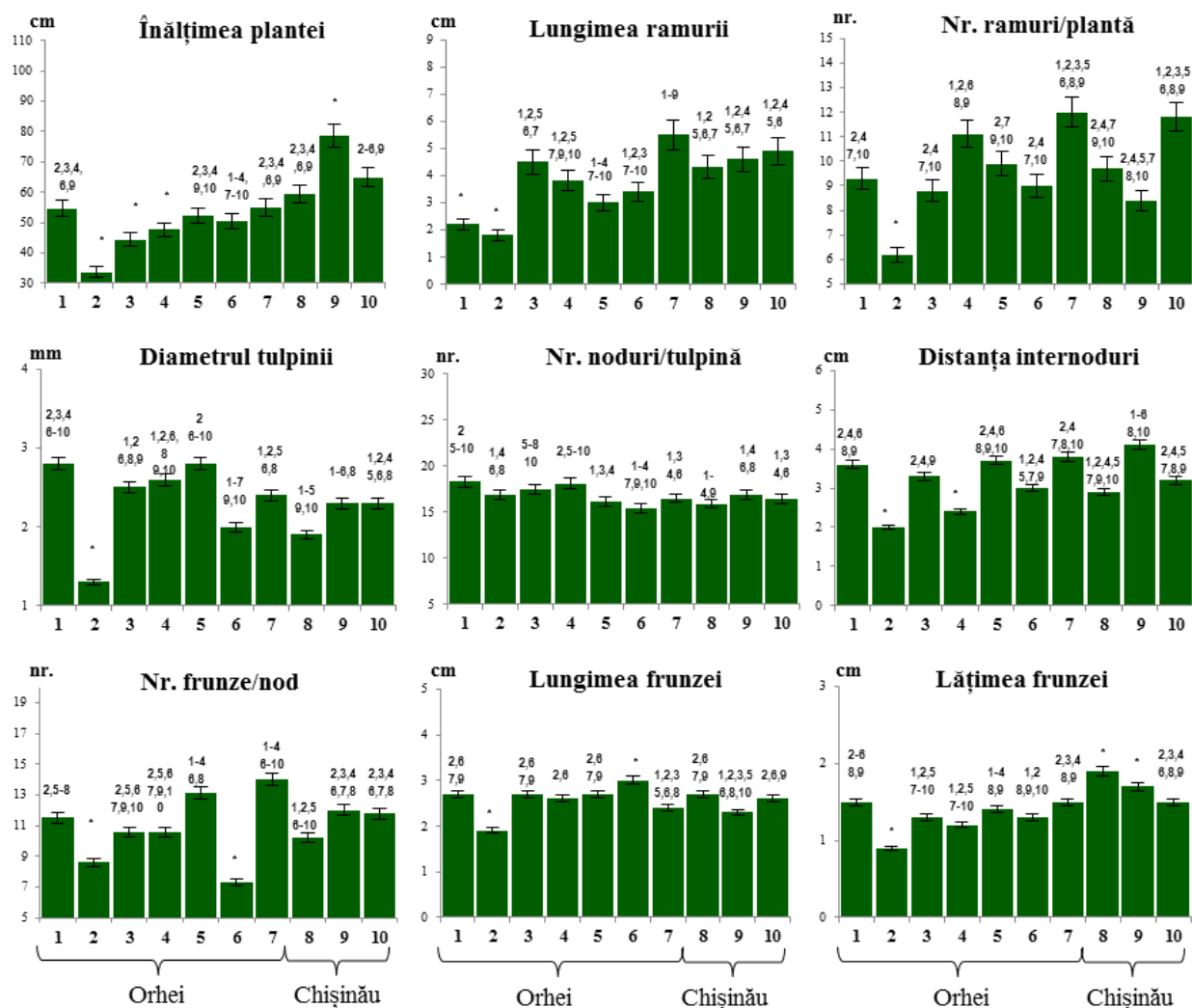


Fig. 3.4. Variația parametrilor morfologici la cele 10 subpopulații de *O. vulgare*

Notă: Valorile medii și deviația standard a mediei; * – diferențele statistic semnificative ($p < 0,05$; $t_{95\%}$) față de toate subpopulațiile; 1-10 – subpopulațiile față de care prezintă diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$; $t_{95\%}$).

Numărul de ramuri pe plantă variază, în medie, de la 6,2 (Or2) până la 12 (Or7) și relevă, similar parametrului precedent, valoarea minimă pentru Or2 și maximă pentru Or7, ambele din flora spontană. Deși la plantele din Ch8, Ch9 și Ch10 *numărul de ramuri* nu diferă esențial (9,7; 8,4; respectiv 11,8), aceste diferențe sunt statistic semnificative ($p < 0,05$). Plantele din Ch8 și Ch9 au un *număr de ramuri* cu 19% respectiv 30% mai mic în comparație cu cei din Or7.

Diametrul tulpinii plantelor este un alt parametru morfologic studiat, care de asemenea a evidențiat Or2 ca subpopulația cu valoarea cea mai mică a mediei *diametrului tulpinii* (1,3 mm). Subpopulațiile Or1, Or3, Or4 și Or5 s-au caracterizat prin valori medii înalte, Or1 și Or5, atingând

maximul de 2,8 mm.

Subpopulațiile colecției GBNI au *diametrul tulpinii* între 1,9-2,3 mm, cu 18-32% mai puțin în raport cu valoarea maximală depistată.

Numărul de noduri pe tulpină variază între 15-18 la plantele din flora spontană spre deosebire de cele din cultură care au între 16-17 noduri, relevând o particularitate slabă de discriminare a diferitor populații de *O. vulgare*.

Distanța internodurilor, în contrast cu *numărul de noduri* diferențiază genotipurile cu cele mai mici valori medii la Or2 (2 cm) și Or4 (2,4 cm), ceea ce constituie aproximativ 50% din valoarea maximă a *distanței internodurilor* constatată la plantele din Ch9 (4,1 cm). Plantele de *O. vulgare* din subpopulațiile Ch8 și Ch10 deși au un grad mai mare de omogenitate, diferențele dintre ele (de 0,9, respectiv 1,2 cm) sunt statistic semnificative ($p < 0,0001$).

Numărul de frunze pe nod similar *distanței internodurilor* prezintă un grad mare de variație în dependență de genotip, care exprimat în procente relevă 47% diferență dintre valoarea minimă (7,3 frunze) la Or6 și maximă (14 frunze) la Or7. Este important de menționat că și după *numărul de frunze/nod* subpopulația Or2 se menține în apropierea limitei inferioare a valorilor medii (8,6 frunze). Ambele Or2 și Or6 prezintă diferențe statistic semnificative în comparație cu toate subpopulațiile investigate. Subpopulațiile colecției de plante medicinale a GBNI au un număr mai mic (10-12) de frunze/nod (cu 14-27%) în raport cu valoarea maximă depistată (Or7). Ch8 cu flori alb-roze este diferită după acest parametru de Ch9 și Ch10 ($p < 0,0001$).

Lungimea frunzelor variază cu 37% între valoarea minimă de 1,9 cm (Or2) și maximă de 3 cm (Or6). Subpopulațiile Or1, Or3, Or4 și Or5 au valori apropiate ale acestui parametru și cu diferențe statistic nesemnificative. Populația prelevată din cultura experimentală, Ch9 indică cea mai mică valoare a *lungimii frunzelor* (cu 14%) comparativ cu Ch8 și Ch10, care au valori similare ale acestui parametru morfologic.

Lățimea frunzelor similar majorității parametrilor analizați indică valori eterogene (0,9-1,5 cm), cele mai mici, de asemenea fiind la Or2. Frunzele cu cea mai mare lățime au fost identificate la Ch8 (1,9 cm). De fapt, toate 3 subpopulații de la Grădina Botanică se evidențiază față de cele din flora spontană după parametrul analizat, ceea ce îi atribuie o caracteristică de diferențiator morfologic la nivel interpopulațional.

Generalizând datele de observație macroscopică la nivel intrapopulațional a plantelor din colecția GBNI se conturează valori medii comparativ mai mari pentru 5 parametri: *înălțimea plantei*, *diametrul tulpinii*, *numărul de noduri/tulpină*, *distanța internoduri* și *numărul de frunze/nod* la subpopulația Ch9; pentru câte 2 parametri: *numărul de ramuri/plantă* și *lungimea ramurii* la Ch10 și *lungimea și lățimea frunzei* la Ch8.

În cazul celor 7 subpopulații din flora spontană, se evidențiază Or7 cu maxime în valorile mediilor a 6 parametri: *înălțimea plantei, numărul de ramuri/plantă, lungimea ramurii, distanța internoduri, numărul de frunze/nod și lățimea frunzei*. Această subpopulație este urmată de Or1 cu 3 parametri: *diametrul tulpinii, numărul de noduri/tulpină, lungimea frunzei*. Subpopulația Or2 se caracterizează prin cele mai joase medii la 7 din 9 parametri măsurabili investigați. În cazul *numărului de frunze/nod și numărului de noduri/tulpină* deși subpopulațiile se caracterizează prin valori medii apropiate pentru acești parametri, diferențele între medii sunt statistic semnificative (Figura 3.4, Anexa 1). Astfel, valorile reduse ale parametrilor morfofiziologici investigați, care caracterizează plantele indigene, determină particularități xeromorfe de adaptare la diferite condiții pedoclimatice.

3.2. Estimarea coeficientului de variație și corelație a parametrilor morfologici

Diversitatea morfologică a subpopulațiilor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* analizată în baza a zece parametri poate fi rezultatul atât al combinației factorilor de mediu (temperatură, precipitații), de habitat, cât și al interacțiunii factorilor genetici, ceea ce mărește gradul de complexitate și de instabilitate al expresiei fenotipice a caracterelor. În acest context, nu este suficientă determinarea valorii medii în calitate de indicator al tendinței generale în aprecierea caracteristicii de interes. Este relevant să fie evaluată omogenitatea valorilor individuale și gradul de reprezentativitate al acestora.

Coeficientul de variație (V%) este unul din principalii indicatori statistici, care pune în evidență variația valorilor individuale față de valoarea medie. Are și avantajul de a fi un indicator independent de unitățile de măsură. Astfel, analiza acestui indice demonstrează caracterul diferențiat al variației individuale în cadrul fiecărei subpopulații la nivelul celor nouă parametri biometrici luați în studiu (Tabelul 3.1 și 3.2).

Compararea variației individuale a plantelor din rezervația Orheiul Vechi a pus în evidență subpopulații: omogene, relativ omogene/eterogene și eterogene, în funcție de parametrul analizat. Un nivel de variație relativ eterogen se constată în cazul a trei parametri: *numărul de ramuri/plantă, distanța internoduri și numărul de frunze/nod* (Figura 3.5). Eterogen este doar un singur parametru din cei studiați – *lungimea ramurii* și doar la trei subpopulații Or3, Or4 și Or5. Nu se evidențiază nici-o subpopulație de plante indigene, care ar fi relativ eterogenă după majoritatea parametrilor analizați și nici care ar însuma concomitent cel puțin trei parametri cu V% comparativ cel mai mic.

Spre deosebire de subpopulațiile din flora spontană, cele din colecție (Ch8 și Ch9) sunt omogene și relativ omogene doar în cazul *numărului de ramuri/plantă, lungimii ramurii,*

numărului de frunze/nod. Ch10 se evidențiază printr-un nivel de variație comparativ mai mare ($10\% \leq V < 20\%$) în cazul a șapte parametri din nouă.

Tabelul 3.1. Coeficientul de variație a valorilor medii a parametrilor morfologici la subpopulațiile de *O. vulgare* din flora spontană (Or1-Or7)

Parametri morfologici	Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or6	Or7	Sucesiune descendentă a V%
<i>Înălțimea plantei</i>	9,77	6,61	10,35	6,98	8,02	5,07	10,73	7>3>1>5>4>2>6
<i>Nr. ramuri/plantă</i>	29,15	26,52	17,34	17,02	22,41	21,02	16,17	1>2>5>6>3>4>7
<i>Lungimea ramurii</i>	15,60	17,41	32,01	30,45	34,64	21,70	20,61	5>3>4>6>7>2>1
<i>Diametrul tulpinii</i>	13,05	17,36	18,03	13,00	10,67	13,50	14,58	3>2>7>6>1>4>5
<i>Nr. noduri/tulpină</i>	9,22	6,62	10,60	9,42	13,20	10,63	6,68	5>6>3>4>1>7>2
<i>Distanța internoduri</i>	25,28	10,88	29,46	16,97	8,26	14,75	18,84	3>1>7>4>6>2>5
<i>Nr. frunze/nod</i>	13,73	12,28	22,28	13,57	22,41	17,26	17,50	5>3>7>6>1>4>2
<i>Lungimea frunzei</i>	12,54	10,17	11,42	16,96	12,49	6,61	10,38	4>1>5>3>7>2>6
<i>Lățimea frunzei</i>	13,76	15,59	13,41	25,42	14,33	9,80	16,46	4>7>2>5>1>3>6

Notă: V % interpretare: populație omogenă ($V < 10\%$), relativ omogenă ($10\% \leq V < 20\%$), relativ eterogenă ($20\% \leq V < 30\%$), eterogenă ($> 30\%$) [13].

Tabelul 3.2. Coeficientul de variație a valorilor medii a parametrilor morfologici la subpopulațiile de *O. vulgare* din colecția GBNI (Ch8-Ch10)

Parametri morfologici	Ch8	Ch9	Ch10	Sucesiune descendentă a V%
<i>Înălțimea plantei</i>	2,90	3,42	5,40	10>8>9
<i>Nr. ramuri/plantă</i>	14,37	11,19	11,34	8>10>9
<i>Lungimea ramurii</i>	19,74	9,66	19,17	8>10>9
<i>Diametrul tulpinii</i>	9,38	7,70	12,13	10>8>9
<i>Nr. noduri/tulpină</i>	5,52	5,73	8,48	10>9>8
<i>Distanța internoduri</i>	8,93	8,50	18,75	10>8>9
<i>Nr. frunze/nod</i>	6,04	11,79	12,48	10>9>8
<i>Lungimea frunzei</i>	9,12	9,44	14,33	10>9>8
<i>Lățimea frunzei</i>	7,88	10,00	12,13	10>9>8

Notă: V % interpretare: populație omogenă ($V < 10\%$), relativ omogenă ($10\% \leq V < 20\%$), relativ eterogenă ($20\% \leq V < 30\%$), eterogenă ($> 30\%$) [13].

În baza analizei V% se desprinde concluzia că plantele studiate caracterizează bine subpopulațiile din care au fost extrase. Prin comparația valorilor medii ale coeficientului de variație (V, %) între cele două populații se constată o caracteristică comună – gradul de variație individuală cel mai mic la parametrii *înălțimea plantei* și *numărul de noduri/tulpină* și cel mai mare la *lungimea ramurilor* (Figura 3.5).

Reieșind din datele diferite ale coeficientului de variație în funcție de parametrul studiat, este necesar de analizat dacă există anumite interdependențe între caracterele morfologice și care este intensitatea legăturii între acești indici cantitativi pentru fiecare subpopulație, cuantificabilă prin **coeficientul de corelație**.

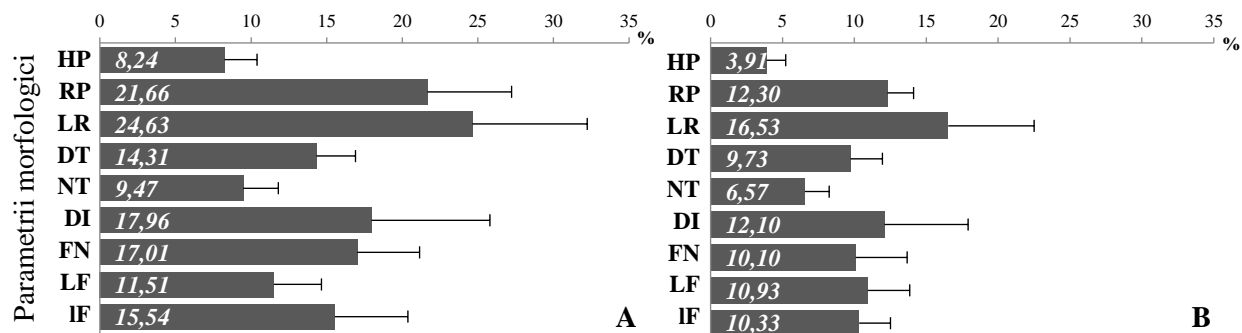


Fig. 3.5. Valorile medii ale coeficientului de variație (V, %) la populația prelevată din flora spontană (A) și din colecție (B)

Notă: HP – înălțimea plantei (cm); RP – nr. ramuri/plantă; LR – lungimea ramurii (cm); DT – diametrul tulpinii (mm); NT – nr. noduri/tulpină; DI – distanța internoduri (cm); FN – nr. frunze/nod; LF – lungimea frunzei (cm); IF – lățimea frunzei (cm); Barele reprezintă abaterea standard a valorii medii V% a parametrului în cadrul populației (Orhei/Chișinău).

Astfel, prin asocierea datelor pentru toate subpopulațiile în analiza corelațională (*Pearson*) au fost puse în evidență cele mai multe corelații statistic semnificative pentru *înălțimea plantei*, *numărul de frunze/nod* și *diametrul tulpinii* în pereche cu alte caractere (Tabelul 3.3). De exemplu, *înălțimea plantei* corelează slab cu diametrul tulpinii ($r = 0,48$), mediu cu nr. de ramuri/plantă ($r = 0,51$), lungimea ramurii ($r = 0,53$), numărul de frunze/nod ($r = 0,54$) și puternic cu distanța internoduri ($r = 0,80$) și cu lățimea frunzei ($r = 0,80$). *Numărul de ramuri/plantă* corelează mediu cu lungimea ramurii ($r = 0,65$), cu diametrul tulpinii ($r = 0,55$) și cu numărul de frunze/nod ($r = 0,58$). *Lungimea ramurii* corelează slab ($r = 0,46$) cu numărul de frunze/nod și lățimea frunzei. *Diametrul tulpinii* corelează slab cu numărul de noduri/tulpină ($r = 0,44$) și mediu cu numărul de frunze/nod ($r = 0,63$) și lungimea frunzei ($r = 0,53$). Parametrul *distanța internoduri* corelează mediu cu numărul de frunze/nod ($r = 0,69$) și lățimea frunzei ($r = 0,53$). Poate fi menționat faptul că parametrii: *numărul de noduri/tulpină* și *lungimea frunzei* formează doar câte o singură asociere corelativă. Cele mai multe corelații negative, însă statistic nesemnificative, sunt observate la caracterele în pereche cu *numărul de noduri/tulpină*.

Coeficienții de corelație între caracterele morfologice măsurabile, analizați separat pe subpopulații, relevă un tablou diferit (Anexa 2). Se evidențiază subpopulația Or2 prin lipsa corelațiilor statistic semnificative între caracterele morfologice cu o singură excepție (*numărul de frunze/nod:distanța internoduri*, $r = 0,46$) și Ch10 cu cele mai multe corelații (13 perechi de caractere) majoritatea fiind de intensitate medie, relevând interrelații homeostatice de creștere și dezvoltate a plantelor.

Tabelul 3.3. Coeficienții de corelație *Pearson* între parametrii morfologici la cele zece subpopulații de *O. 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: HP – înălțimea plantei (cm); RP – nr. ramuri/plantă; LR – lungimea ramurii (cm); DT – diametrul tulpinii (mm); NT – nr. noduri/tulpină; DI – distanța internoduri (cm); FN – nr. frunze/nod; LF – lungimea frunzei (cm); IF – lățimea frunzei (cm); * – corelații statistic semnificative (*Pearson* r (20), P=95%).

Corelații negative, statistic semnificative, au fost identificate în câteva cazuri la subpopulațiile din flora spontană: la Or7 *diametrul tulpinii:înălțimea plantei* ($r=-0,49$) și *lungimea frunzei:distanța internoduri* ($r=-0,46$), la Or6 *diametrul tulpinii:numărul de noduri/tulpină* ($r=-0,84$) și la Or1 *lungimea frunzei:numărul de ramuri/plantă* ($r=-0,58$).

Coeficienții de corelație între caracterele morfologice cu valori statistic nesemnificative, constatați în cadrul acestei cercetări, indică lipsa unor relații liniare directe sau indirecte, însă nu exclud alte tipuri de corelații.

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

Analiza bivariată a datelor oferă informații despre direcția și intensitatea asocierii dintre două variabile cantitative, reprezentând un prim pas în identificarea naturii relației dintre acestea. Deseori, aceste conexiuni corelative, sunt asociate cu un nivel înalt de redundanță informațională, indezirabilă în identificarea variațiilor specifice datelor biologice multivariate.

În această ordine de idei, următorul aspect în studiul diversității morfologice a plantelor de *O. vulgare* este consacrat identificării unor factori, cu pondere procentuală mare în diferențierea fenotipului subpopulațiilor studiate și care ar sugera o anumită relație de cauzalitate dintre condițiile ecologice de creștere (habitat natural și condiții controlate) și gradul de plasticitate al organismului vegetal.

Urmând etapele Analizei Componentelor Principale (ACP) pe baza matricei de corelație a valorilor medii ale parametrilor morfologici (ACP normat, alegere determinată de variabilele cu diferite unități de măsură), a fost generat tabelul valorilor proprii cu 7 CP (componente principale)/Factori, prin care se explică 100% din varianța totală a datelor inițiale (Figura 3.6).

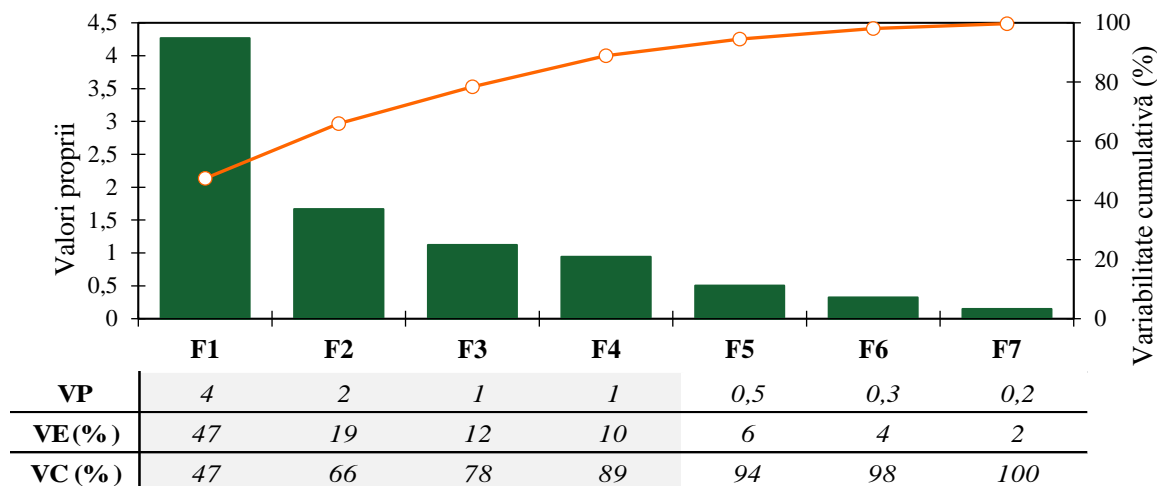


Fig. 3.6. Valorile proprii și procentul din varianța totală explicată de CP

Notă: VP – valorile proprii; VE – varianță explicată; VC – varianță cumulativă.

Sunt mai multe criterii pentru alegerea numărului de axe factoriale, respectiv a componentelor ce se vor interpreta, de ex. *criteriul lui Kaiser*, constă în alegerea numărului de axe pentru care valorile proprii sunt mai mari decât 1 (valabil doar în ACP normat), *criteriul lui Evrard*, bazat pe reprezentarea grafică a valorilor proprii și urmărirea pantei, *criteriul lui Benzécri* care presupune alegerea aceluși număr de axe care explică mai mult de 70% din varianța totală a norului de puncte, format din variabile sau observații [101, 211].

Întrucât, doar în cazul a patru axe factoriale se respectă criteriile menționate, pentru calculele ulterioare au fost selectate primele CP1-4, care cumulativ explică 89% din varianța totală. Totodată, pentru a simplifica interpretarea modelului generat de ACP, s-a recurs la rotirea factorilor, care oferă un unghi de „vedere” mai bun. În acest exemplu de analiză a fost selectată metoda *varimax*, prin care se minimizează numărul de variabile cu încărcări mari pe fiecare factor/CP.

Astfel, în rezultatul analizei proiecțiilor grafice ale variabilelor cu valori \cos^2 mai mari de 0,5 (indice de calitate a reprezentării variabilelor pe harta factorială), șase pentru spațiul axelor factoriale CP1-CP2 (Figura 3.7, A) și trei pentru CP3-CP4 (Figura 3.7, B), a fost pus în evidență **profilul de asociere a variabilelor și coeficienții de corelație cu componentele principale.**

Parametrii de dimensiune: *înălțimea plantei* ($r = 0,88$), *distanța internodurilor* ($r = 0,88$) și *lățimea frunzei* ($r = 0,79$) se asociază într-un singur grup în apropiere de CP1 – componentă cu cea mai mare pondere informațională (varianță). CP2 este corelată mediu și puternic cu alte trei variabile: *diametrul tulpinii* ($r = 0,74$), *nr. noduri/tulpină* ($r = 0,87$) și *nr. frunze/nod* ($r = 0,87$). Componenta a treia (CP3) este corelată doar cu un singur parametru morfologic – *lungimea frunzei* ($r = 0,95$), iar CP4 cu *lungimea ramurii* ($r = 0,82$) și *nr. de ramuri/plantă* ($r = 0,87$).

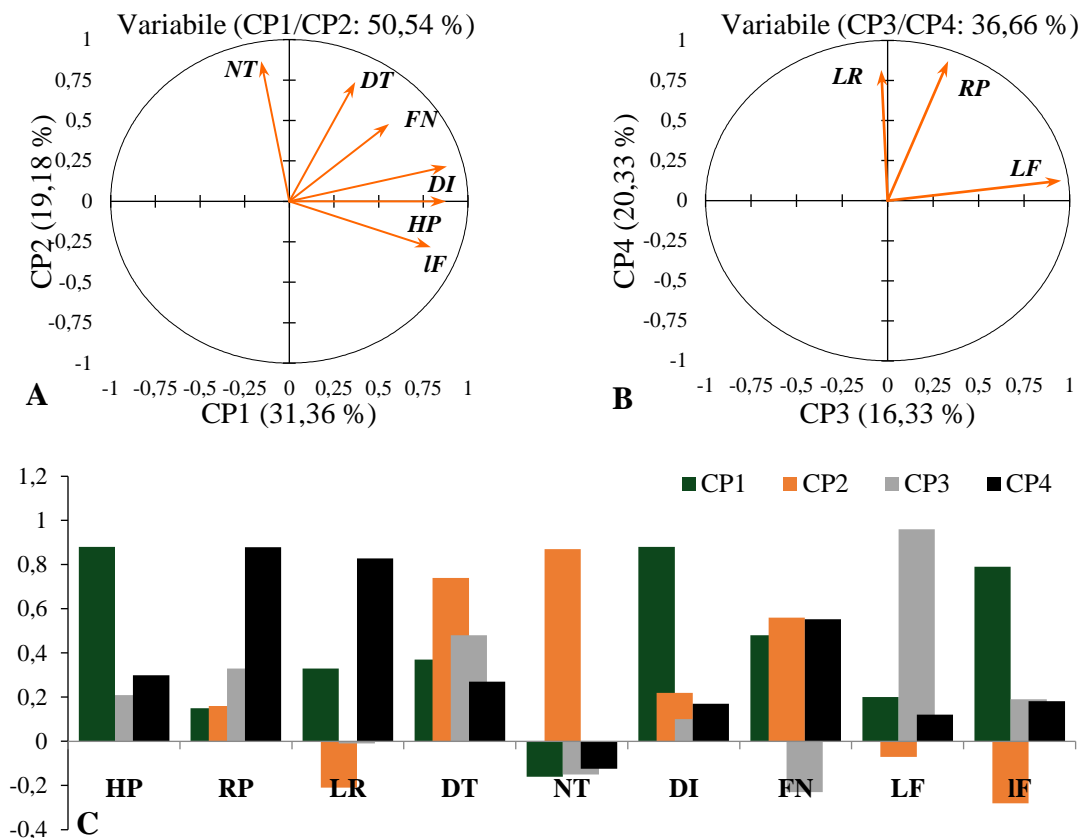


Fig. 3.7. Corelații între variabile și componentele principale

Notă: **A.** Coeficienții de corelație dintre variabile, CP1 și CP2 pe cercul de corelații; **B.** Coeficienții de corelație dintre variabile, CP3 și CP4 pe cercul de corelații; **C.** Reprezentarea grafică a coeficienților de corelație dintre variabile și primele patru CP; HP – înălțimea plantei (cm); RP – nr. ramuri/plantă; LR – lungimea ramurii (cm); DT – diametrul tulpinii (mm); NT – nr. noduri/tulpină; DI – distanța internoduri (cm); FN – nr. frunze/nod; LF – lungimea frunzei (cm); IF – lățimea frunzei (cm).

Conform principiului ACP, variabilele corelate cu primele componente sunt cele mai importante. În cazul dat, sunt șase variabile (CP1-CP2) care asigură interpretarea a mai mult de 50% din datele inițiale cu privire la variabilitatea morfologică a subpopulațiilor de *O. vulgare* din flora spontană și colecție.

Variabilele (caracterele morfologice) care reprezintă CP au contribuții (în procente) diferite. Valoarea medie a contribuției așteptate (*valoarea prag*) a unei variabile, calculată reieșind din numărul total de variabile (9) este de 11,11% (Tabelul 3.4).

În concluzie, analiza factorială a nouă parametri biometrici studiați (variabile) a pus în evidență 4 combinații de variabile inițiale, reprezentate prin CP necorelate între ele și cu pondere diferită în explicarea variabilității (varianței) morfologice intrapopulaționale:

- **CP1** – distanța internoduri (27,57%), înălțimea plantei (27,30%) și lățimea frunzei (22,23%);
- **CP2** – nr. noduri/tulpină (43,48%), diametrul tulpinii (31,55%) și nr. frunze/nod (13,28%);
- **CP3** – lungimea frunzei (64,77%), CP nu este bine definită întrucât corelează puternic doar cu

o singură variabilă;

- **CP4** – nr. ramuri/plantă (38,28%) și lungimea ramurii (33,96%).

Tabelul 3.4. Valorile contribuției (%) parametrilor în cadrul componentelor principale (CP1-CP4) ale analizei ACP

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

Spre deosebire de variabile, la care proiecțiile grafice afișează coeficienții de corelație cu componentele principale, în cazul observațiilor (subpopulațiilor) sunt prezentate scorurile factoriale (coordonatele). Deoarece coordonatele punctelor-observații pot fi proiectate astfel încât să permită suprapunerea celor două grafice (variabile și observații) este posibil de identificat grupurile de asociere dintre observații prin variabilele apropiate (Figura 3.8).

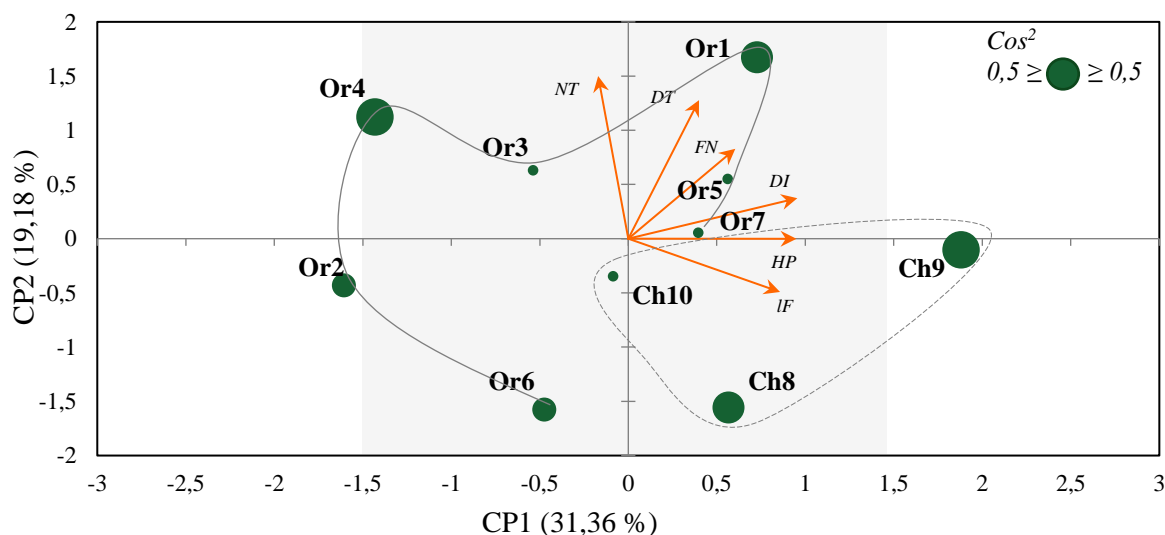


Fig. 3.8. Coordonatele observațiilor (subpopulațiilor) și a variabilelor (parametrii morfometrici) pe dimensiunile ACP (axe CP1 și CP2, post-rotație)

Notă: HP – înălțimea plantei (cm); RP – nr. ramuri/plantă; LR – lungimea ramurii (cm); DT – diametrul tulpinii (mm); NT – nr. noduri/tulpină; DI – distanța internoduri (cm); FN – nr. frunze/nod; LF – lungimea frunzei (cm); IF – lățimea frunzei (cm).

Astfel, conform modelului de variație a subpopulațiilor în funcție de parametrii morfologici analizați generat de ACP, se observă că cele mai distanțe/disimilare sunt subpopulațiile Or2 și Ch9. Celelalte opt subpopulații aparțin unui singur nor de puncte cu scorul factorial inclus în intervalul [-1,5; 1,5]. Analiza subpopulațiilor din colecția GBNI relevă o tendință de grupare, determinată preponderent de parametrii corelați cu CP1 (înălțimea plantei, distanța internoduri, lățimea frunzei). Spre deosebire de plantele din colecție, cele din flora spontană au o structură a populației mai dezorganizată (în trei cadrane diferite), fapt care sugerează prezența unor grupuri asociate ierarhic în bază de varii combinații de similaritate/ disimilaritate după unul sau mai mulți parametri morfologici.

Această concluzie se desprinde și din axele factoriale CP3 și CP4 (Figura 3.9), care aduce un plus de informație (37%) cu privire la variabilele lungimea frunzei, lungimea ramurii și nr. ramuri/plantă, ultimele două având cel mai mare coeficient de variație (Figura 3.5).

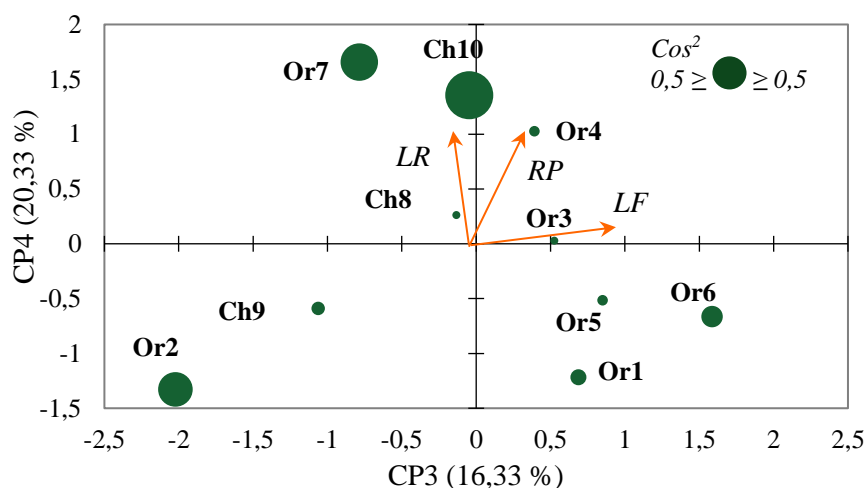


Fig. 3.9. Coordonatele observațiilor (subpopulațiilor) și a variabilelor (parametrii morfometrici) pe dimensiunile ACP (axele CP3 și CP4, post-rotatie)

Notă: HP – înălțimea plantei (cm); RP – nr. ramuri/plantă; LR – lungimea ramurii (cm); DT – diametrul tulpinii (mm); NT – nr. noduri/tulpină; DI – distanța internoduri (cm); FN – nr. frunze/nod; LF – lungimea frunzei (cm); IF – lățimea frunzei (cm).

Anume acești trei parametri determină contextul unor grupe noi de asemănare a subpopulațiilor, de exemplu: Or1, Or5 și Or6 (cadrantul IV) sau Or7, Ch10 și Ch8 (cadrantul II). În cazul a trei subpopulații Or3, Or4 și Or2 se remarcă aceleași caracteristici de similaritate/disimilaritate determinate de cele 6 variabile corelate cu CP1 și CP2. Un alt aspect, care merită atenție se referă la populația din colecția GBNI la care se observă o tendință de discriminare a celor trei subpopulații.

În scopul identificării unor grupuri de asociere și totodată al confirmării modelului de

analiză factorială obținut în baza datelor morfologice s-a realizat **analiza cluster** a datelor (*agglomerative hierarchical clustering*) în baza diferitor indici de grupare (*Dice coefficient*, *Pearson correlation coefficient*, *Squared Euclidean distance*).

În Figura 3.10 este redată dendrograma construită în baza distanței *Euclidiene*, opțiunea pentru acest principiu de grupare fiind determinată de indicele *Cofenetic* (valoarea căruia determină utilitatea și corectitudinea aplicării metodei de clusterizare), care a avut cele mai mari valori (0,59).

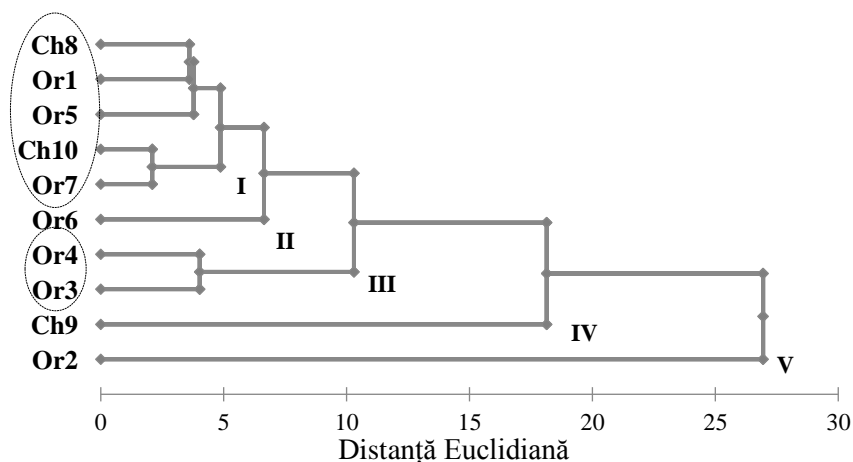


Fig. 3.10. Dendrograma obținută în baza valorilor medii ale parametrilor morfologici

Notă: Principiul clusterizării: varianta aglomerativă (*agglomerative hierarchical clustering*), distanța *Euclidiană*, măsură de disimilaritate *complete linkage*).

Din reprezentarea grafică a datelor se observă grupuri de subpopulații cu particularități morfologice manifestate similar (valori medii, coeficient de variație, corelații), care se includ în 5 clustere:

I – ({Or7,Ch10},{**Or1,Ch8**},{Or5});

II – ({**Or6**},{Or7,Ch10,Or1,Ch8,Or5});

III – ({**Or3,Or4**},{Or6,Or7,Ch10,Or1,Ch8,Or5});

IV – ({**Ch9**},{Or3,Or4,Or6,Or7,Ch10,Or1,Ch8,Or5});

V – ({**Or2**},{Ch9, Or3, Or4, Or6, Or7, Ch10, Or1, Ch8,Or5}).

Clusterele I-V (Figura 3.10) sunt prezentate în ordinea creșterii măsurii de disimilaritate, indicând subpopulația Or2 ca fiind cea mai diferită, urmată de Ch9. Astfel, conform structurii cluster obținute, au fost identificate în baza datelor morfologice inițiale, grupuri de subpopulații ierarhizate după gradul de disimilaritate, care ipotetic au fost relevate de ACP prin cele 4 componente principale, făcând dovada completării eficiente a acestor două metode de analiză.

Sinteza datelor analizate prin metode metrice, statistice și explorative a 9 caractere

morfologice cantitative la șapte subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană, comparativ cu trei subpopulații din colecție au pus în evidență anumite **particularități distinctive ale fenotipului plantelor de *O. vulgare*** studiate:

- Or1 – *valori medii maxime pentru diametrul tulpinii plantelor și în cazul a 2 parametri: numărul de noduri/tulpină, lungimea frunzei în cadrul populației din flora spontană;*
- Or2 – *cele mai mici valori medii la șapte din nouă parametri și lipsa corelațiilor (liniare) statistic semnificative între caracterele morfologice investigate;*
- Or4 – *cele mai mici valori ale parametrului distanța internodurilor;*
- Or6 – *valori maxime ale lungimii frunzelor și minime a numărului de frunze pe nod;*
- Or7 – *valori medii maxime pentru lungimea ramurilor și numărul de ramuri pe plantă și în cazul a 4 parametri: înălțimea plantei, distanța internoduri, numărul de frunze/nod și lățimea frunzei doar în cadrul populației din flora spontană;*
- Ch8 – *valori medii maxime în cazul lățimii frunzelor;*
- Ch9 – *cele mai mari valori în cazul a două caractere morfologice: înălțimea plantei și distanța internoduri (CP1) și a trei: diametrul tulpinii, numărul de noduri/tulpină, numărul de frunze/nod (CP2) doar în comparație cu celelalte două subpopulații din colecția GBNI.*
- Ch10 – *cele mai multe corelații statistic semnificative (13 perechi de caractere) majoritatea fiind de intensitate medie;*

și parametrii morfologici care **diferențiază cel mai bine plantele la nivel intra- și interpopulațional:**

- *înălțimea plantei, numărul de frunze/nod, diametrul tulpinii, care în pereche cu alte caractere au cele mai multe corelații statistic semnificative;*
- *numărul de noduri/tulpină, are doar o singură asociere corelativă statistic semnificativă deși foarte slabă cu diametrul tulpinii;*
- *distanța internodurilor este parametrul care determină cel mai mare grad de variabilitate a subpopulațiilor la nivel intrapopulațional, atât la plantele din flora spontană, cât și la cele din cultură;*
- *lățimea frunzei, parametru evidențiat ca diferențiator morfologic la nivel interpopulațional (Orhei/ Chișinău), relevând particularități xeromorfe de adaptare a plantelor indigene.*

Subpopulația Or2 în habitatul său natural se află la o altitudine mai mare comparativ cu celelalte cinci subpopulații (Or1-Or6) colectate de pe versantul Butuceni al rezervației Orheiul Vechi, sol calcaros, fapt care explică valorile reduse ale majorității indicilor morfologici, plasând-o într-un grup separat și cel mai distant. Se consideră că înălțimea redusă a plantelor

reflectă o strategie de adaptare pentru a evita efectul mecanic dăunător al vânturilor puternice la înălțimi mari [153] pe de o parte, iar pe de alta, această caracteristică este asociată cu temperaturi relativ mai scăzute, un conținut limitat de nutrienți și apă [71, 142]. Un factor important este și luminozitatea determinată de gradul de înclinare a reliefului (expoziția versantului Butuceni este spre nord, nord-est). Combinația acestor factori exercită asupra plantelor anumite stări de stres, manifestate prin modificări în morfologia, anatomia, fiziologia și respectiv în productivitatea acestora. Studii similare au fost realizate de Andi S. și colab. (2011), care au evaluat 144 de genotipuri din douăzeci și patru de populații de *O. vulgare* cultivate în Iran, inclusiv două subspecii (ssp. *viride* și ssp. *vulgare*), după 32 de caractere morfologice cantitative și calitative, relevând un grad înalt de diversitate printre populații. În baza analizei PCA (*Principal Component Analysis*), autorii au concluzionat că aproximativ 86% din variații se datorează în special caracterelor: lungimea internodului al doilea, frunzei, inflorescenței și a pedunculului, media numărului de inflorescențe pe tulpină, culoarea corolei, lungimea pețiolului [33].

Cercetările realizate de Cserhati B. și echipa (2012) au pus în evidență un grad înalt de variabilitate a populațiilor de *O. vulgare* din Ungaria, argumentând diferențele fenotipice în funcție de parametrii ecologici ai habitatului natural [74].

Datele obținute și prezentate în acest capitol relevă informații utile, care fiind corelate cu particularități fiziologice, biochimice și moleculare, completează cunoștințele privind caracteristica germoplasmei de *O. vulgare* din flora spontană autohtonă și pot contribui în estimarea randamentului anumitor caracteristici valoroase pentru scopuri alimentare și medicinale.

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Plantele investigate prezintă trăsături fenotipice generale, descrise pentru specia *O. vulgare* ssp. *vulgare*. La plantele din flora spontană s-a constatat o diversitate intrapopulațională după intensitatea unei și aceleași culori a corolei – violet, spre deosebire de cei de la Grădina Botanică cu culori de alb-roze (Ch8), violet-pal (Ch9) și roz-pal (Ch10).

2. Plantele de *O. vulgare* din cultura experimentală reprezintă un grad general (după majoritatea parametrilor) de variabilitate morfologică mai mic comparativ cu plantele din flora spontană. Cele mai omogene subpopulații sunt Ch8 și Ch9. Populația de plante din rezervația Orheiul Vechi se caracterizează prin diferite grade de variație a caracterelor morfologice (omogen, relativ omogen/eterogen, eterogen). La nivel intrapopulațional nu a fost identificată nici o subpopulație care ar avea cel puțin trei parametri cu V% cel mai mic. Caracteristic pentru

ambele populații este gradul mic de variație individuală în cazul parametrilor *înălțimea plantei* și *numărul de noduri/tulpină* și mare – în cazul *lungimii ramurilor* [16].

3. Cele mai multe corelații statistic semnificative s-au constatat pentru *înălțimea plantei*, *numărul de frunze pe nod* și *diametrul tulpinii* în pereche cu alte caractere. Analiza coeficienților de corelație între caracterele morfologice măsurabile, separat pe subpopulații, evidențiază subpopulația Or2 din flora spontană prin lipsa corelațiilor, cu o singură excepție (*numărul de frunze/nod:distanța internoduri*, $r=0,46$) și subpopulația Ch10 cu cele mai multe corelații (13 perechi de caractere), majoritatea fiind de intensitate medie.

4. Șase din nouă parametri morfologici diferențiază cel mai bine plantele de *O. vulgare* la nivel intra- și interpopulațional: *înălțimea plantei*, *numărul de frunze/nod*, *diametrul tulpinii*, *numărul de noduri/tulpină*, *distanța internodurilor* și *lățimea frunzei*. *Distanța internodurilor* este parametrul care determină cel mai mare grad de variabilitate a subpopulațiilor 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 (Orhei/Chișinău).

5. Au fost identificate cinci grupuri de subpopulații cu particularități morfologice manifestate similar (valori medii, coeficient de variație, corelații). Subpopulațiile cu cele mai multe caracteristici de asemănare sunt ($\{Or7,Ch10\}$, $\{Or1,Ch8\}$, $\{Or5\}$). Subpopulația indigenă Or2 urmată de Ch9, s-au remarcat prin cel mai mare nivel de disimilaritate față de celelalte opt [22].

6. Analiza a 10 parametri morfologici scoate în evidență polifenismul plantelor de *O. vulgare* la nivel intra- și interpopulațional, care poate fi rezultatul atât al unui context geografic, cât și al combinației de factori ecologici și genetici.

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

Caracteristica fenotipică a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană comparativ cu cele cultivate în condiții relativ controlate (cultură experimentală) a pus în evidență variabilitatea morfologică a plantelor indigene, determinată în special de șase caractere cantitative, dintre care s-a evidențiat *distanța internodurilor* la nivel intrapopulațional și *lățimea frunzei* la cel interpopulațional. Caracterele cantitative sunt determinate poligenic sub un control genetic complex. În această ordine de idei, diferențele constatate în trăsăturile morfologice la plantele studiate reflectă rezultatul variabilității neereditare (influența condițiilor de mediu) asociat cu cel al variabilității molecular-genetice ereditare (mutații, recombinări ale materialului genetic) – aspect care stă la baza următorului obiectiv general de investigații.

Pentru evaluarea variabilității moleculare intraspecifice a plantelor autohtone de *O. vulgare* au fost trasate următoarele obiective specifice:

- *amprentarea moleculară a plantelor de O. vulgare în scopul identificării polimorfismului molecular;*
- *identificarea locilor și a variantelor alelice cu contribuții semnificative în diferențierea molecular-genetică a subpopulațiilor din habitatul natural și din colecție;*
- *analiza structurii moleculare a două populații de O. vulgare ssp. vulgare.*

4.1. Genotiparea cu primeri RAPD

Studiul variabilității molecular-genetice poate fi realizat prin diferite tehnici de analiză moleculară, în dependență de nivelul de cunoaștere a genomului speciei de interes, capacitatea de rezoluție și alte caracteristici tehnice. De exemplu, în cazul speciilor de plante cu genomul secvențiat în totalitate sau parțial, cel mai des utilizate sunt tehnicile SSR, AFLP, iar în cazul lipsei de informații a secvențelor molecular-genetic se apelează la analize RAPD, AP-PCR, DAF, RFLP [47, 267]. Spre deosebire de alte plante medicinale la care genomul este cunoscut și disponibil în bazele de date (<http://medicinalplantgenomics.msu.edu/>) la specia *O. vulgare* este secvențiat doar genomul cloroplastic [165].

Primerii RAPD, sunt accesibili, au un cost redus, pot identifica un procent relativ mare de polimorfisme, fapt pentru care sunt utilizați pe larg în programe de *screening* molecular la diverse specii de PMA [36, 91, 145, 207, 225, 258, 268] inclusiv a plantelor de *Origanum* sp. [120, 152, 171, 182, 251, 259].

Aceste constatări au contribuit la decizia de a testa 27 de primeri RAPD în calitate de test

preliminar în evaluarea gradului de variabilitate molecular-genetică a plantelor autohtone de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Rezultatele acestei metode de genotipare au indicat lipsa produselor de amplificare în cazul a 5 primeri OPA₁, OPA₆, OPB₀₃, OLIGO_{A3} și OLIGO₂₈ și prezența unor benzi difuze, în repetiții diferite, la primerii OPI₁₆, OPU₁₁, OPE₁₇, OPU₀₉ și OPB₁₃. De asemenea, alți trei primeri (OLIGO₃₉₁, OPA₁₉ și OPB₀₁) au generat profile monomorfe, fapt pentru care, aceste date au fost excluse din analiză. În cazul a 14 primeri au fost relevate profile cu un număr variabil de ampliconi (7-16), cu lungimea cuprinsă între 160-4500 pb (Figura 4.1). Un număr mai mare al produselor de amplificare (15-16) a fost obținut la genotiparea cu primerii OPB₁₀ și OPG₁₀, în ambele cazuri fiind înregistrate câte șase benzi comune, șapte polimorfe și trei, respectiv, două benzi specifice. Însă, după ponderea procentuală a benzilor polimorfe (PBP) s-a evidențiat primerii UBC₂₁₅ și OPJ₀₁ care au generat în total zece fragmente dintre care opt sunt polimorfe cu diferite dimensiuni (250-1550 pb).

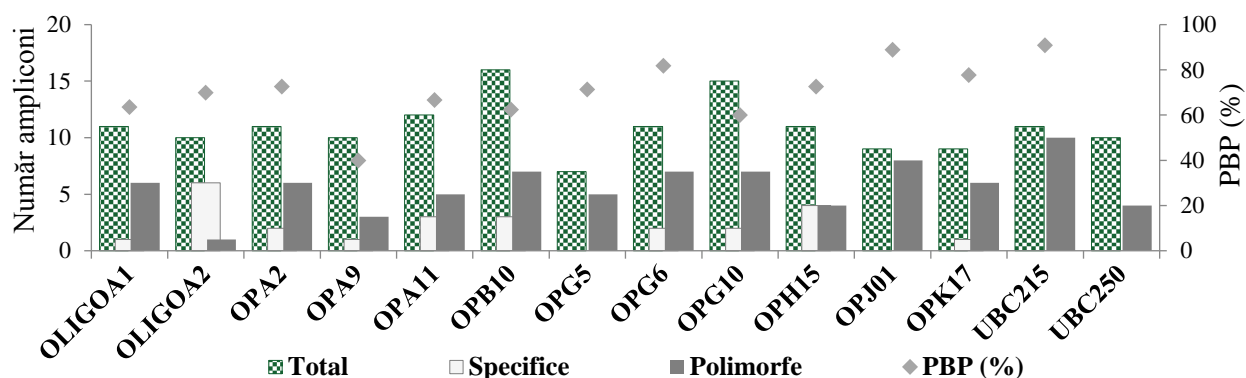


Fig. 4.1. Numărul de ampliconi specifici și polimorfi generați prin RAPD
 Notă: PBP – ponderea procentuală a benzilor polimorfe (total 152 de fragmente-100%).

Cele mai multe fragmente nespecifice (5-6) de diverse dimensiuni (270-3600 pb) au fost amplificate cu primerii OPA₉, OPB₁₀, OPG₁₀ și UBC₂₅₀. Numărul maxim de ampliconi specifici (6) a fost obținut cu primerul OLIGO_{A2} (OLIGO_{A2}³⁵⁰, OLIGO_{A2}³⁸⁰, OLIGO_{A2}⁹²⁵, OLIGO_{A2}¹¹⁰⁰, OLIGO_{A2}¹³⁸⁰ și OLIGO_{A2}¹⁷⁰⁰), urmat de OPB₁₀ și OPH₁₅, în cazul acestora fiind vizualizați în gelul de electroforeză patru produși specifici cu lungimea cuprinsă între 1300-4500 pb (Figura 4.2).

Analiza profilelor electroforetice a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din colecția GBNI a evidențiat un grad mai mic de variabilitate molecular-genetică (36,4% fragmente polimorfe) comparativ cu cele obținute pe matrița ADN-lui total izolat de la plantele din flora spontană (45,0%).

Polimorfismele depistate prin analiza RAPD pot rezulta teoretic din mai multe cauze:

inserția unui fragment de ADN între cele două situsuri de fixare ale primerului, determinând neamplificarea și astfel pierderea acestuia; deleția unui fragment de ADN purtător de secvență complementară unui sau mai multor situsuri de fixare ale primerului; substituții de nucleotide etc. ceea ce poate duce la prezența/absența polimorfismelor sau la o schimbare a mărimii fragmentelor amplificate.

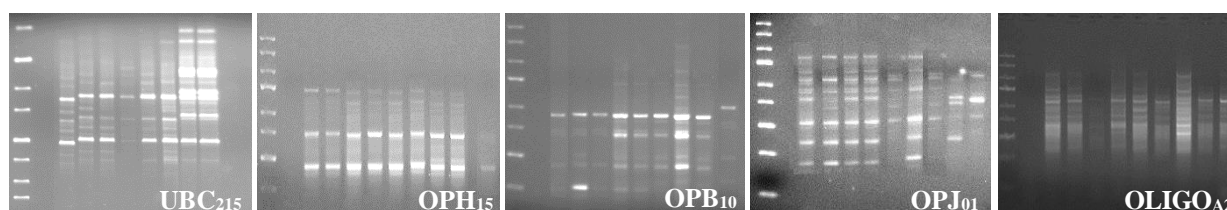


Fig. 4.2. Exemple de profile RAPD obținute pentru specia *O. vulgare ssp. vulgare*

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

Astfel, din datele primei etape de analiză a variabilității ADN-lui plantelor din diferite subpopulații se poate concluziona că primerii RAPD analizați sunt utili în estimarea eterogenității moleculare, în studiul de față fiind constatat un nivel mai înalt de variabilitate genetică la plantele din flora spontană, comparativ cu cele din colecție.

Deși genotiparea RAPD continuă să rămână una dintre etapele primare de analiză, necesare în stabilirea diferențelor genetice în baza cărora se elaborează markeri specifici, primerii arbitrari sunt puțin informativi în contextul obiectivelor prezentei cercetări. Întrucât cel puțin 95% din fragmentele RAPD se comportă ca markeri dominanți [258], frecvența alelelor esențială în studii de genetică populațională nu poate fi calculată. Nu este de neglijat și faptul că, rezultatele care se obțin depind într-o mare măsură și de irepetabilitatea experimentală specifică acestei metode, foarte sensibilă la componentele reacției și condițiile amplificării.

4.2. Variabilitatea secvențelor microsatelite (EST-SSR)

Genotiparea plantelor de *O. vulgare ssp. vulgare* cu primeri specifici SSR (*Simple Sequence Repeats*) reprezintă următorul obiectiv în identificarea și caracterizarea diversității genetice a subpopulațiilor autohtone de această specie. Utilizarea secvențelor repetitive în tandem în tehnicile de genotipare în calitate de markeri are o istorie de aproximativ 20 de ani, căpătând un rol considerabil în genetica și ameliorarea plantelor, ca urmare a faptului că au o locație specifică pe cromozom, sunt codominanți, multi-alelici, au acoperire extinsă a genomului, reproductibili experimental și pot fi utilizați la speciile înrudite. Întrucât, diferite alele pot exista la un anumit locus SSR, secvențele microsatelite sunt mult mai informative decât alți markeri moleculari,

inclusiv SNP-urile (*Single Nucleotide Polymorphism*) [176]. Tehnica SSR-PCR este în special utilă în cazul diferențierii speciilor/formelor sălbatice, în studii privind diversitatea măsurată pe baza distanței genetice; evaluarea fluxului de gene; identificarea relațiilor genetice intraspecifice [118, 225, 267, 268]. Mai mult ca atât, recent a luat amploare elaborarea markerilor microsateleți pe secvențe EST (*Expressed Sequence Tag*), din regiunile de codificare, astfel fiind posibilă evaluarea profilului genetic asociat unui fenotip biochimic de interes, de exemplu, terpenele sau alți metaboliți secundari, care reprezintă și unul din subiectele de cercetare ale prezentei investigații. Unul din avantajele primerilor EST-SSR constă în existența, în linii generale, a unui număr mic de alele nule și artefacte [277].

Aceste raționamente argumentează selectarea a unsprezece perechi de primeri (OR09, OR10, OR12, OR13, OR14, OR27, OR40, OR44, OR64, OR75 și OR81), elaborați de către Novak J. și colab. (2008) pe baza unor EST-uri din colecția de ADNc a țesutului epidermic glandular (*epidermal gland cells*) cu funcție de producere și depozitare a mono- și sesquiterpenelor [72], în calitate de markeri specifici pentru caracterizarea moleculară și estimarea variabilității genetice a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* studiate.

Genotiparea s-a realizat pe probe de ADN izolat de la plante individuale (20 de indivizi/subpopulație), fiind obținute amprente moleculare în baza cărora s-a analizat polimorfismul locilor și diversitatea alelică. Un aspect aparte revine cuantificării diversității genetice la nivel intra- și interpopulațional.

Ampreentele moleculare vizualizate prin SSR-PAGE au pus în evidență pentru fiecare subpopulație unul sau mai multe profile moleculare, diferite prin numărul și frecvența alelelor la același locus SSR (Anexele 3, 4 și 5). În cele ce urmează este prezentată o succintă caracteristică a amprentei moleculare pentru fiecare marker SSR:

- **OR09**, 6 alele (OR09^{140,146,150,165,170,181}), 10 profile genetice. Pentru toate plantele din 7 subpopulații s-a observat câte un singur profil. Mai multe profile sunt la: Or3 – 3, Or4 – 2, Ch10 – 2;
- **OR10**, 6 alele (OR10^{102,112,127,130,135,155}), 4 profile genetice. Subpopulațiile cu 2 sau mai multe profile sunt cele din flora spontană: Or3 – 3, Or4 și Or5 câte 2 profile fiecare. Subpopulațiile Or1, Or7, Ch8, Ch9 și Ch10 sunt monomorfe după acest locus, fiind observat un profil monoalelic – OR10¹¹². Cu excepția alelei OR10¹¹², prezentă la toate subpopulațiile studiate, celelalte 5 alele au o distribuție variabilă în cadrul celor 10 subpopulații;
- **OR12**, 8 alele (OR12^{100,115,117,125,128,135,140,150}), 13 profile. Subpopulațiile Or6, Ch9 și Ch10 au prezentat câte un singur profil, tetraalelic la Or6 și profil bialelic similar la Ch9 și Ch10. Celelalte șapte subpopulații s-au caracterizat prin 2 sau 3 profile electroforetice a câte 3-4 alele.

Un profil pentaalelic (OR12^{100/115/125/140/150}) a fost observat la două subpopulații - Or5 și Or7. Este important de menționat că la indivizii din flora spontană au fost vizualizate 8 variante alelice dintre care doar 3 (OR12^{100,115,117}) la plantele din colecție;

- **OR13**, 7 alele (OR13^{130,140,148,172,183,195,200}), 11 profile electroforetice. Alela OR13¹⁴⁸ este prezentă în genotipul plantelor la toate subpopulațiile studiate. Două alele: OR13^{172,200} sunt identificate doar la 2 (Or3, Or5) din cele 10 subpopulații analizate fiind specifice pentru populația naturală. Un număr diferit de profile alelice la acest locus este la Or3 – 4, Or4, Or5, Ch8 și Ch10 – 2 profile. Monomorfe după acest locus sunt subpopulațiile Or1 și Or2 cu un profil monoalelic (OR13¹⁴⁸), iar Or6, Or7, Ch9 cu un profil trialelic similar (OR13^{140/148/195});
- **OR14**, 6 alele (OR14^{87,91,95,98,100,112}), 11 profile. Varianta alelică OR14⁸⁷ se constată la toate subpopulațiile analizate cu excepția Ch10. OR14⁹⁸ este prezentă la plantele populației din flora spontană și absentă la cei din populația GBNI. Subpopulația Or3 și Ch9 se evidențiază cu câte 4 profile electroforetice dintre care unele sunt similare, iar Ch8 – 3 profile formate din 3-4 alele;
- **OR27**, 9 alele (OR27^{106,110,114,117,121,128,133,139,141}), șase profile a câte 1-4 fragmente. Subpopulațiile Or1-Or5 și Ch10 se caracterizează prin prezența a două profile mono-, tri- și tetraalelice, iar Or6, Or7, Ch8 și Ch9 – un singur profil. Or7 și Ch9 au același profil monoalelic (OR27¹¹⁰), față de Or6 și Ch8 care s-au evidențiat prin profile trialelice diferite (OR27^{106/117/139}, respectiv OR27^{117/128/133}). Alela OR27¹²¹ este specifică pentru indivizii din populația indigenă fiind identificată în genotipul plantelor din Or1 și Or2;
- **OR40**, 10 alele (OR40^{86,99,123,127,133,143,176,183,192,198}) în 17 combinații variate din 1-7 alele. Se evidențiază subpopulația Or3 cu șase profile diferite, Or4 – 5, Or5 și Or7 – 4 și Or1, Or2, Or6, Ch8 și Ch10 cu câte trei profile. Ch9 are un singur profil trialelic (OR40^{123/176/198}). Alela OR40¹⁷⁶ este prezentă la toate subpopulațiile studiate. Alelele OR40¹³³ și OR40¹⁸³ sunt specifice populației din flora spontană (Or4), iar OR40⁸⁶ este specifică populației din cultura experimentală (Ch8);
- **OR44**, 4 alele (OR44^{148,153,163,170}), 4 profile (1-3 alele) prezente la indivizii din ambele populații studiate, cu excepția alelei OR44¹⁶³, identificată doar la Or1 din habitatul natural. Alela OR44¹⁴⁸ se întâlnește la toate subpopulațiile analizate;
- **OR64**, 4 alele (OR64^{84,87,92,95}), 6 profile. Populația din colecția GBNI este monomorfă după acest locus, indivizii prezentând profil monoalelic (OR64⁸⁷) similar pentru toate cele 3 subpopulații. Variantele alelice OR64^{84,92,95} sunt identificate doar în genotipul plantelor din populația indigenă (alele specifice);
- **OR75**, 10 profile mono-, bi-, tri- și tetraalelice rezultate din variația a 11 alele (OR75^{78,86,91,94,98,100,103,106,108,114,117}). Cele mai multe profile sunt identificate la subpopulația

Or5 (3). Alelele OR75^{78,100,103,106,114} sunt prezente doar la plantele din subpopulațiile indigene iar OR75¹¹⁴ este specifică subpopulației Or1. Subpopulațiile Or2, Or6 și Or7 sunt monomorfe (un profil similar pentru toate plantele: trialelic – Or2, bialelic – Or6 și Or7);

- **OR81**, 11 alele (OR81^{136,145,155,158,166,178,187,193,197,202,210}), douăsprezece profile (1-5 fragmente). Cele mai multe profile sunt identificate la subpopulația Or3 (4 profile). Or1 și Or7 sunt monomorfe cu un profil monoalelic similar (OR81¹³⁶). Variantele alelice OR81^{187,197,210} sunt specifice pentru plantele din populația GBNI, iar OR81^{158,166} pentru cele din subpopulațiile habitatul natural (Or3 și Or4).

Plantele prelevate din flora spontană se caracterizează printr-un grad mai mare de polimorfism alelic al secvențelor microsatelite, prezentând în total de la 11 până la 29 profile diferite pentru un primer, câte 1-6 profile per subpopulație. Plantele GBNI, comparativ, sunt mai omogene, reieșind din numărul de 3-8 profile per primer (1-4 profile la o subpopulație) (Anexa 4). Markerii OR12, OR40 și OR75, s-au evidențiat prin cele mai diverse profile: mono-, bi-, tri-, tetraalelice etc.

Rata de mutație a unui anumit locus microsatelit este de obicei necunoscută. S-a constatat, că majoritatea microsateliților au rate de mutații ridicate, de aproximativ 10^{-3} [135, 272], care pot apărea la nivelul tipurilor de repetiții (di- tri- și tetranucleotide), unității repetitive [45], tipului de microsatelit (perfect – format în întregime din repetiții a unui singur motiv, compus – format din mai multe motive repetitive adiacente sau întrerupt – când o secvență de câteva perechi de baze este inserată între motive) [176]. Alți factori potențiali, de exemplu tipul secvențelor flancate sau poziția pe un cromozom, pot influența de asemenea gradul de variație al unui anumit microsatelit. Mai mult ca atât, chiar și la un anumit locus, rata de mutație poate varia, alelele lungi fiind în general mai predispușe la mutație decât cele mai scurte [232].

Pentru fiecare locus genic a fost determinat un număr diferit de alele (1-11) (Tabelul 4.1).

În mare parte, se consideră că polimorfismul microsateliților este generat de numărul de secvențe nucleotidice repetitive, astfel încât variabilitatea markerilor microsateliți se datorează diferențelor de lungime a alelelor [176]. De exemplu, locusul OR75 are cele mai multe alele (11), însă doar în cazul populației din flora spontană. La indivizii ambelor populații se identifică un număr aproximativ egal de alele, cu diferența de o singură alelă la 5 loci microsateliți: OR14, OR27, OR40, OR44 și OR81.

Markerii cei mai variabili după numărul de variante alelice între cele două populații sunt: OR10, OR12, OR75 cu o diferență de 5 alele și OR09, OR13, OR64, care diferă prin 2-3 alele. Dintre toți microsateliții utilizați, amplituda intervalului de valori ale lungimii alelelor este cea mai mare la locusul OR40, de 112 pb. Variantele alelice la alți doi loci OR13 și OR81, de asemenea,

variază într-un interval de valori suficient de larg, de 70 și 74 pb respectiv.

Tabelul 4.1. Particularități ale 11 secvențe microsatelite analizate la specia *O. vulgare*

Loci SSR	Unitatea repetitivă	Dimensiunea alelelor (pb)	Numărul alelelor		PIC	
			Pop. Or.	Pop. Ch.	Pop. Or.	Pop. Ch.
OR09	(TTTTTC) ₄ (T) ₅ (TTTTTC) ₁	140-181	6	3	0,67	0,44
OR10	(ACC) ₁ ATC(ACC) ₄	102-155	6	1	0,40	-
OR12	(AG) ₇ G(AG) ₃	100-150	8	3	0,80	0,50
OR13	(AAC) ₇ AGC(AAC) ₁	130-200	7	5	0,61	0,66
OR14	(GAT) ₈	87-112	6	5	0,56	0,58
OR27	(CCT) ₆	106-141	9	8	0,79	0,79
OR40	(GGT) ₄ GTT(GGT) ₁	86-198	9	8	0,78	0,82
OR44	(GAT) ₃ GAA(GAT) ₄	148-170	4	3	0,49	0,59
OR64	(AAG) ₁ A ₃ (AAG) ₆ A	84-95	4	1	0,57	-
OR75	(GCA) ₆	78-117	11	6	0,82	0,73
OR81	(CTTTT) ₃ AT ₈ (CTTTT) ₁ TT(CTTTT) ₁	136-210	8	9	0,64	0,72

Notă: Pop. Or.: populația din rezervația Orheiul Vechi; Pop. Ch.: populația din colecția GBNI (mun. Chișinău); PIC – conținutul informației polimorfe. Nivel înalt, PIC > 0,5; nivel moderat 0,25 < PIC < 0,5, nivel scăzut, PIC < 0,25.

Markerii analizați sunt simpli și complecși, care diferă atât după secvență, cât și după complexitatea motivului care se repetă, cu toate acestea, nu există o tendință relevantă pentru locii cu mai multe baze per unitate repetată, sau mai multe repetări per alelă/dimensiune (pb), pentru a avea niveluri mai mari de variație.

Un alt indicator relevant pentru măsurarea polimorfismului alelic la nivelul unui locus și al puterii de discriminare a markerului molecular este considerat *Conținutul informației polimorfe* (PIC). Astfel, în cadrul prezentei cercetări, markerii utilizați s-au remarcat prin valori diferite ale indicelui PIC, fiind observate două grupuri:

- OR13, OR14, OR27, OR40, OR75, OR81, la care s-a constatat un nivel înalt (> 0,5) al valorii PIC la ambele populații de plante studiate;
- OR09, OR10, OR12, OR44, OR64 cu valori PIC diferite (nivel scăzut, moderat și înalt), diferențiind astfel populațiile între ele. În același timp, este necesar de menționat faptul, că și la acești markeri valoarea PIC este mai mare (excepție OR44, valori aproximativ egale) la plantele populației din flora spontană comparativ cu cea relevată la cele din colecția GBNI.

Astfel, datele privind numărul de profile, de alele/profil și conținutul informației polimorfe, prin care se caracterizează locii SSR, sunt convergente în diferențierea germoplasmei celor 2 colecții de plante, indicând un grad înalt de polimorfism (PIC, valoare medie 0,65±0,09) la cele din habitatul natural și moderat (0,52±0,19) la cele din colecție.

În concluzie, cei mai informativi markeri utilizați în genotipare, care pun în evidență

polimorfismul alelic la nivelul unui locus, pot fi considerați OR12, OR27, OR 40 și OR75.

Diversitatea alelelor unor regiuni de ADN microsatelit prezente în genomul speciei studiate, a fost analizată în baza următorilor indici (Tabelul 4.2, Figura 4.3): *numărul total (A) și mediu (N_A) de alele per subpopulație; numărul efectiv de alele (N_E); numărul de alele specifice (N_S); PLP – ponderea procentuală a locilor polimorfi; frecvența alelelor (Fa).*

Numărul total al alelelor identificat cu 11 markeri pentru fiecare subpopulație a variat de la 25 la 49, cu o valoare medie de 36,14 alele în cazul plantelor din habitatul natural și 31,67 în cazul celor de la GBNI. Cel mai mic număr de variante alelice (25) a fost constatat la subpopulațiile Or6, Or7 și Ch9, iar cel mai mare (49) la Or3. Comparativ, multe variante alelice se remarcă la Or4 (46) și la Or5 (44), iar la plantele din colecția GBNI – la subpopulația Ch10 (40). Respectiv și valoarea medie a indicelui N_A este mai mare la populația din flora spontană (3,29), față de cea din colecție (2,88).

Tabelul 4.2. Indici de diversitate alelică în baza primerilor EST-SSR

Populații	Subpop.	A	N_A	N_E	N_S	PLP (%)	Loci cu alele specifice
Rezervația cultural-naturală Orheiul Vechi	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	-
Valoarea medie		36,14±9,4	3,29±0,9	2,76±0,6		79,43±17,8	
GBNI, mun. Chișinău	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*
Valoarea medie		31,67±19,0	2,88±1,7	2,62±1,6		73,00±22,4	

Notă: * – loci pentru care s-au identificat 2 alele specifice unei subpopulații.

Interesant este faptul remarcat la analiza *numărului efectiv de alele*, care indică o valoare mai mică a numărului de alele prognozate per locus, $N_E - 2,76$ față de $N_A - 3,29$, în cazul populației din rezervația naturală și $N_E - 2,62$, valoare aproape egală cu $N_A - 2,88$ în cazul celei de la GBNI. Acest indice, calculat în baza frecvenței relative a alelelor, indică câte alele sunt cu adevărat semnificative în caracterizarea unui locus, într-o anumită populație.

Diferențele între valorile N_A și N_E , relevate în amprentele moleculare ale plantelor din rezervația naturală, indică pe de o parte, prezența numărului mai mare de loci polimorfi (Tabelul 4.1) și mai puține alele cu frecvențe relativ ridicate, iar pe de altă parte, a unui număr mai mare de alele rare.

Discriminarea subpopulațiilor din rezervația naturală după numărul mediu și efectiv de alele este mai evidentă comparativ cu cele din cultură și poate fi prezentată sub forma următoarelor clasamente de valori în sens ascendent: $N_A - Or6, Or7 < Or1 < Or2 < Or5 < Or4 < Or3$ și $N_E - Or7 < Or6, Or2 < Or1 < Or5 < Or3 < Or4$.

Pentru 6 loci SSR (OR10, OR13, OR40, OR44, OR75, OR81) au fost identificate *alele specifice* la 7 din cele 10 subpopulații studiate:

- flora spontană: OR13²⁰⁰ (Or5); OR44¹⁶³, OR75¹¹⁴ (Or1); OR10¹⁰², OR10¹⁵⁵, OR13¹⁷² (Or3); OR40¹³³, OR40¹⁸³, OR81¹⁵⁸ (Or4)
- colecția GBNI: OR81¹⁹⁷, OR81²¹⁰ (Ch10); OR40⁸⁶ (Ch8); OR81¹⁸⁷ (Ch9).

Conform *ponderii procentuale a locilor polimorfi*, o valoare $\geq 70\%$ se constată la 7 din 10 subpopulații. PLP de 100% a fost pus în evidență doar la Or3 și Or4 și puțin mai mic – 91%, la Or5. În același timp, cea mai mică valoare a acestui indice – 55% este relevată, de asemenea, la subpopulații din flora spontană – Or1 și Or7.

Valoarea medie a PLP, % la nivelul celor 2 populații diferă doar cu 6% (79,43% la plantele din rezervația naturală și 73% la cele din colecție), diferență statistic nesemnificativă ($p = 0,6$; $\alpha < 0,05$).

Conform *frecvenței cu care se întâlnesc alelele* la indivizii din cele 10 subpopulații luate în studiu (Figura 4.3, Anexa 3 și 5), s-au remarcat alele rare, abundente și frecvente [70]:

- 25 de alele cu frecvența $< 0,05$ (rare) sunt prezente în genotipul plantelor din rezervația naturală și 4 alele la cele din colecție;
- 5 alele cu frecvența $> 0,5$ (abundente) se întâlnesc la plantele din rezervația naturală și 6 alele la cele din colecția GBNI;
- celelalte alele (48 din populația naturală și 42 din colecție) au frecvențe cuprinse între 0,05 și 0,5 (frecvente).

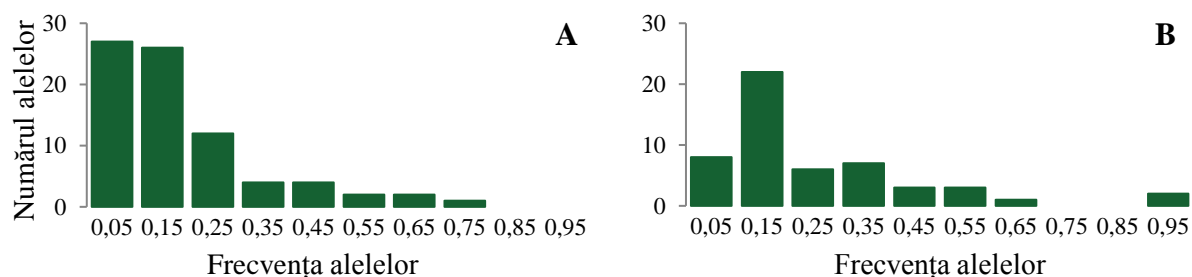


Fig. 4.3. Frecvența alelelor locilor EST-SSR în populația din flora spontană (A) și a celei din colecție (B)

Alelele specifice unei subpopulații au frecvențe cuprinse între 0,005 și 0,083, majoritatea din ele fiind alele rare.

Cele mai abundente alele pentru toate cele 10 subpopulații sunt OR10¹¹² și OR64⁸⁷ (frecvența de 0,82 și 0,61 respectiv).

Este important de menționat că subpopulațiile Or3 și Or4 au valori maxime ai indicilor de estimare a diversității alelice: PLP (100%), Ns (3 alele), N_A (4,46 și respectiv 4,18), N_E (3,64 și respectiv 3,77), A (49 și respectiv 46). Subpopulația Or5 are valori apropiate celor relevate pentru Or3 și Or4 (A= 44, N_A= 4, N_E=2,82, PLP=91%).

Cuantificarea diversității moleculare s-a realizat la nivelul unui locus sau al întregului sistem multi-locus prin investigarea următorilor parametri de estimare a diversității și diferențierii genetice dintre subpopulațiile/populațiile studiate: *heterozigoția așteptată* (He) și *observată* (Ho), *indicele de fixare* (F), *coeficienții de diferențiere molecular-genetică* (G_{ST} și F_{RT}), precum și *analiza varianței moleculare* (AMOVA).

Structura și diferențierea genetică în calitate de componente principale ale analizei genetice populaționale are la bază unul dintre cele mai cunoscute principii, echilibrul *Hardy-Weinberg* (EHW), conform căruia frecvențele alelelor și genotipurilor rămân constante de la o generație la alta în absența unor factori destabilizatori [217]. Deși în mod natural populațiile tind să-și mențină structura genetică într-un anumit echilibru optim, în realitate acest lucru este practic imposibil (cel puțin pentru unele gene din genomul lor). Astfel, media indicelui de fixare F [124, 147], care reprezintă proporția abaterii unei populații de la EHW, prin măsurarea heterozigoției observate la un locus genic față de heterozigoția așteptată, are valori apropiate de „0”, cu mici devieri, în cazul ambelor populații studiate, fapt care denotă că încrucișările s-au realizat în mod aleatoriu (Tabelul 4.3). Valorile negative ale indicelui F indică un mic exces de heterozigoție la populația naturală (-0,01±0,20) și comparativ, puțin mai mare la cea de la GBNI (-0,15±0,21). Aceste rezultate sunt concludente cu valorile medii ale heterozigoției observate și ale heterozigoției așteptate între care nu există diferență statistic semnificativă (p>0,05, p= 0,74, t_{95%}) la populația din flora spontană și nici la populația din colecție (p>0,05, p= 0,37, t_{95%}).

La nivel intrapopulațional media heterozigoției pentru cei 11 loci analizați, relevă cea mai mare pondere a heterozigoților la subpopulația Or4 (Ho = 0,745±0,18 și He = 0,723±0,04), iar cea mai scăzută la subpopulațiile: Or7 (He = 0,36±0,24; Ho = 0,42±0,30), Or2 (He = 0,38±0,21; Ho = 0,34±0,28 și Or1 (He = 0,38±0,25; Ho = 0,42±0,30) (Tabelul 4.3). Acest clasament se suprapune cu cel identificat la parametrul N_E, ceea ce subliniază o legătură strânsă între numărul efectiv de alele la o subpopulație și numărul de genotipuri heterozigote care rezultă din combinarea lor (Or7< Or1, Or2<Or6< Or5< Or3< Or4).

Spre deosebire de 2 subpopulații din flora spontană, Or2 (F = 0,25±0,31) și Or5 (F = 0,20±0,31), la care s-au constatat devieri de la EHW printr-un deficit de heterozigoție, la celelalte,

inclusiv de la GBNI (Ch8 și Ch9) abaterile sunt relativ mici, determinate de un exces de heterozigoție.

Subpopulația Or6 s-a remarcat prin cele mai mari devieri ($F = -0,42 \pm 0,26$) (Tabelul 4.3). În cazul populației din colecție se evidențiază subpopulația Ch10 cu valoarea negativă a indicelui $F = -0,25$ fiind constatat de asemenea un exces de heterozigoție. Astfel doar în cazul a 2 subpopulații (Or2 și Or5), ambele din habitatul natural sunt prezente alelele de *inbreeding* (homozigote).

Tabelul 4.3. Valorile parametrilor diversității moleculare în baza locilor microsateliți la nivel de subpopulație/populație

Populații	Subpopulații	He	Ho	F
Rezervația cultural-naturală Orheiul Vechi	Or1	0,38±0,25	0,42±0,30	-0,06±0,16
	Or2	0,38±0,21	0,34±0,28	0,25±0,31
	Or3	0,71±0,05	0,66±0,14	0,06±0,20
	Or4	0,72±0,04	0,75±0,18	-0,02±0,24
	Or5	0,55±0,17	0,48±0,26	0,20±0,31
	Or6	0,45±0,20	0,68±0,30	-0,42±0,26
	Or7	0,36±0,24	0,42±0,30	-0,11±0,25
Valoarea medie		0,51±0,15	0,54±0,15	-0,01±0,20
GBNI, mun. Chișinău	Ch8	0,38±0,23	0,45±0,30	-0,09±0,17
	Ch9	0,44±0,20	0,52±0,25	-0,13±0,16
	Ch10	0,57±0,20	0,73±0,26	-0,25±0,21
Valoarea medie		0,46±0,24	0,57±0,35	-0,15±0,21

Notă: He – heterozigoția așteptată; Ho – heterozigoția observată; F – indicele de fixare, testul *Student* de semnificație ($t_{95\%}$), aplicat la valorile medii.

Datele obținute în rezultatul investigării parametrilor diversității genetice sunt confirmate și completate de cele ale analizei ierarhice a varianței moleculare (AMOVA), care au evidențiat un grad mai mare de variație la nivel de indivizi față de cel relevat la nivel intra- și interpopulațional (Figura 4.4). O particularitate deosebită, este determinată de valorile mai mari ale varianței moleculare între plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din colecția GBNI (74%) comparativ cu cele ale plantelor din rezervația naturală (58%).

Contrar acestor date, varianța la nivel intrapopulațional este mai mare la subpopulațiile din flora spontană – 42%, comparativ cu cele din cultură – 26%. Analiza varianței moleculare la toate 10 subpopulații pune în evidență o diferențiere genetică semnificativă de 38% ($p < 0,001$).

La nivel interpopulațional variația genetică reprezintă 7% ($p < 0,001$) din variația moleculară totală (Figura 4.4).

Diferențierea genetică este cauzată de acumularea variațiilor în frecvențele alelelor dintre indivizii unei populații complet sau parțial izolate datorită forțelor evolutive, în special al selecției

și driftului genetic.

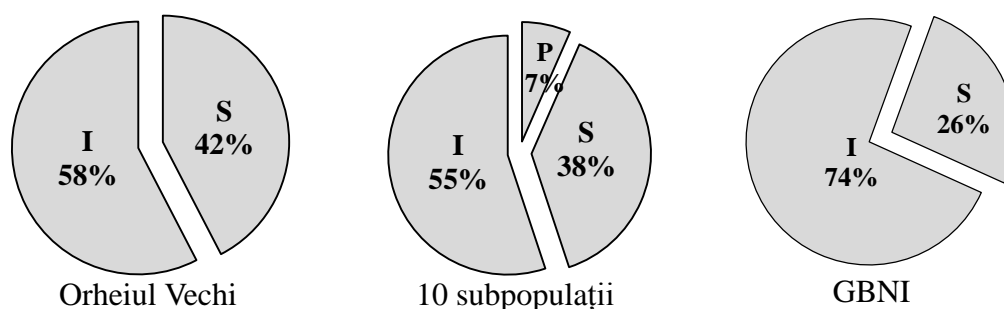


Fig. 4.4. Analiza varianței moleculare (AMOVA) a subpopulațiilor speciei *O. vulgare*

Notă: I – variația moleculară dintre indivizi; S – variația moleculară între subpopulații; P – variația moleculară dintre populații; ($p < 0,001$, 999 de permutări) prin programul GenAlEx 6.5 [209].

În continuare se vor prezenta valorile detaliate pentru fiecare locus ale parametrilor de diferențiere genetică: H_T – heterozigoția totală (diversitatea genetică) într-o populație; F_{SR} – diferențierea genetică între subpopulațiile din cadrul unei populații; F_{RT} – diferențierea genetică între populații; G_{ST} – coeficientul de diferențiere genetică între toate 10 subpopulații din flora spontană și colecția GBNI.

În genetica statistică, valoarea coeficientului G_{ST} , în calitate de măsură a diferențierii între subpopulații la nivelul unui locus sau pentru mai mulți loci simultan se calculează prin două modalități diferite, una folosită de Hamrick J. și Godt M. (1989) și alta propusă de Nei M. (1973) [123, 197], care dau rezultate diferite în anumite cazuri. Pentru claritate, acestea sunt notate metode HG și Nei. Conform modelului descris de Nei M., în baza frecvenței alelelor se calculează indicii statisticii genetice (H_T , H_s , G_{ST}) pentru fiecare locus, se află valoarea medie a indicilor pentru un grup de loci, monomorfi și polimorfi, ulterior fiind utilizată în obținerea valorii G_{ST} . În metoda HG valoarea coeficientului G_{ST} este calculată inițial pentru fiecare locus separat, și apoi media per grupul de loci polimorfi.

Întrucât, în cercetarea de față, toți locii EST-SSR sunt polimorfi a fost analizat coeficientul G_{ST} după Hamrick și Godt (1989). Astfel, conform valorilor H_T , heterozigoția totală în populația din flora spontană este mai mare de 70% (0,7-0,84) în cazul a 5 loci (OR75, OR12, OR27, OR40, OR09). Valoare medie pentru toți 11 loci este 0,69 (69 % genotipuri heterozigote). La nivelul populației din cultură, heterozigoția totală/11 loci are o valoare mai mică – 0,57 (57%). Analiza per locus a evidențiat și în acest caz, aceiași loci OR75, OR27, OR40 și OR75 cu valori mai mari (0,7-0,84) ai H_T . Locii OR10 și OR64 discriminează populațiile între ele prin valoarea heterozigoției totale de 0,43 și respectiv 0,64 la plantele din flora spontană și homozigoție absolută la cele din colecția GBNI.

Diferențierea genetică între subpopulațiile din cadrul unei populații prezintă următoarea succesiune a locilor după valorile F_{SR} :

- pentru plantele din habitatul natural – OR40 < OR12 < OR10 < OR75 < OR13, OR44 < OR27 < OR14 < OR81 < OR09 < OR64;
- pentru plantele din colecție – OR44 < OR14 < OR40 < OR12 < OR75 < OR13 < OR09 < OR81 < OR27.

Tabelul 4.4. Estimarea unor indici de diversitate inter- și intrapopulațională

Loci SSR	H_T		F_{SR}		F_{RT}	G_{ST}
	<i>Orhei</i>	<i>Chișinău</i>	<i>Orhei</i>	<i>Chișinău</i>		
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 genetică între subpopulațiile unei populații; F_{RT} – indicele de diferențiere între populații; G_{ST} – indicele de diferențiere genetică relativă între toate subpopulațiile.

Astfel, locii OR14, OR81, OR09 și OR64 sunt cei care diferențiază subpopulațiile din flora spontană cel mai bine, cu valori F_{SR} incluse în intervalul 0,3-0,45. Locii OR09 și OR81 sunt cei care diferențiază și subpopulațiile GBNI, doar cu mult mai slab ($F_{SR} = 0,25$ și respectiv $F_{SR} = 0,28$). Spre deosebire de locii OR10 și OR64, după care sunt monomorfe doar subpopulațiile GBNI, locii OR40 și OR12 diferențiază foarte slab subpopulațiile din cadrul ambelor populații studiate. Sistemul multi-locus studiat diferențiază bine subpopulațiile din flora spontană între ele ($F_{SR} = 0,27 \pm 0,07$) și mai slab cele din colecția GBNI ($F_{SR} = 0,15 \pm 0,09$).

Indicele F_{RT} indică o valoare medie/11 loci mult mai mică ($0,07 \pm 0,04$) de diferențiere molecular-genetică (moderată) între cele două populații. La nivelul unui locus se evidențiază markerii OR81 (0,10), OR14 (0,14), OR09 (0,12) și OR64 (0,18). După locii OR27 ($F_{RT} = 0,008$) și OR40 ($F_{RT} = 0,003$) populațiile aproape că nu se diferențiază între ele, fapt confirmat și de valorile heterozigoției totale pentru populațiile colectate din cele două areale (OR27- $H_T = 0,807$ și $H_T = 0,811$; OR40- $H_T = 0,806$ și $H_T = 0,840$; OR75).

Coefficientul de diferențiere moleculară între toate cele 10 subpopulații din flora spontană și colecția GBNI are o valoare medie de $0,30 \pm 0,08$ (G_{ST}), sau transformat în procente, indică o

diferențiere foarte mare, de 30% între subpopulații, după frecvența alelelor.

La nivelul unui locus acest coeficient poate varia cu o intensitate de la 0 până la 1. Cu cât valoarea acestuia este mai apropiată de 1, cu atât subpopulațiile respective sunt mai diferențiate molecular-genetic [106], astfel:

- de la 0,05 la 0,15, diferențiere molecular-genetică moderată – OR40;
- de la 0,15 până la 0,25, diferențiere molecular-genetică mare – OR12 și OR44;
- de la 0,25 la 1, diferențiere genetică foarte mare – OR75, OR10, OR13, OR14, OR27, OR81 OR09, OR64.

Comarate între ele, valoarea medie a F_{RT} ($0,07 \pm 0,04$), este semnificativ mai mică ($p < 0,05$, $p = 7,53E-05$) decât cea a G_{ST} ($0,30 \pm 0,08$). Acest fapt se observă și în cazul analizei varianței moleculare care indică o variabilitate intrapopulațională mare și interpopulațională moderată (Figura 4.4).

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

Volume mari de date (variabile multiple inter-corelate) au fost obținute în rezultatul genotipării cu EST-SSR (16400 de date binare), care analizate prin prisma parametrilor de analiză populațională și statistică comparativă au pus în evidență *polimorfismul locilor, diversitatea alelică, gradul diferențierii molecular-genetice*. Însă, pentru o mai bună acuratețe și relevanță în stabilirea relațiilor genetice dintre cele 10 subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* studiate, este necesară eliminarea redundanței informaționale, asociată datelor biologice multivariate.

Astfel, în scopul obținerii unei imagini de ansamblu a variabilității a 11 regiuni microstelite din genomul plantelor autohtone de *O. vulgare* ssp. *vulgare* la nivel intra- și interpopulațional s-a recurs la metodele de analiză multivariată: *clusterizarea și analiza componentelor principale*, fiind urmărite:

- *evidențierea profilului asocierilor dintre alele și vizualizarea grafică a subpopulațiilor în funcție de asemănările moleculare;*
- *identificarea locilor EST-SSR și a variantelor alelice cu pondere procentuală mare în diferențierea subpopulațiilor speciei *O. vulgare* indigene;*
- *structura moleculară a două populații de *O. vulgare* în baza frecvenței alelelor.*

Componentele principale și procentul de varianță explicată. Urmând etapele ACP pe baza matricei de covarianță a frecvenței alelelor, a fost generat tabelul și graficul valorilor proprii cu 9 CP (componente principale)/Factori (variabile noi), un număr mult mai mic decât cel al variabilelor inițiale (82 loci), prin care se explică 100% din varianța totală (Figura 4.5).

Astfel, conform datelor reprezentate în diagrama valorilor proprii (Figura 4.5, A) și a valorilor CP post-rotatie (*varimax*) generate de program, pot fi selectate pentru calculele ulterioare primele 5 CP care cumulat explică 86% din varianța totală a norului de puncte format din variabile (alele) sau observații (subpopulații).

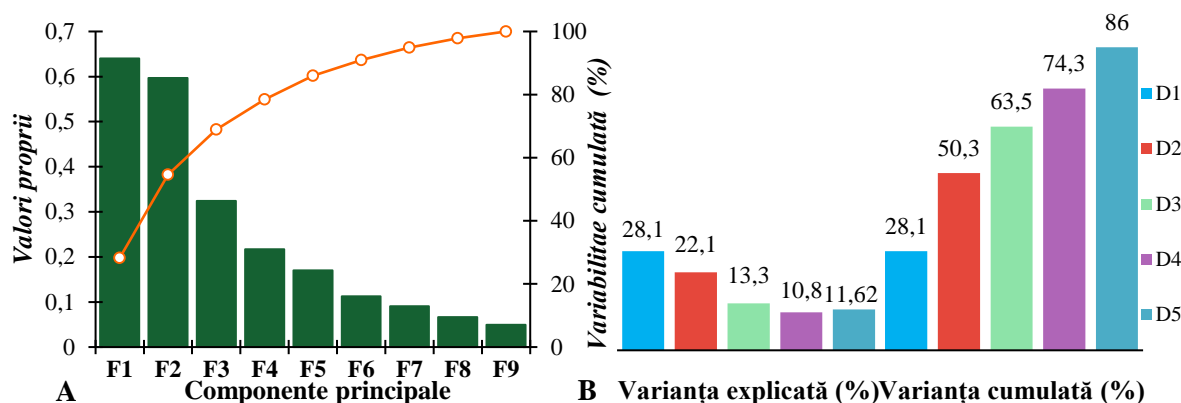


Fig. 4.5. Valorile proprii și procentul din varianța totală explicată de CP

Notă: **A** – Valorile proprii (*eigenvalues*) a factorilor; **B** – Procentul din varianța totală explicată de CP și valorile cumulate (post-rotatie, *varimax*).

Primele două, trei CP explică 50,3 și respectiv 63,5% din variabilitatea datelor inițiale, astfel acestea pot fi regăsite cu suficientă acuratețe în spațiul bi- și tridimensional. În același timp, este necesar de ținut cont, în interpretarea structurilor spațiale (hărților) de restul informației (36%) care ar putea fi regăsită în următorii factori.

Profilul de asociere a variabilelor și corelare cu CP. În rezultatul vizualizării proiecțiilor variabilelor cu valori ale \cos^2 mai mari de 0,5 (în număr de 22) în spațiul factorilor (axele D1 și D2) au fost puse în evidență grupuri de alele corelate și cele care definesc primele 2 componente (Figura 4.6). Astfel, în cele două reprezentări grafice 4.6. A (22 alele) și 4.6. B (35 alele) se conturează corelații ale locilor SSR care se asociază în două grupuri în apropierea de CP1.

Primul grup este format în cadranul IV din 4 forme genice ale locilor studiați: OR64⁸⁷ (0,95), OR75⁹⁸ (0,66), OR09¹⁴⁰ (0,61), OR44¹⁷⁰ (0,72) cu valori ale corelațiilor pozitive. Al doilea grup include 7 variabile, cu valori negative ale corelațiilor de intensitate medie și puternică OR27¹⁰⁶ (-0,69), OR27¹³⁹ (-0,64), OR10¹³⁰ (-0,69), OR75¹⁰⁰ (-0,85), OR81¹⁴⁵ (-0,70) OR09¹⁵⁰ (-0,81), OR64⁸⁴ (-0,95) localizat în cadranul III. Al treilea grup din 5 variabile corelate pozitiv se află în cadranul II, în apropierea CP2 și este format din OR12¹⁴⁰ (0,70), OR12¹⁵⁰ (0,70), OR09¹⁶⁵ (0,73), OR75¹⁰³ (0,75) și OR14⁸⁷ (0,82). Astfel, putem conchide că alelele menționate se întâlnesc în profilul SSR al plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* având frecvențe similare.

O categorie separată însumează variabile ce reprezintă alele alternante la același locus SSR. Acestea fiind proiectate în cadrane opuse ale cercului de corelații, indică corelații semnificative

negative: OR44¹⁴⁸(-0,65)/OR44¹⁷⁰(0,72); OR64⁸⁴(-0,95)/ OR64⁸⁷(0,95); OR10¹¹²(0,70)/ OR10¹³⁰(-0,69); OR09¹⁴⁰(0,61)/ OR09¹⁵⁰(-0,81); OR75⁹⁸(0,66)/ OR75¹⁰⁰(-0,85); OR14⁸⁷(0,82)/ OR14⁹¹(-0,83) și OR14¹⁰⁰(-0,61).

Pentru confirmarea gradului de corelare dintre variabile, în special al celor care se află mai aproape de centrul de origine ale cercului de corelare, a fost analizată de asemenea și matricea de corelație *Pearson* (Anexa 6).

În conformitate cu valorile \cos^2 cele 35 de variabile care au o bună reprezentare pe primele 5 CP (Figura 4.6, A, B) formează combinații liniare dintre alelele locilor:

- OR64, OR10, OR27, OR09, OR44, OR40, OR75, OR81 pentru CP1 (13 alele);
- OR12, OR14, OR09, OR40, OR75, OR81 pentru CP2 (9 alele);
- OR27, OR09 pentru CP3 (3 alele);
- OR12, OR14, OR13 pentru CP4 (6 alele);
- OR14, OR13, OR40, OR81 pentru CP5 (4 alele).

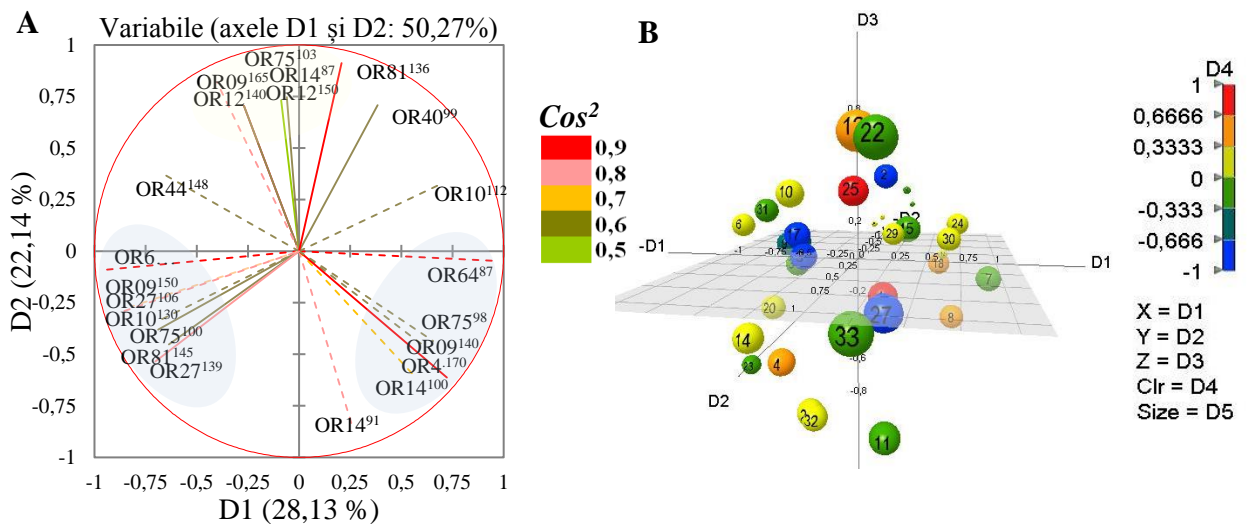


Fig. 4.6. Corelații între variabile și componentele principale

Notă: A – Coeficienții de corelație dintre variabile și CP1 și CP2 (notate cu D după rotație) pe cercul de corelații, liniile întrerupte indică corelații negative; B – Vizualizare 3D pe primele trei axe generate de XLSTAT-3DPlot. Prin culori se diferențiază valorile variabilelor care încarcă CP4 și prin dimensiune valorile celor care încarcă CP5.

Legenda variabilelor: 1 – OR12¹¹⁵, 2 – OR12¹¹⁷, 3 – OR12¹²⁸, 4 – OR12¹⁴⁰, 5 – OR12¹⁵⁰, 6 – OR64⁸⁴, 7 – OR64⁸⁷, 8 – OR10¹¹², 9 – OR10¹³⁰, 10 – OR27¹⁰⁶, 11 – OR27¹¹⁰, 12 – OR27¹¹⁴, 13 – OR27¹³⁹, 14 – OR14⁸⁷, 15 – OR14⁹¹, 16 – OR14⁹⁵, 17 – OR14⁹⁸, 18 – OR14¹⁰⁰, 19 – OR09¹⁴⁰, 20 – OR09¹⁵⁰, 21 – OR09¹⁶⁵, 22 – OR09¹⁷⁰, 23 – OR44¹⁴⁸, 24 – OR44¹⁷⁰, 25 – OR13¹³⁰, 26 – OR13¹⁴⁰, 27 – OR13¹⁴⁸, 28 – OR40⁸⁶, 29 – OR40⁹⁹, 30 – OR75⁹⁸, 31 – OR75¹⁰⁰, 32 – OR75¹⁰³, 33 – OR81¹³⁶, 34 – OR81¹⁴⁵, 35 – OR81¹⁵⁵.

Opt primeri (OR09, OR27, OR40, OR75, OR81, OR12 OR14, OR13) identifică alelele a căror variație în frecvență este explicată de diferite componente principale (Tabelul 4.5).

Prezintă interes locii amplificați cu 3 primeri – OR64, OR10, OR44, aceștia se întâlnesc

doar în combinația care definesc CP1 – componentă considerată cu cea mai mare pondere informațională (varianță).

Tabelul 4.5. Combinațiile de variabile corelate cu primele componente principale (CP)

CP	Variabile (alele ale markerilor SSR)	Loci SSR ale căror alele reprezintă variabile corelate cu diferite CP	Loci SSR caracteristici doar unui CP	Nr. variabile
CP1	OR64 ⁸⁴ , OR64 ⁸⁷ , OR10 ¹¹² , OR10 ¹³⁰ , OR27 ¹⁰⁶ , OR27 ¹³⁹ , OR09 ¹⁵⁰ , OR09 ¹⁴⁰ , OR44 ¹⁷⁰ , OR44 ¹⁴⁸ , OR75 ⁹⁸ , OR75 ¹⁰⁰ , OR81 ¹⁴⁵	OR09, OR27, OR40, OR75, OR81	OR10 OR44 OR64	13
CP2	OR12 ¹⁴⁰ , OR12 ¹⁵⁰ , OR14 ⁸⁷ , OR14 ⁹¹ , OR09 ¹⁶⁵ , OR40 ⁹⁹ , OR75 ¹⁰³ , OR81 ¹³⁶	OR09, OR12, OR14, OR40, OR75, OR81		9
CP3	OR27 ¹¹⁰ , OR27 ¹¹⁴ , OR09 ¹⁷⁰	OR27, OR09		3
CP4	OR12 ¹¹⁵ , OR12 ¹¹⁷ , OR12 ¹²⁸ , OR13 ¹³⁰ , OR13 ¹⁴⁸ , OR14 ⁹⁸	OR12, OR13, OR14		6
CP5	OR14 ⁹⁵ , OR13 ¹⁴⁰ , OR40 ⁸⁶ , OR81 ¹⁵⁵	OR13, OR14, OR40, OR81		4

Cert este faptul că 24 de alele obținute cu 10 primeri din cei 11 analizați, în calitate de variabile raportate la modelul tridimensional determină 64% din variația factorului latent.

Primerul OR13 se regăsește în celelalte 22%, restul – până la 86% din informație inițială. Această concluzie este în favoarea argumentului că locii identificați prin genotipare cu 11 primeri EST-SSR sunt multialelici, polimorfi cu contribuție diferită la variabilitatea moleculară (varianța) atât în interiorul aceleiași populații, cât și între cele 2 populații (Orhei și Chișinău).

Contribuțiile variabilelor (frecvența alelelor) reprezintă măsura (în procente) în care fiecare din ele contribuie la construirea axei PCA corespunzătoare. Valoare medie a contribuției așteptate (*valoarea prag*) a unei variabile, calculată reieșind din numărul total de variabile (82 de alele în exemplul de calcul dat) este de 1,22%. Astfel, conform tabelului de date, generat de ACP, numărul alelelor care contribuie cu o valoare mai mare decât valoarea medie per total scade începând cu CP2. De exemplu, din reprezentarea grafică a contribuției variabilelor pe CP (Figura 4.7) numărul acestora este: 15 (CP1), 13 (CP2), 8 (CP3), 12 (CP4) și 7 (CP5).

Analiza variabilelor care reprezintă bine o axă factorială (cu $\cos^2 > 0,5$) și în același timp au o contribuție mai mare de 1,2% pe fiecare componentă sunt însumate (Anexa 6) și reprezentate în Figura 4.7.

Conform modelului oferit de ACP sunt 5 CP (variabile noi) necorelate între ele și care reprezintă combinații liniare a unui număr diferit de variabile, în total 29 pe 5 componente.

Genotiparea plantelor de *O. vulgare* cu opt primeri SSR (OR09, OR75, OR27, OR14, OR81, OR64, OR44, OR10) explică 64% din variabilitatea genetică a subpopulațiilor din cele

două areale de colectare. Șase alele au cea mai mare pondere în diferențierea genetică OR64⁸⁷ (23%), OR64⁸⁴ (17%), OR81¹³⁶ (26%), OR14⁸⁷ (19%), OR27¹¹⁰ (36%), OR09¹⁷⁰ (13%).

Suplimentar la aceste 64% din datele inițiale, primerii OR12 și OR13, cumulat cu OR14 și OR81 explică 22% din varianță, iar alte cinci alele au cea mai mare contribuție pe CP4-5: OR13¹⁴⁸ (23%), OR12¹¹⁵ (13%), OR12¹¹⁷ (10%), OR81¹⁵⁵ (23%), OR13¹⁴⁰ (14%).

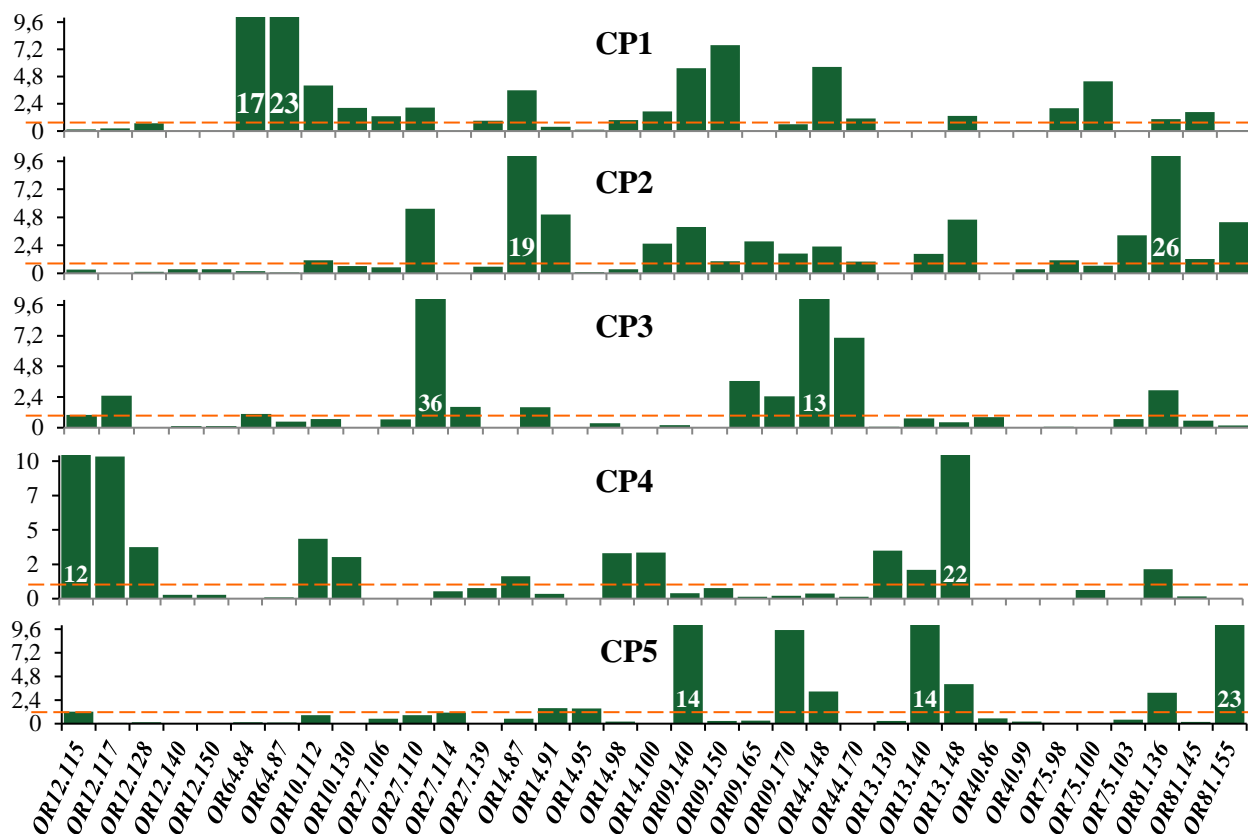


Fig. 4.7. Contribuția (%) variabilelor pe componentele principale

Structura populațiilor de *O. vulgare* conform frecvențelor alelelor SSR. Analiza comparativă a modelului ACP bidimensional pre- și post-rotatie pe primele 2 CP, relevă modificări neesențiale după optimizare, dar care pun în evidență o diferențiere mai bună în structura moleculară între cele 10 subpopulații din rezervația naturală și colecție (Figura 4.8, A-D).

Subpopulațiile Or6 și Or7 sunt separate față de celelalte subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* care se grupează în funcție de biotopul colectării plantelor. Populația de plante din flora spontană prezintă o diversitate molecular-genetică mai mare comparativ cu cea de la GBNI, formând 2 grupe cu caracteristici de asemănare: grupul I format din Or2 și Or1, grupul II care include Or3, Or4 și Or5.

Subpopulațiile din colecție formează al treilea grup de plante. Proiecția CP3, suplimentar la CP1 și CP2, pe unul și același sistem de coordonate a observațiilor, inclusiv diferențierea valorii

încărcărilor CP4 prin culoare și a CP5 prin dimensiune aduce un plus de informație (22%) prin care se accentuează variabilitatea subpopulațiilor Or6 și Or7 (Figura 4.8, D).

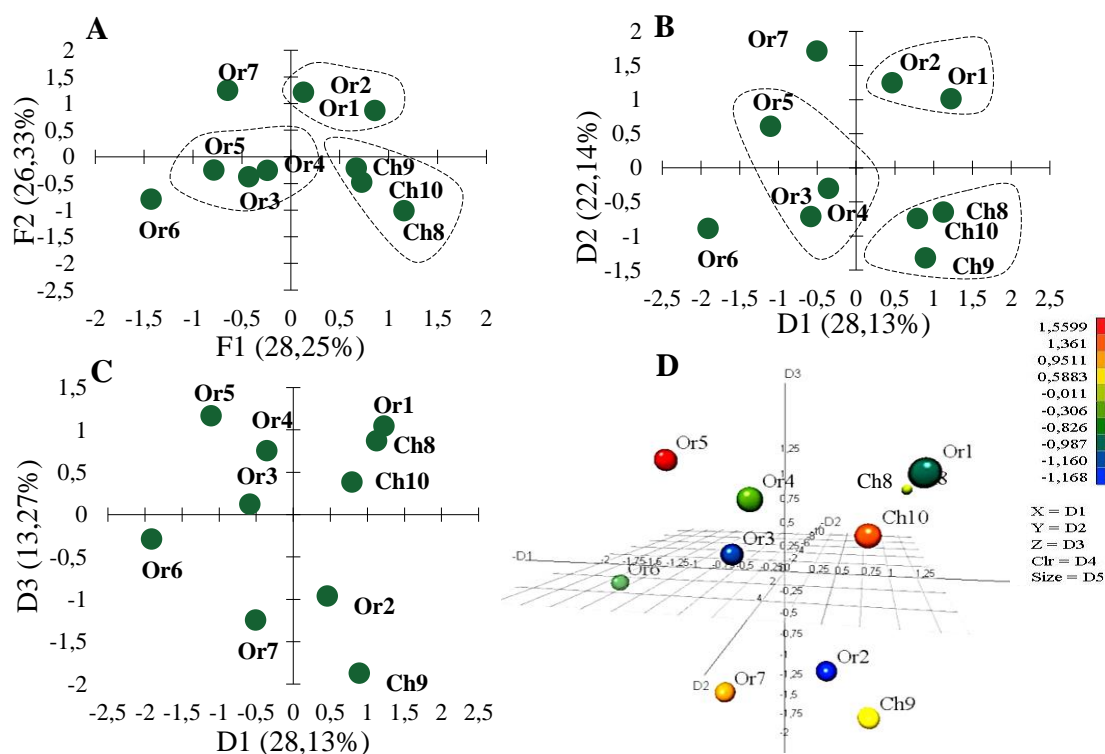


Fig. 4.8. Coordonatele observațiilor (scorurile factoriale) în ACP pre- și post-rotatie

Notă: A – Observații, axele F1 și F2 înainte de rotație; B – Observații, axele D1 și D2 post-rotatie; C – Observații, axele D1 și D3 post-rotatie; D – Vizualizare 3D pe primele trei axe generate de XLSTAT-3DPlot. Prin culori se diferențiază valorile variabilelor care saturează CP4 și prin dimensiune valorile celor care încarcă CP5.

De asemenea, se constată un nivel de diferențiere moleculară între Ch9 de celelalte 2 subpopulații Ch10 și Ch8 și similaritate cu Or2. Celelalte 2 subpopulații Ch8 și Ch10 se grupează cu Or1. Pentru confirmarea grupării observațiilor pe componenta CP3 și a ponderii CP4-5 în regruparea subpopulațiilor s-a analizat separat graficul bidimensional pe CP1 și CP3, care a indicat același model de diferențiere moleculară a subpopulațiilor pentru 64% din datele inițiale (Figura 4.8, C). Este important de menționat că plantele colectate din colecția GBNI și cele din rezervație – Or1 și Or2 își au arealul pe altitudini mai înalte comparativ cu celelalte 4 subpopulații Or3-Or6.

Reprezentarea grafică a modelului de variație a observațiilor și variabilelor afișată de ACP constituie o modalitate de a identifica corespondența dintre ele. Astfel se identifică alele care diferențiază cel mai bine subpopulațiile (Figura 4.9). În baza informațiilor extrase din reprezentările grafice, a celor care indică calitatea prezentării și contribuția variabilelor la construcția CP a fost pus în evidență grupul de alele (cu frecvența acestora indicată în paranteze), care diferențiază cel mai bine:

- Or1, Or2: OR81¹³⁶ (0,95), OR10¹¹² (0,95), OR13¹⁴⁸ (1,0);
- Ch8, Ch9, Ch10: OR64⁸⁷ (1,0), OR75⁹⁸ (0,32), OR09¹⁴⁰ (0,63), OR14¹⁰⁰ (0,40), OR14⁹¹ (0,42);

- Or3, Or4, Or5, Or6: OR64⁸⁴ (0,62), OR09¹⁵⁰ (0,55), OR75¹⁰⁰ (0,36), OR10¹³⁰ (0,34), OR27¹⁰⁶ (0,27), OR81¹⁴⁵ (0,28);
- Or7: OR44¹⁴⁸ (1,0), OR14⁸⁷ (1,0), OR75¹⁰³ (0,50), OR09¹⁶⁵ (0,50), Or27¹¹⁰ (1,0).

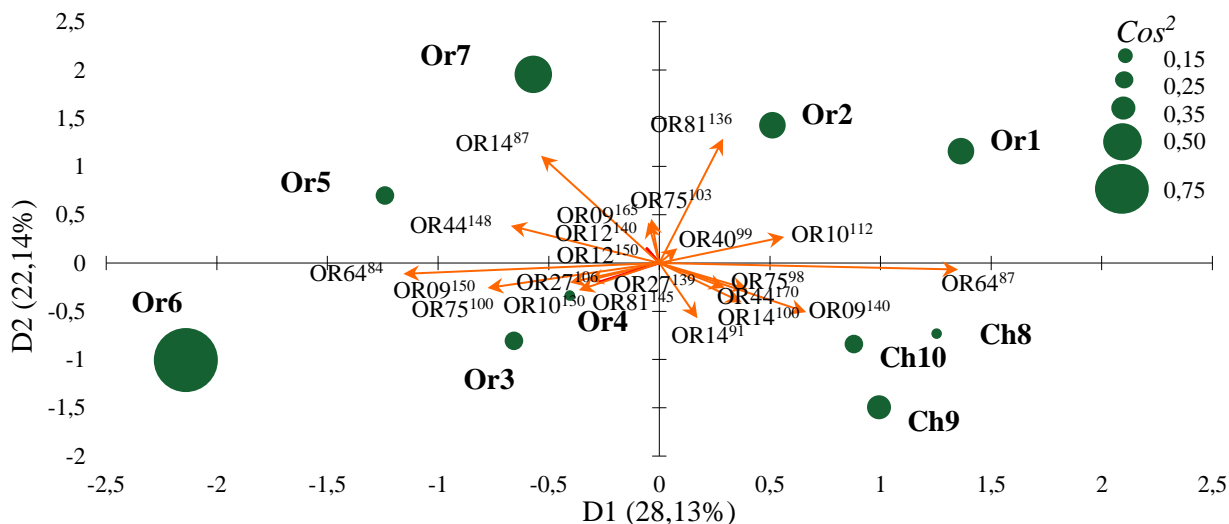


Fig. 4.9. Vizualizarea proiectiei variabilelor (frecvența alelelor) și a subpopulațiilor (axele D1 și D2: 50,27%)

Aceste alele reprezintă polimorfisme pentru subpopulațiile studiate și au o frecvență care depășește 0,25 sau 25%.

Clusterizarea datelor este o altă metodă de analiză care permite clasificarea informației multivariate în anumite grupuri [148] după anumite caracteristici, inclusiv relațiile molecular-genetice. În studiul de față clusterizarea aplicată pe matricea frecvenței alelelor locilor EST-SSR prin utilizarea diferitor criterii, coeficienți de similitudine (*Jaccard*, *Pearson*, *Dice*) și de distanță genetică (*Manhattan* și *Squared Euclidean*) a generat rezultate mai mult sau mai puțin similare privind grupurile de subpopulații asociate. Întrucât, valoarea *coeficientului Cofenetic*, care este un criteriu pentru evaluarea eficienței diferitor tehnici de grupare [100, 227] a avut valoarea maximă – 0,64, în cazul selectării UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). În Figura 4.10 este analizată doar dendrograma obținută prin evaluarea coeficientului de disimilaritate a distanței *Euclidiene*. Din reprezentarea grafică se observă trei clusterse cu diferit grad de similaritate: clusterul I cuprinde subpopulațiile colectate din flora spontană, Or1, Or2, și Or4 și Or7 asociate independent, clusterul II include subpopulațiile Or3, Or5, Or6 și al treilea cluster este format din cele trei subpopulații din colecția GBNI (mun. Chișinău) Ch8, Ch9 și Ch10. Prin distanța genetică minimă se caracterizează subpopulațiile Or1 și Or2, iar maximă – subpopulația GBNI, Ch10. Modelele teoretice oferite de ambele metode, ACP și analiza clusteriană, în baza datelor experimentale (frecvența alelelor a 11 loci EST-SSR, Anexa 3) sunt similare, cu mici particularități ne semnificative. Polimorfismul mai

înalt constatat la subpopulațiile din habitatul natural comparativ cu cel al subpopulațiilor introduse în cultură, din colecția GBNI corelează cu rezultatele unor studii analoge. Astfel, prin metodele AFLP, SAMPL și RAPD a fost evidențiat un polimorfism semnificativ la 19 genotipuri de *O. vulgare* ssp. *vulgare* [43], 14 populații de *O. syriacum* din flora spontană și șase forme de *O. syriacum* și *O. majorana* din cultură [30].

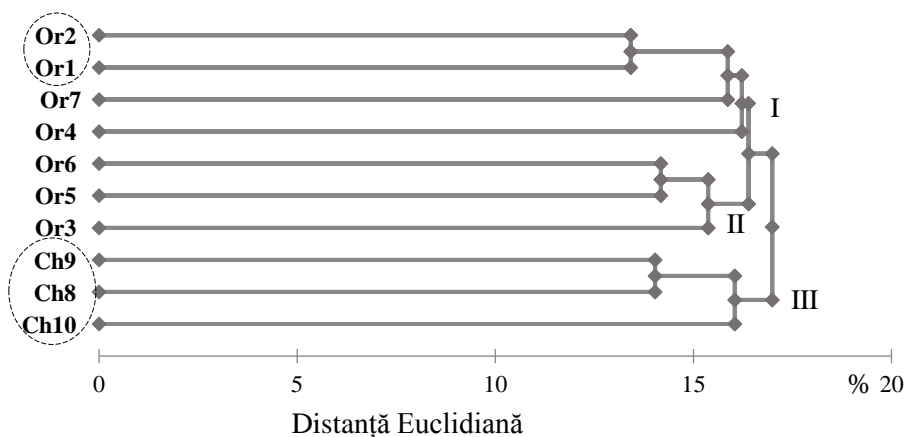


Fig. 4.10. Repartizarea clusteriană a subpopulațiilor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* în baza locilor microsateliți (Hierarchical agglomerative clustering/UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean))

Unii autori explică variabilitatea moleculară redusă a genotipurilor introduse în cultură prin activitatea de selecție axată, în special, pe identificarea și dezvoltarea formelor cu indici productivi sporți, în defavoarea variabilității moleculare valoroase [30, 259]. Cu toate acestea, diminuarea diversității molecular-genetice în populațiile cultivate este foarte lentă, gradul de polimorfism rămânând a fi înalt chiar și după o perioadă semnificativă de timp. În diversitatea speciilor medicinale introduse în cultură o pondere esențială o au condițiile variabile ale unui nou mediu care contribuie nu doar la conservarea variabilității, dar și la variația genică necesară în adaptarea la noul habitat. Se cunoaște că structura molecular-genetică a populației este determinată de influența unui șir de factori, așa ca selecția naturală și artificială, recombinări și schimburi de gene, interacțiunile dintre gene, mutațiile și migrația. Unul dintre factorii majori ce influențează variabilitatea moleculară este tipul de reproducere [123]. În acest context diversitatea semnificativă a subpopulațiilor de *O. vulgare* poate fi explicată prin faptul că aceasta este o plantă alogamă, caracterizată prin polenizarea încrucișată [149].

4.4. Concluzii la capitolul 4

Investigarea diversității intra- și interpopulaționale la plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană și colecția de PMA a GBNI, în baza amprentelor moleculare RAPD și EST-SSR, prin analiza structurii alelice a locilor, indicilor de diversitate și diferențiere moleculară, metode de statistică moleculară, analiză factorială și clusterizare a pus în evidență următoarele concluzii:

1. Din 27 de primeri RAPD testați, 5 pot fi utili în estimarea eterogenității moleculare a germoplasmei de *O. vulgare* autohtone. Doi oligomeri (UBC₂₁₅ și OPJ₀₁) se caracterizează prin cea mai mare pondere procentuală a benzilor polimorfe (PBP, 89-91%), iar trei (OLIGO_{A2}, OPB₁₀ și OPH₁₅) – prin amplificarea a 4-6 fragmente de ADN specifice. *Screening*-ul cu primeri arbitrari a relevat în cazul plantelor din colecția GBNI un grad mai mic de variabilitate moleculară (36,4% fragmente polimorfe), comparativ cu cel constatat la plantele din flora spontană (45,0%) [17, 172, 194];

2. Genotiparea plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* cu 11 markeri microsatelici, din regiunile de codificare ale ADN-lui cu activitate de transcripție în celulele secretoare a perilor glandulari cu funcție de producere și depozitare a mono- și sesquiterpenelor, a pus în evidență rezultate convergente privind numărul de profile moleculare, de alele/profil și conținutul informației polimorfe în diferențierea moleculară a populațiilor, indicând un grad înalt de polimorfism (PIC: 0,65) la cele din habitatul natural și moderat (PIC: 0,52) – la cele din colecție;

3. După *frecvența cu care se întâlnesc alelele* în genotipul plantelor, s-au remarcat 25 de alele rare, 5 abundente și 48 frecvente la plantele din rezervația naturală și 4 alele rare, 6 abundente și 42 frecvente la cei din colecția GBNI. Alelele specifice unei subpopulații au frecvențe cuprinse între 0,005 și 0,083, majoritatea din ele fiind rare. Cele mai abundente alele pentru toate cele 10 subpopulații sunt OR10¹¹² și OR64⁸⁷ (frecvența de 0,82 și 0,61 respectiv);

4. Pentru 6 loci SSR (OR10, OR13, OR40, OR44, OR75, OR81) au fost identificate alele specifice la 7 din cele 10 subpopulații studiate: OR13²⁰⁰ (Or5); OR44¹⁶³, OR75¹¹⁴ (Or1); OR10^{102,155}, OR13¹⁷² (Or3); OR40^{133,183}, OR81¹⁵⁸ (Or4); OR81^{197,210} (Ch10); OR40⁸⁶ (Ch8); OR81¹⁸⁷ (Ch9) [22];

5. Prin cuantificarea diversității molecular-genetice (He, Ho, F, G_{ST}, F_{SR}, F_{RT}) la nivelul unui locus separat și multi-locus s-a constatat variabilitatea moleculară intrapopulațională mare (30%) și interpopulațională moderată (7%). Această concluzie este confirmată și de rezultatele analizei varianței moleculare (AMOVA), care au evidențiat gradul mare de variație între indivizi, față de cel relevat la nivel intra- și interpopulațional. Varianța intrapopulațională este mai mare la subpopulațiile din flora spontană (42%) față de cele din colecție (26%);

6. Genotiparea plantelor de *O. vulgare* cu 8 primeri EST-SSR: OR09, OR75, OR27, OR14, OR81, OR64, OR44, OR10 explică 64% din variabilitatea moleculară a subpopulațiilor din cele 2 populații. Șase alele au cea mai mare pondere în diferențierea moleculară (OR64⁸⁷, OR64⁸⁴, OR81¹³⁶, OR14⁸⁷, OR27¹¹⁰, OR09¹⁷⁰). Primerii OR12 și OR13, cumulativ cu OR14 și OR81 explică alte 22% din varianță (CP4-CP5), la care cel mai mult contribuie 5 alele: OR13¹⁴⁸, OR12¹¹⁵, OR12¹¹⁷, OR81¹⁵⁵, OR13¹⁴⁰ [22];

7. Un grad înalt de diferențiere moleculară între subpopulațiile din flora spontană și cele din

colecție este generat de markerul OR64 ($F_{RT} = 0,18$), confirmat și de valorile indicilor H_T , F_{SR} și G_{ST} care indică cea mai mare valoare ($G_{ST} = 0,55$), urmat de OR09 ($F_{RT}=0,12$ și $G_{ST}=0,42$), OR14 ($F_{RT}=0,14$ și $G_{ST}=0,34$) și OR81 ($F_{RT}=0,10$ și $G_{ST}=0,39$). Locii OR10 și OR64 au o valoare a heterozigoției totale de 0,43 și respectiv 0,64 la plantele din flora spontană și homoziigoție absolută la cele din colecția GBNI;

8. Variantele alelice cu contribuții semnificative în diferențierea moleculară intrapopulațională sunt: OR81¹³⁶ și 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). Aceste alele reprezintă polimorfisme pentru subpopulațiile studiate și au o frecvență >25% [22]. Sistemul multi-locus studiat diferențiază bine subpopulațiile din flora spontană între ele ($F_{SR} = 0,27$) și mai slab cele din colecție ($F_{SR} = 0,15$);

9. Evaluarea structurii moleculare intrapopulaționale indică primul nivel de similaritate molecular-genetică între Or1 și Or2 (grupul I), Or3, Or4 și Or5 (grupul II), Ch8, Ch9 și Ch10 (grup III), demonstrând tendința de asociere în funcție de biotopul colectării plantelor. Subpopulațiile Or6 și Or7 sunt mai distante de celelalte subpopulații din flora spontană, indicând un grad comparativ mai mare de divergență moleculară;

10. Subpopulațiile Or3 ($A = 49$; $N_A = 4,46$; $N_E = 3,64$; $N_s = 3$; $PLP = 100\%$), Or4 ($A = 46$; $N_A = 4,18$; $N_E = 3,77$; $N_s = 3$; $PLP = 100\%$) și Or5 ($A = 44$; $N_A = 4$; $N_E = 2,82$; $PLP = 91\%$) au cele mai mari valori ale indicilor de estimare a diversității alelice;

11. La nivel intrapopulațional media heterozigoției pentru cei 11 loci analizați, relevă cea mai mare ponderere a heterozigoților la subpopulația Or4 ($H_o = 0,75$ și $H_e = 0,72$), iar cea mai scăzută la subpopulațiile: Or1 ($H_e = 0,38$; $H_o = 0,42$), Or2 ($H_e = 0,38$; $H_o = 0,34$) și Or7 ($H_e = 0,36$; $H_o = 0,42$). Acest clasament se suprapune cu cel identificat la parametrul N_E , ceea ce subliniază o legătură strânsă între numărul efectiv de alele la o subpopulație și numărul de genotipuri heterozigote care rezultă din combinarea lor (Or7 < Or1, Or2 < Or6 < Or5 < Or3 < Or4).

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

Genotiparea plantelor de *O. vulgare* cu 11 markeri microsatețiți din regiunile de codificare a genelor (EST-uri), care se transcriu în țesutul epidermic glandular cu funcție de sinteză și depozitare a terpenelor, a pus în evidență rezultate convergente privind gradul înalt de diversitate molecular-genetică la subpopulațiile din habitatul natural în comparație cu cele din colecția GBNI. Aceste constatări susțin ideea unei variabilități biochimice intrapopulaționale a plantelor 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 speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare*, datorită conținutului înalt de SBA (glucozide fenolice, flavonoide, taninuri, steroli, terpenoide) fac subiectul a varii cercetări aplicative ce vizează această specie în calitate de PMA [44, 102, 157, 259]. Un aspect mai puțin explorat, în deosebi în Republica Moldova, unde comparativ cu alte țări, este slab dezvoltată practica cultivării și producerii acestei plante în calitate de PMA, constituie identificarea surselor noi de variabilitate cu potențial de valorificare economică.

Din informațiile pe care le deținem, la nivel național, specia *O. vulgare* a fost introdusă în cultura comercială, după anul 2000. Se cultivă pe suprafețe industriale (peste 300 de ha, în zonele de centru și nord), preponderent ssp. *hirtum* [15]. Obiectivele investigațiilor din ultimii ani, ai cercetătorilor din laboratorul Plante Aromatice și Medicinale al IGFPP, au vizat culturile experimentale de *O. vulgare*, tehnologia de cultivare și conservare a materiei prime, precum și identificarea unor compuși cu valoare farmaceutică [6, 10, 15]. Dr. hab. Goncariuc M. și echipa sa au analizat diferite genotipuri de *O. vulgare* ssp. *hirtum* și *vulgare* din colecția IGFPP, sub aspectul diversității morfologice și biochimice, identificând un conținut mai mare de ulei esențial și *carvacrol* la ssp. *hirtum*, comparativ cu ssp. *vulgare* [117].

Acest capitol este consacrat cercetării variabilității biochimice a extractelor vegetale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană, în scopul identificării unor chemovarietăți cu caracteristici valoroase, care ar putea servi ca surse autohtone de ulei esențial sau extracte vegetale bogate în principii bioactive, pentru a fi incluse în potențialele programe de ameliorare a culturilor PMA. Astfel, obiectivele specifice au fost:

- *identificarea unor compuși nevolatili (flavonoide și fenoli) cu proprietăți antioxidante;*
- *analiza cantitativă a compușilor polifenolici prin metode cromatografice și spectrofotometrice;*
- *determinarea amprentei gaz-cromatografice a uleiului volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare* și stabilirea chemovarietății plantelor din habitatul natural al rezervației naturale Orheiul Vechi.*

5.1. Analiza calitativă a extractelor vegetale

Prelevarea plantelor din flora spontană s-a realizat în perioada de înflorire deplină, considerată, conform literaturii de specialitate, optimă pentru studiul fitochimic, deoarece în această perioadă se acumulează cantități maxime de ulei esențial [50, 80, 81]. Întrucât procesul de înflorire la *O. vulgare* este gradual [214], au fost colectate probe când 90% din ramurile distribuite axial erau înflorite.

Primul obiectiv în studiul fitochimic a constituit analiza calitativă prin *cromatografie pe strat subțire* (CSS) a extractelor vegetale obținute din subpopulațiile indigene, după metoda Farmacopeei Europene (ed. X) cu utilizarea etaloanelor disponibile pentru flavonoide și acizi polifenolcarboxilici.

Acești compuși au rol de antioxidanți și captatori de radicali liberi în sistemele biologice, datorită cărui fapt manifestă efecte fitoterapeutice. *Acidul rozmarinic* a demonstrat proprietăți antibacteriene, antivirale, antioxidante și antiinflamatoare. De asemenea, numeroase studii au descris proprietățile antioxidante, antihepatice, antitumorale, anti-HIV, antifungice, gastroprotectoare și hipoglicemice a compușilor triterpenici, ca *acidul ursolic* și *oleanolic* [263]. Principala caracteristică a unui antioxidant care pot fi de natură enzimatică, polifenolică, vitamine, taninuri, pigmenți etc., este capacitatea de a neutraliza radicalii liberi și speciile reactive de oxigen. Evaluarea fitopreparatelor naturale după conținutul în compuși antioxidanți are un rol esențial, întrucât procesele pro-oxidante și pro-inflamatorii stau la baza diferitor boli la om [7].

Cromatogramele obținute în cadrul prezentei cercetări pun în evidență prezența compușilor antioxidanți de tip polifenolic: *acidului rozmarinic* în calitate de compus dominant, *acidul cafeic* și *acidul clorogenic*. Flavonoidele sunt reprezentate de *rutozidă (R.)*, *luteolină (L.)* și *apigenol (Ap)*. În conformitate cu etaloanele utilizate s-au identificat de asemenea și triterpene ca: *beta-sitosterolul (B.)*, *stigmasterolul (S.)*, *acidul oleanolic (O.)* și *acidul ursolic (U.)* (Figura 5.1. A, B).

Analiza cromatografică pe strat subțire a relevat conținuturi sporite de compuși polifenolici: *acid cafeic*, *acid clorogenic* și *acid rozmarinic*, identificate prin spoturi mai intense în culoare și mai voluminoase în comparație cu cele ale flavonoidelor, dintre care *rutozida* este compusul cel mai bine evidențiat (spotul oranj) (Figura 5.1, A).

În cazul compușilor triterpenici, în extractele vegetale de *O. vulgare*, în conformitate cu etaloanele utilizate: *β-sitosterolul* și *stigmasterolul*, *acidul oleanolic* și *acidul ursolic*, sunt observate spoturile pentru compușii triterpenici mai intense și mai accentuate la subpopulațiile Or1, Or2, Or3 și Or7. În literatura de specialitate se evidențiază rolul triterpenelor în direcționarea căilor de semnalizare în cazul apariției cancerului. În calitate de receptori principali ai membranei, triterpenele controlează și modulează nivelul de expresie al răspunsurilor biologice [110].

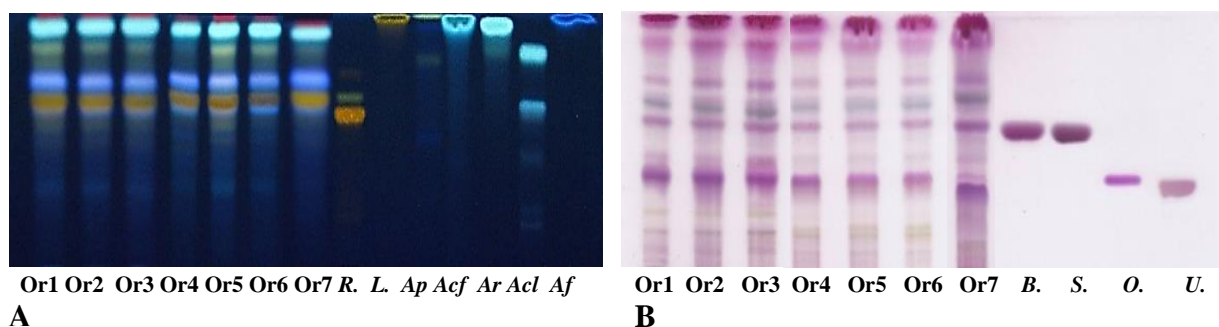


Fig. 5.1. Cromatogramele pe strat subțire pentru flavonoide, acizi polifenolcarboxilici (A) și compuși triterpenici (B) în subpopulațiile naturale de *O. vulgare*
Notă: Or1-Or7 subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare* (rezervația Orheiul Vechi); Etaloane flavonoide: **R.** – rutozida, **L.** – luteolina, **Ap** – apigenol. Etaloane acizi polifenolcarboxilici: **Acf** – acid cafeic, **Ar** – acid rozmarinic, **Acl** – acid clorogenic, **Af** – acid ferulic. Etaloane triterpene: **B.** – β -sitosterol, **S.** – stigmasterol, **O.** – acid oleanolic, **U.** – acid ursolic.

În aspect cantitativ cromatogramele pe strat subțire au o capacitate joasă de diferențiere între eșantioane. Astfel, complementar la analiza CSS s-au efectuat și cercetări cantitative prin spectrofotometrie și HPLC (*cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță*) pentru compușii polifenolici din extractele subpopulațiilor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* și prin GC-MS (*cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectroscopie de masă*) – pentru compușii terpenici.

5.2. Evaluarea cantitativă a substanțelor biologice active

Analiza spectrofotometrică a extractelor vegetale a rezultat în date cantitative ale conținutului total al polifenolilor, acizilor polifenolcarboxilici și flavonoidelor determinat în grame la 100 g substanță uscată (s.u.) și însumate în Tabelul 5.1.

Conținutul polifenolilor totali exprimați în g echivalenți *acidul galic*/100 g s.u. variază între 3-5 g/100 g s.u. la plantele celor 7 subpopulații. Astfel, Or1 (4,90 g) și Or6 (4,96 g) se evidențiază prin conținutul în polifenoli totali cel mai mare, iar Or3, Or4 și Or7 prezintă cu 25-40% valori mai mici (2,99-3,72 g), cu diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$) față de toate subpopulațiile luate în studiu.

Cuantificarea **acizilor polifenolcarboxilici** (g echivalenți *acid rozmarinic*) a relevat valori maxime pentru acești compuși la Or6 și Or1 (3,4 g/100g s.u.) și mult mai mici în raport cu acestea, cu cca 18-47%, la subpopulațiile Or2, Or4 și Or7 (1,76-2,80 g, $p < 0,05$). Ponderea acizilor polifenolcarboxilici în conținutul total al polifenolilor (Figura 5.2), constituie 63-69%, cea mai mică valoare fiind observată la subpopulația Or4 (58,7%).

Nivelul bioacumulării **flavonoidelor** prezintă diferențe în conținuturi între cele șapte subpopulații de circa 10-40%, de exemplu, 1,05 g/100 g s.u. la Or1 și 0,63 g/100 g s.u. la Or7 pentru *rutozidă* și în cazul – *luteolinei* 0,52 g/100 g s.u. la Or1 și 0,29 g/100 g s.u. (Or4 și Or7).

Tabelul 5.1. Conținutul de polifenoli și flavonoide (g/100 g s.u.) determinat spectrofotometric în extractele vegetale de *O. vulgare*

Subpopulații de <i>O. vulgare</i>	Polifenoli totali	Acizi polifenolcarboxilici	Flavonoide	
	<i>Acid galic</i>	<i>Acid rozmarinic</i>	<i>Rutozidă</i>	<i>Luteolină</i>
Or1	4,90±0,29 ^a	3,38±0,17 ^a	1,05±0,06^a	0,52±0,05 ^a
Or2	4,12±0,12 ^b	2,80±0,04^b	0,89±0,05^b	0,46±0,11 ^{a,b}
Or3	3,72±0,16^c	2,48±0,05 ^c	0,81±0,02 ^c	0,39±0,11 ^b
Or4	2,99±0,06^e	1,76±0,04^e	0,66±0,07 ^d	0,29±0,02 ^c
Or5	4,08±0,10 ^b	2,55±0,14 ^c	0,79±0,03 ^c	0,41±0,04 ^b
Or6	4,96±0,09 ^a	3,39±0,14 ^a	0,80±0,07 ^c	0,47±0,06 ^{a,b}
Or7	3,33±0,13^d	2,10±0,02^d	0,63±0,08 ^d	0,29±0,08 ^c
P (<0,05)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei±eroarea valorii medii (n=3); analiza statistică realizată prin ANOVA, testul *Bonferroni*, prin diferite litere diferența statistic semnificativă (p<0,05) dintre subpopulații, iar valorile marcate cu bold sunt cele care diferă față de toate subpopulațiile.

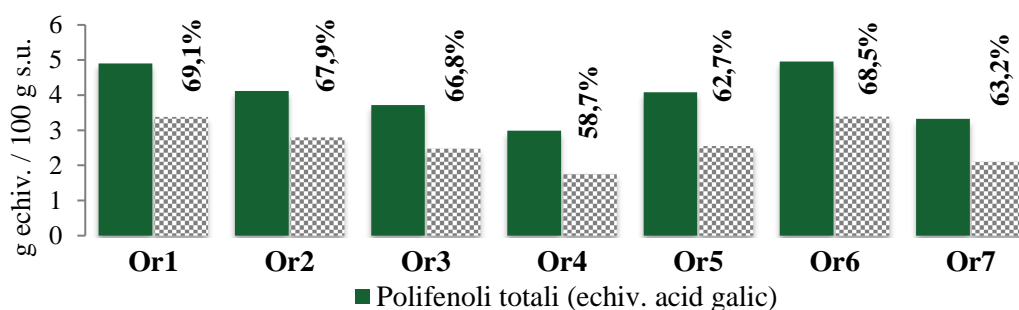


Fig. 5.2. Ponderea procentuală a acizilor polifenolcarboxilici în conținutul de polifenoli totali a extractelor vegetale de *O. vulgare*

Notă: Or1-Or7 subpopulații indigene de *O. vulgare* (polifenoli totali - 100%).

Pentru un studiu mai detaliat al fracțiilor multicomponente de polifenoli totali, flavonoide sau acizi polifenolcarboxilici identificați în extractele vegetale, acestea au fost supuse analizei prin *cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță* (HPLC).

Cromatogramele HPLC au relevat variații ale compușilor polifenolici, mai mult în aspect cantitativ decât calitativ evidențiind conținutul înalt de *acid rozmarinic* la toate subpopulațiile luate în acest studiu. În Tabelul 5.2 sunt sintetizate datele cantitative ale compușilor polifenolici, reprezentați prin *acidul clorogenic*, *cafeic*, *p-cumaric*, *rozmarinic* și ale flavonoidelor, reprezentați prin *luteolină*.

Acidul rozmarinic – componentul major din fracția compușilor polifenolici a fost cantificat cu valori maxime de 1678,14 mg la Or6 și minime la 431,06 mg/100 g s.u. la Or4, de 4 ori mai mici. După conținutul acidului rozmarinic se conturează următorul clasament a subpopulațiilor: Or4 < Or7 < Or5 < Or3 < Or2 < Or1 < Or6.

Spre deosebire de *acidul rozmarinic*, ceilalți compuși au fost identificați în cantități de 15,15-20,76 mg în cazul *acidului cafeic*, 1,65-5,12 mg – al *acidului clorogenic* și 1,06-1,88 – al

acidului p-cumaric, deci sunt mai mici față de valoarea medie a conținutului *acidului rozmarinic* (961,20 g) de 64 de ori; 275 de ori și 640 de ori respectiv.

Tabelul 5.2. Conținutul de polifenoli și flavonoide determinat prin HPLC (mg/100 g s.u.)

Subpopulații de <i>O. vulgare</i>	<i>Acid clorogenic</i>	<i>Acid cafeic</i>	<i>Acid p-cumaric</i>	<i>Acid rozmarinic</i>	<i>Luteolină</i>
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^g	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
P (<0,05)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei±eroarea valorii medii (n=3); analiza statistică realizată prin ANOVA, testul *Bonferroni*, prin diferite litere diferența statistic semnificativă (p<0,05) dintre subpopulații, iar valorile marcate cu bold sunt cele care diferă față de toate subpopulațiile.

După conținutul de *acid cafeic*, se evidențiază Or7 cu 20,76 mg/ 100 g s.u. și Or3 cu cel mai mic conținut – 14,90 mg/100 g s.u. Între aceste două valori cantitative subpopulațiile studiate se repartizează astfel: Or3 < Or5 < Or1 < Or6 < Or2 < Or4 < Or7.

Al treilea compus după conținut este *acidul clorogenic* cu valori maxime (5,12 mg) pentru Or4 și minime (1,65 mg/100 g s.u.) pentru Or6. În acest caz se constată următoarea repartizare ascendentă a subpopulațiilor de plante indigene: Or6 < Or2 < Or1 < Or3 < Or7 < Or5 < Or4.

Acidul p-cumaric depistat în cromatograme cu cele mai mici valori (1-2 mg) se repartizează la diferite subpopulații astfel: Or6 < Or4 < Or7 < Or3 < Or5 < Or2 < Or1.

În ceea ce privește *luteolina* valorile sunt cuprinse între 5,96 mg/ 100 g s.u. pentru Or1 și 2,04 mg/ 100 g s.u. pentru Or7. Între aceste două valori cantitative subpopulațiile se repartizează astfel: Or7 < Or4 < Or3 < Or6 < Or2 < Or5 < Or1.

Generalizând datele de mai sus, menționăm că dintre compușii polifenolici, *acidul rozmarinic* prevalează cantitativ cu mult asupra altor polifenoli studiați (*acidul cafeic*, *clorogenic*, *p-cumaric*). Conținut ridicat în *acid rozmarinic* la specia *O. vulgare* a fost raportat și de alți cercetători [29, 242, 282]. Agiomyrgianaki și colab. (2012) au cuantificat în plantele speciei *O. vulgare* compuși fenolici precum: *acidul ferulic*, *apigenolul*, *acidul oleanolic*, *acidul ursolic*, *acidul rozmarinic*, *acidul clorogenic*, *naringenina*, *eriodicitolul* și *taxifolin* [29], iar Shen și colab. (2010) au descris prezența doar a acizilor: *rozmarinic*, *oleanolic* și *ursolic* [242].

Diferența foarte mare în conținutul de substanțe polifenolice și flavonoide poate fi determinată de condițiile climaterice cu umiditate ridicată, zile mai puțin însorite în perioada înfloririi. Se cunoaște că flavonoidele în plante variază în funcție de durata și intensitatea luminii

solare, deoarece ele constituie substanțe cu rol de ecran față de radiațiile UV. În cazul în care planta nu necesită cantități sporite de substanțe flavonoide, cresc acumulările de acizi polifenolcarboxilici, deoarece, ambele clase de compuși bioactivi au la bază aceiași precursori biogenetici [11, 14].

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

Uleiurile volatile denumite și uleiuri esențiale sau eterice, sunt obținute în urma unui proces de hidrodistilare din diverse organe ale plantelor: flori, frunze, rădăcini, semințe etc. Uleiul volatil de *O. vulgare* are un mare potențial economic în industria alimentară, farmaceutică, chimică, în parfumerie, agricultură și nu în ultimul rând în medicină, datorită terpenelor – compuși ai metabolismului secundar de o mare diversitate funcțională și activitate biologică [166].

Compoziția chimică calitativă și cantitativă a uleiului esențial este variabilă, fiind raportate diferite chemotipuri (chemovarietăți) cu monoterpene și sesquiterpene în calitate de compuși dominanți [248]. S-a constatat, de asemenea, un nivel înalt de variabilitate a uleiului esențial între speciile și subspeciile din cadrul genului *Origanum* L. Cel mai răspândit chemotip, care are la bază compuși monoterpenici și o aromă specifică utilizată în industria alimentară, este cel al speciilor *O. dubium*, *O. onites* [247] și *O. syriacum* [164]. Pentru specia *O. vulgare* sunt caracteristice monoterpenele fenolice din care derivă ulterior timolul și carvacrolul [248]. Factorii care determină compoziția și cantitatea uleiului volatil sunt numeroși și interdependenți, fiind dificil de diferențiat între ei. Adicional la factorii moleculari se includ și variațiile sezoniere și de maturare, originea geografică, fazele de creștere, părțile din plante ce sunt utilizate.

În literatura de specialitate există numeroase date ce arată variații în compoziția chimică a uleiului volatil la plantele de *O. vulgare* în funcție de regiunile/ locațiile geografice în care cresc plantele. Astfel de diferențe ar putea fi determinate de compoziția variată a solului și răspunsul de adaptare al plantelor, factori care condiționează formarea de produși chimici diferiți, fără a fi constatate diferențe marcante în morfologia plantelor respective [75, 112, 141, 165].

În contextul celor menționate, ne-am propus în cadrul acestei lucrări să identificăm eventualele variații în compoziția chimică a uleiurilor volatile de la plantele celor 7 subpopulații naturale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* luate în studiu, în scopul identificării plantelor cu un grad înalt al valorii lor aromatice. În vederea analizei compoziției chimice a uleiurilor volatile s-a utilizat metoda *cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectroscopie de masă* (GC-MS). Componentii separați sunt identificați conform timpului de retenție (distanța parcursă de componentul reținut pe coloană între evaporator și detector) în raport cu spectrele standard.

Tabelul 5.3. Compuși volatili identificați prin GC-MS la *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Nr.	pRT	Compușii uleiului esențial	Formula chimică	Clasa
1.	5,16	<i>α-tujen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
2.	5,28	<i>α-pinen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
3.	5,89	<i>sabinen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
4.	5,95	<i>β-pinen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
5.	6,03	<i>3-octanonă</i>	C ₈ H ₁₆ O	NT
6.	6,10	<i>β-mircen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
7.	6,16	<i>3-octanol</i>	C ₈ H ₁₈ O	NT
8.	6,53	<i>α-terpinen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
9.	6,65	<i>p-cimen</i>	C ₁₀ H ₁₄	MT
10.	6,73	<i>d-limonen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
11.	6,78	<i>eucaliptol</i>	C ₁₀ H ₁₈ O	MT
12.	6,81	<i>cis-β-ocimen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
13.	6,99	<i>trans-β-ocimen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
14.	7,18	<i>γ-terpinen</i>	C ₁₀ H ₁₆	MT
15.	7,77	<i>linalol</i>	C ₁₀ H ₁₈ O	MT
16.	8,76	<i>isopinocamfonă</i>	C ₁₀ H ₁₆ O	MT
17.	9,00	<i>4-terpineol</i>	C ₁₀ H ₁₈ O	MT
18.	9,18	<i>α-terpineol</i>	C ₁₀ H ₁₈ O	MT
19.	9,88	<i>lemonal</i>	C ₁₀ H ₁₆ O	MT
20.	10,04	<i>cis-geraniol</i>	C ₁₀ H ₁₈ O	MT
21.	10,29	<i>geranial</i>	C ₁₀ H ₁₆ O	MT
22.	10,63	<i>dihidro-edulan I</i>	C ₁₃ H ₂₂ O	NP
23.	11,79	<i>geranil acetat</i>	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	MT

Notă: compușii sunt enumerați în ordinea timpului de eluție a gaz-cromatografiei (pRT) 1-23; MT – monoterpene; NP – norizoprenoizi; NT – compuși neterpenoizi.

Dintr-o 100 g de biomasă uscată s-au extras de la 0,8 ml până la 1,0 ml de ulei esențial conform Farmacopeei Române (ed. 8 și 10) și Agenția Europeană a Medicamentului. Analiza compoziției chimice a uleiului a pus în evidență un număr total de 38 de compuși ai metabolismului secundar, dintre care 20 de monoterpene și 15 sesquiterpene (Tabelul 5.3, 5.4).

Alți trei compuși sunt: *dihidro-edulan I* din clasa norisoprenoizilor (NP), *3-octanonă* (C₈H₁₆O) și *3-octanol* (C₈H₁₈O) cu valori mai mici de 1%. Astfel de compuși alifatici sunt caracteristici speciei *Thymus vulgaris* [248].

Numărul de 38 de compuși se identifică în uleiul volatil extras doar din plantele subpopulațiilor Or2, Or6 și Or7. Astfel, componentul *α-amorfen* (ST) lipsește din profilul subpopulației Or1, *lemonalul* și *geranialul* (MT) lipsesc din extractul vegetal al Or3 și Or4, *isopinocamfona* și *cis-geraniolul* (MT) nu sunt prezenți în uleiul esențial al subpopulației Or5 și *eucaliptolul* (MT) în Or3. Astfel, la subpopulația Or3 s-au identificat 35 de compuși terpenici, la Or4 și Or5 – 36 și la Or1 – 37 de compuși.

Tabelul 5.4. Compuși sesquiterpenici identificați prin GC-MS la *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Nr.	pRT	Compuși uleiului esențial	Formula chimică
1.	11,97	<i>β</i> -burbonen	C ₁₅ H ₂₄
2.	12,02	<i>β</i> -elemen	C ₁₅ H ₂₄
3.	12,46	<i>β</i> -cariofilen	C ₁₅ H ₂₄
4.	12,57	(+)- <i>epi-biciclosesquifelandren</i>	C ₁₅ H ₂₄
5.	12,90	<i>α</i> -cariofilen	C ₁₅ H ₂₄
6.	13,11	<i>α</i> -amorfen	C ₁₅ H ₂₄
7.	13,26	<i>germacren D</i>	C ₁₅ H ₂₄
8.	13,44	<i>τ</i> -gurjunen	C ₁₅ H ₂₄
9.	13,52	<i>β</i> -bisabolen	C ₁₅ H ₂₄
10.	13,73	<i>δ</i> -cadinen	C ₁₅ H ₂₄
11.	14,09	<i>elemol</i>	C ₁₅ H ₂₆ O
12.	14,38	<i>spatulenol</i>	C ₁₅ H ₂₄ O
13.	14,49	<i>oxid de cariofilen</i>	C ₁₅ H ₂₄ O
14.	14,99	<i>τ</i> -murolol	C ₁₅ H ₂₆ O
15.	15,24	<i>α</i> -cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O

Notă: compușii sunt enumerați în ordinea timpului de eluție a gaz-cromatografiei (pRT)

Procentul total care revine monoterpenelor (MT) este sub cel al sesquiterpenelor (ST) la toate subpopulațiile cu excepția la Or5 și Or6, la care ambele clase de substanțe au aproximativ același conținut cu o diferență statistic ne semnificativă ($p=0,36$, respectiv $p=0,77$). Cele mai mari diferențe cantitative între aceste 2 clase de compuși (MT față de ST) sunt identificate la Or3 (de 73%) și la Or7, Or4 și Or2 (23-26%) (Figura 5.3). Variația conținutului de MT la diferite subpopulații poate fi caracterizată prin următoarea succesiune ascendentă: Or3 (21,3%) < Or2 (31,9%) < Or7 (32,8%) < Or4 (34,8%) < Or1 (36,5%) < Or6 (42,2%) < Or5 (51,0%). În ceea ce privește ST din uleiul esențial, subpopulațiile se repartizează conform valorilor procentuale ale conținutului astfel: Or6 (42,2%) < Or5 (42,9%) < Or1 (53,1%) < Or7 (56,5,8%) < Or2 (57,5%) < Or4 (59,4%) < Or3 (72,8%).

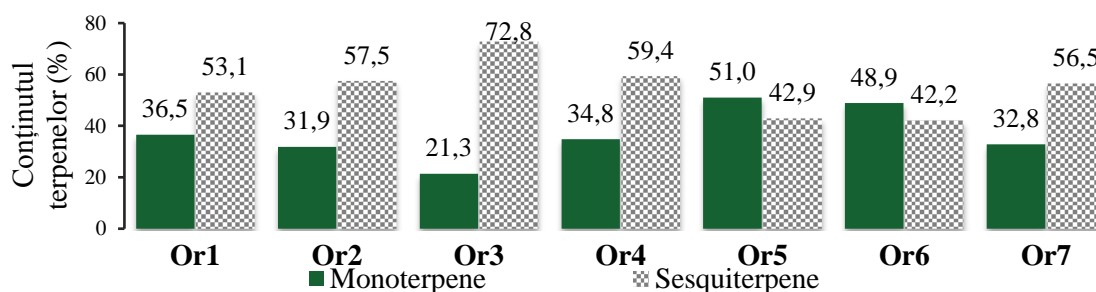


Fig. 5.3. Monoterpenele și sesquiterpenele identificate prin GC-MS

Din totalul de 38 de compuși terpenici, 28 au valori mai mari de 1%, cel puțin în cazul unei singure subpopulații. Dintre aceștia, 17 sunt MT (Tabelul 5.5) și 11 ST (Tabelul 5.6) și prezintă

variații în bioacumulări la diferite subpopulații, în concentrația și tipul terpenelor identificate: Or1 (10 MT; 10 ST), Or2 (7 MT; 9 ST), Or3 (4 MT; 9ST); Or4 (10 MT; 8 ST), Or5 (12 MT; 6 ST), Or6 (15 MT; 8 ST), Or7 (9 MT; 10 ST).

Tabelul 5.5. Monoterpenele cu un conținut mai mare de 1%

Terpene	Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or6	Or7
<i>α-pinen</i>	0,70±0,17 ^{cd}	0,57±0,16 ^d	0,22±0,04^e	0,61±0,03 ^d	1,19±0,16^a	0,79±0,02 ^{bc}	0,91±0,05 ^b
<i>sabinen</i>	12,37±0,28^d	15,04±0,04^b	0,65±0,12^g	11,93±0,13^e	13,51±0,05^c	15,31±0,07^a	8,04±0,03^f
<i>β-pinen</i>	0,84±0,03^e	0,35±0,07^g	0,77±0,04^f	1,49±0,02^c	2,63±0,05^a	1,00±0,02^d	1,72±0,02^b
<i>β-mircen</i>	1,00±0,02 ^d	0,96±0,04 ^d	0,74±0,07^f	1,27±0,03^c	1,54±0,06^b	1,64±0,05^a	0,87±0,04^e
<i>p-cimen</i>	2,13±0,05^f	2,96±0,03^d	4,97±0,02^b	3,42±0,02^c	2,06±0,02^g	2,60±0,01^e	5,35±0,09^a
<i>d-limonen</i>	1,33±0,05 ^d	1,07±0,02^e	0,45±0,05^f	1,37±0,04 ^d	2,66±0,06^a	1,77±0,03^b	1,58±0,04^c
<i>eucaliptol</i>	1,55±0,07^d	1,06±0,03^f	0^g	1,17±0,02^e	7,15±0,04^a	3,51±0,02^c	3,81±0,02^b
<i>cis-β-ocimen</i>	5,67±0,03^a	2,67±0,02^d	2,11±0,02^f	2,10±0,03^c	5,43±0,02^b	2,37±0,10^e	2,00±0,04^g
<i>trans-β-ocimen</i>	3,51±0,07^e	2,27±0,07^g	7,77±0,09^a	4,77±0,18^c	5,57±0,05^b	4,59±0,03^d	2,74±0,22^f
<i>γ-terpinen</i>	1,84±0,08^b	0,34±0,09 ^{ef}	1,39±0,05^c	2,20±0,03^a	1,24±0,12^d	0,41±0,07 ^e	0,27±0,08 ^f
<i>linalol</i>	0,40±0,05 ^d	0,72±0,07 ^b	0,35±0,05 ^d	0,54±0,06^c	0,83±0,13 ^b	1,18±0,20^a	0,35±0,12 ^d
<i>4-terpineol</i>	2,28±0,25 ^b	2,14±0,13 ^{bc}	0,48±0,06^f	1,16±0,13^e	2,60±0,10^a	2,10±0,10 ^c	1,82±0,10^d
<i>α-terpineol</i>	1,02±0,11^d	0,59±0,14 ^e	0,16±0,24^f	0,51±0,05 ^e	3,51±0,08^a	1,42±0,15^c	1,88±0,23^b
<i>lemonal</i>	0,04±0,02 ^b	0,05±0,02 ^b	0 ^b	0 ^b	0,05±0,06 ^b	1,51±0,29^a	0,05±0,03 ^b
<i>cis-geraniol</i>	0,04±0,04 ^{cd}	0,08±0,03 ^{bc}	0,07±0,04 ^{bc}	0,13±0,02 ^b	0 ^d	1,34±0,11^a	0,13±0,03 ^b
<i>geranial</i>	0,07±0,06 ^{bc}	0,08±0,06 ^{bc}	0 ^c	0 ^c	0,07±0,07 ^{bc}	2,20±0,15^a	0,10±0,09 ^b
<i>geranil acetat</i>	0,17±0,05 ^c	0,23±0,13 ^c	0,18±0,09 ^c	0,18±0,12 ^c	0,16±0,09 ^c	4,63±0,56^a	0,68±0,14^b

Notă: Or1-Or7 subpopulații de *O. vulgare* (rezervația Orheiul Vechi); compuși cu un conținut $\geq 1\%$ în uleiul esențial la cel puțin o subpopulație; datele sunt prezentate sub forma mediei±eroarea valorii medii (n=3); analiza statistică prin ANOVA, testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații, iar valorile marcate cu bold sunt cele care diferă față de toate subpopulațiile.

Cinci monoterpene cu cele mai mari valori procentuale prezintă variații cantitative la diferite subpopulații din cele 7 studiate:

- *sabinen*, 1-15%: Or3<Or7<Or4<Or1<Or5<Or2<Or6;
- *trans-β-ocimen*, 2-8%: Or2<Or7<Or1<Or6<Or4<Or5<Or3;
- *cis-β-ocimen*, 2-6%: Or7<Or4<Or3<Or6<Or2<Or5<Or1;
- *p-cimenul*, 2-5%: Or5<Or1<Or6<Or2<Or4<Or3<Or7;
- *eucaliptolul*, 1-7%, este absent în uleiul extras din Or3, ulterior Or2<Or4<Or1<Or6<Or7<Or5.

S-a remarcat faptul că *4-terpineol* și *α-terpineol* sunt bine reprezentate în probele analizate la Or5 (2,60%, respectiv 3,51%), iar *lemonalul*, *cis-geraniolul*, *geranialul* și *geranil acetatul* au valori înalte la Or6 (1,51%, 1,34%, 2,20%, și 4,63% respectiv), valori cu diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$) față de toate subpopulațiile.

Acumulările de *sabinen*, *β-pinen*, *p-cimen*, *eucaliptol*, *cis-β-ocimen* și *trans-β-ocimen*

prezintă diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$) la toate subpopulațiile între ele, relevând variabilitate chimică intrapopulațională.

În cazul compușilor sesquiterpenici principalii constituenți ai uleiului volatil de *O. vulgare* din probele analizate sunt:

- *β-cariofilen*, 14-33%: Or6<Or1<Or5<Or7<Or4<Or2<Or3;
- *germacren D*, 9-17%: Or6<Or2<Or7<Or3<Or5<Or1<Or4;
- *oxid de cariofilen*, 3-12%: Or5<Or<Or4<Or6<Or2<Or3<Or7;
- *α-cariofilen*, 3-7%: Or6<Or5<Or1<Or7<Or4<Or2<Or3;
- *τ-gurjunen*, 2-4%: Or7<Or6<Or2<Or5<Or1<Or3<Or4.

Tabelul 5.6. Sesquiterpenele cu un conținut mai mare de 1%

Terpene	Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or6	Or7
<i>β-burbonen</i>	1,13±0,18 ^a	0,94±0,19 ^b	0,89±0,10 ^{b,c}	0,91±0,08 ^{b,c}	0,77±0,11 ^c	0,91±0,11 ^{b,c}	1,01±0,19 ^{a,b}
<i>β-cariofilen</i>	14,53±0,26^f	20,97±0,16^b	33,02±0,19^a	19,70±0,22^c	14,82±0,08^e	13,56±0,15^g	17,44±0,17^d
<i>α-cariofilen</i>	3,09±0,11 ^e	4,25±0,09^b	6,56±0,12^a	3,95±0,15^c	3,07±0,12 ^e	2,83±0,25^f	3,69±0,09^d
<i>germacren D</i>	16,06±0,13^b	11,45±0,12^f	12,38±0,28^d	16,83±0,17^a	12,74±0,17^c	9,45±0,11^g	12,05±0,11^e
<i>τ-gurjunen</i>	3,70±0,11 ^b	3,01±0,03 ^c	3,73±0,11 ^b	4,25±0,08^a	3,12±0,13 ^c	2,58±0,17^d	1,69±0,16^e
<i>β-bisabolen</i>	2,63±0,06^a	1,60±0,02 ^b	1,08±0,13^c	1,52±0,07 ^b	0,81±0,015^d	0,25±0,09 ^e	0,27±0,05 ^e
<i>elemol</i>	1,40±0,05^a	0,67±0,09^c	0,28±0,04 ^e	0,14±0,04 ^e	0,04±0,02^f	0,52±0,06^d	1,02±0,03^b
<i>spatulenol</i>	1,36±0,10 ^c	2,11±0,13 ^a	1,94±0,12^b	2,23±0,06 ^a	1,12±0,14 ^d	1,36±0,10 ^c	1,09±0,01 ^d
<i>oxid de cariofilen</i>	4,47±0,17^f	6,67±0,12^c	7,84±0,13^b	4,88±0,21^e	3,38±0,09^g	6,22±0,05^d	12,00±0,03^a
<i>τ-murolol</i>	0,37±0,08^f	1,36±0,10 ^c	1,42±0,21 ^{b,c}	0,91±0,04^d	0,67±0,12^e	1,50±0,07 ^b	2,08±0,04^a
<i>α-cadinol</i>	2,57±0,03 ^a	2,50±0,06 ^a	1,54±0,11^d	1,67±0,12^c	0,98±0,05^f	1,35±0,07^e	2,02±0,06^b

Notă: Or1-Or7 subpopulații de *O. vulgare* (rezervația Orheiul Vechi); compuși cu un conținut $\geq 1\%$ în uleiul esențial la cel puțin o subpopulație; datele sunt prezentate sub forma mediei±eroarea valorii medii (n=3); analiza statistică prin ANOVA, testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații, iar valorile marcate cu bold sunt cele care diferă față de toate subpopulațiile.

Bioacumulările cele mai crescute în compuși sesquiterpenici sunt depistate la plantele din:

- **Or1:** *β-burbonen* – 1,13%, *β-bisabolen* – 2,63%, *elemol* – 1,40% și *α-cadinol* – 2,57%;
- **Or3:** *β-cariofilen* – 33,02% și *α-cariofilen* – 6,56%;
- **Or4:** *germacren D* – 16,83%, *τ-gurjunen* – 4,25% și *spatulenol* – 2,23%.

Germacren D (pesticid și feromon [291]), *oxidul de cariofilen* și *β-cariofilenul* (cu rol gastroprotector și anestezic [108]) sunt compușii sesquiterpenici cu valori înalte ($p < 0,05$), care diferențiază subpopulațiile între ele.

În scopul reprezentării grafice a unui profil biochimic, într-o formă lizibilă, au fost selectați 19 din 28 de compuși cu conținutul mai mare de 2%, cel puțin în cazul unei singure subpopulații, fiind astfel obținute șapte amprente ale compușilor volatili (Figura 5.4). Compușii majoritari din probele de ulei volatil analizate prin metoda GC-MS sunt: *β-cariofilen* (13,56%-33,02%),

germacren D (9,45-16,83%), *sabinen* (0,65-15,31%), *oxid de cariofilen* (3,38-12,00%) și *β-ocimen* (*cis-* și *trans-*) (2,00-7,77%). Acești cinci componenți constituie un raport: *β-cariofilen/germacren D/ sabinen/ β-ocimen (cis- și trans)/ oxid de cariofilen* cu valori numerice diferite la subpopulațiile studiate: Or1 (3,2/3,6/2,8/2,1/1,0); Or2 (3,1/1,7/2,3/0,7/1,0); Or3 (4,2/1,6/0,1/1,3/1,0); Or4 (4,0/3,4/2,4/1,6/1,0); Or5 (4,4/3,8/4,0/3,3/1,0); Or6 (2,2/1,5/2,5/1,1/1,0); Or7 (1,5/1,0/0,7/0,4/1,0), fapt reflectat elocvent în Figura 5.4.

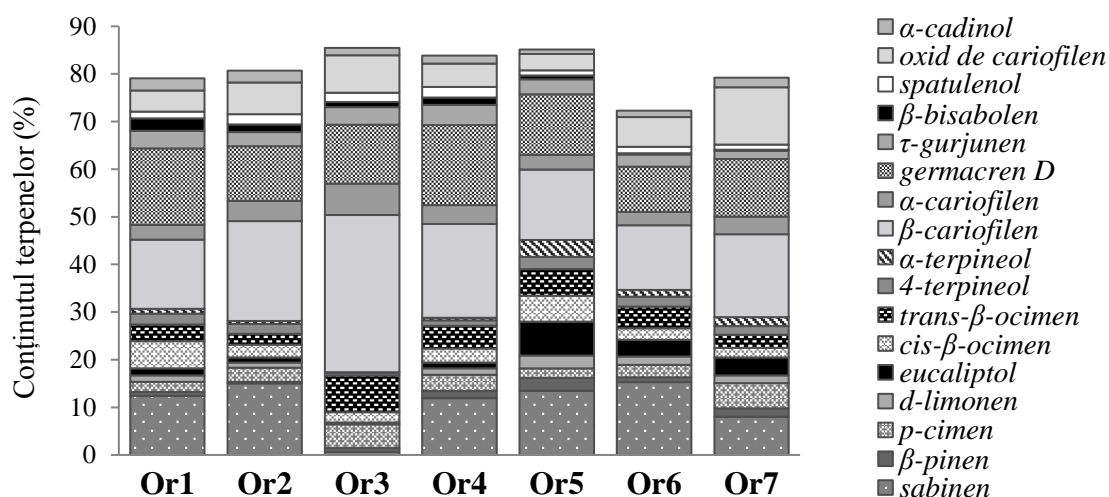


Fig. 5.4. Compuși terpenici în extractele vegetale de *O. vulgare* (concentrații $\geq 2\%$)

Notă: Or1-Or7 subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare*; compuși monoterprenici (*sabinen*, *β-pinen*, *β-mircen*, *p-cimen*, *d-limonen*, *eucaliptol*, *cis-β-ocimen*, *trans-β-ocimen*, *γ-terpinen*, *4-terpineol*, *α-terpineol*); compuși sesquiterpenici (*β-cariofilen*, *α-cariofilen*, *germacren D*, *τ-gurjunen*, *β-bisabolen*, *spatulenol*, *oxid de cariofilen*, *α-cadinol*).

În scopul relevării asocierilor cantitative dintre componenții uleiului volatil, identificării compușilor cu pondere procentuală mare atât la nivelul întregii populații, cât și al subpopulației, s-a recurs și în cazul acestui subiect de cercetare la metoda explorativă de analiză a datelor. Astfel, modelul teoretic generat de ACP pe matricea de covarianță a concentrației (%) celor 38 de compuși identificați în uleiul volatil la subpopulațiile studiate a indicat două componente principale, care explică 81% din varianța datelor inițiale (Figura 5.5, A, B, C). Au fost selectați 21 de compuși chimici care corelează cu componentele principale, 9 cu CP1, iar 12 cu CP2:

- corelații pozitive cu CP1: *α-tujen* ($r=0,94$), *β-cariofilen* ($r=0,98$), (+)-*epi-biciclosesquifelandren* ($r=0,71$), *α-cariofilen* ($r=0,98$);
- corelații negative cu CP1: *α-pinen* ($r=-0,80$), *sabinen* ($r=-0,92$), *β-mircen* ($r=-0,72$), *d-limonen* ($r=-0,78$), *4-terpineol* ($r=-0,89$);
- corelații pozitive cu CP2: *oxid de cariofilen* ($r=0,80$), *τ-murolol* ($r=0,89$), *dihydroedulan I* ($r=0,53$), *p-cimen* ($r=0,51$);
- corelații negative cu CP2: *α-terpinen* ($r=-0,86$), *cis-β-ocimen* ($r=-0,63$), *γ-terpinen* ($r=-0,90$), *germacren D* ($r=-0,79$), *τ-gurjunen* ($r=-0,92$), *β-bisabolen* ($r=-0,82$), *3-octanonă*

($r=-0,83$), 3-octanol ($r=-0,77$).

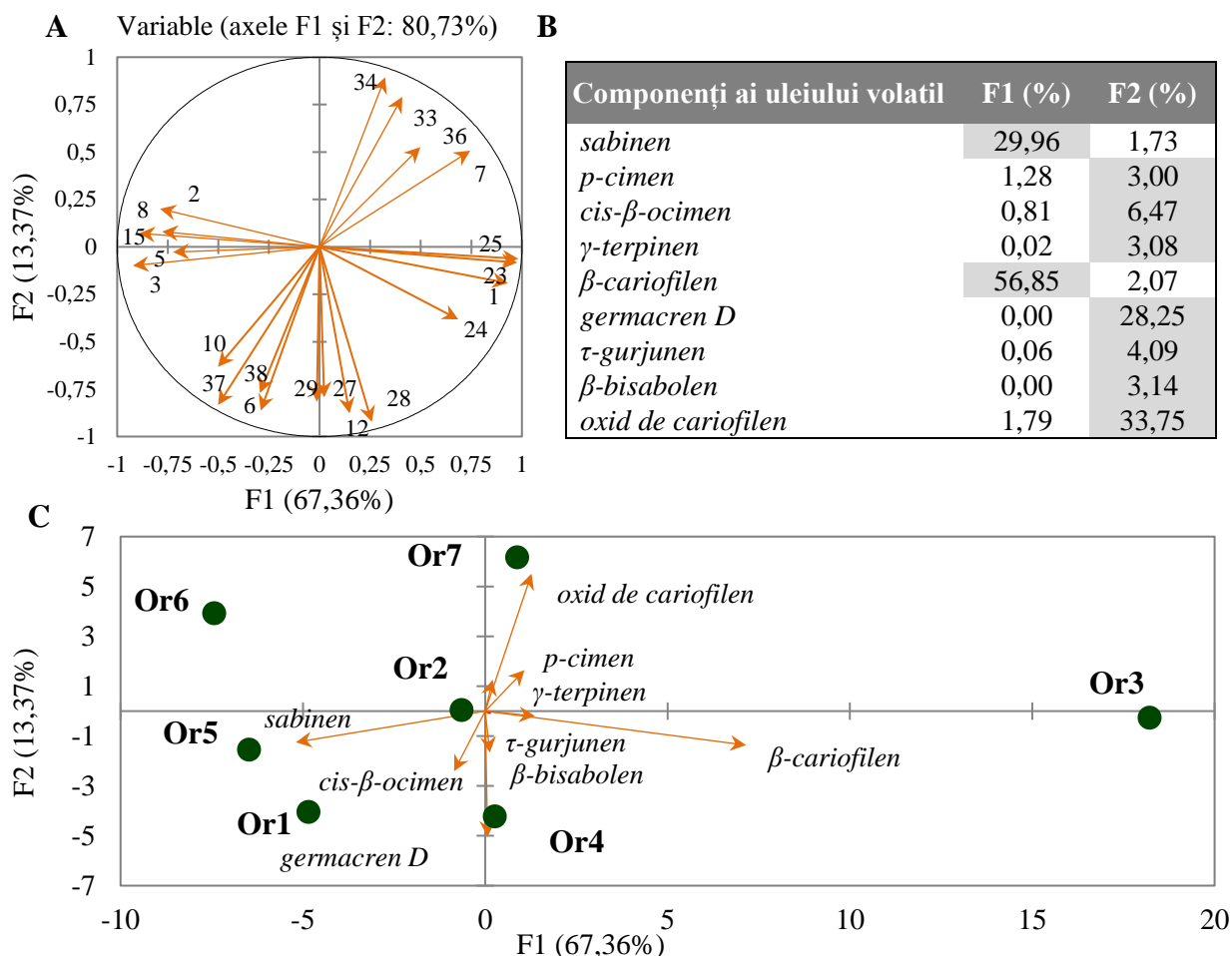


Fig. 5.5. Compuși terpenici cu contribuție procentuală mare în variabilitatea chimică a subpopulațiilor de *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Notă: **A** – reprezentarea grafică a variabilelor (compușilor) și corelațiile cu F1 și F2; **B** – lista compușilor care depășesc valoarea prag de 2,63; **C** – modelul ACP a variabilelor și subpopulațiilor. 1 – α -tujen; 2 – α -pinen; 3 – sabinen; 4 – β -pinen; 5 – β -mircen; 6 – α -terpinen; 7 – p-cimen; 8 – d-limonen; 9 – eucaliptol; 10 – cis- β -ocimen; 11 – trans- β -ocimen; 12 – γ -terpinen; 13 – linalol; 14 – isopinocamfonă; 15 – 4-terpineol; 16 – α -terpineol; 17 – lemonal; 18 – cis-geraniol; 19 – geraniol; 20 – geraniol acetat; 21 – β -burbonen; 22 – β -elemen; 23 – β -cariofilen; 24 – (+)-epi-biciclosesquifelandren; 25 – α -cariofilen; 26 – α -amorfen; 27 – germacren D; 28 – τ -gurjunen; 29 – β -bisabolen; 30 – δ -cadinen; 31 – elemol; 32 – spatulenol; 33 – oxid de cariofilen; 34 – τ -murolool; 35 – α -cadinol; 36 – dihidro-edulan I; 37 – 3-octanonă; 38 – 3-octanol.

Grupurile de variabile corelate pozitiv sau negativ, în cadrul unei CP pe care o formează, indică relația de dependență cantitativă între ele, caracteristică pentru întreaga populație.

Analiza contribuției componentelor chimici (%) a relevat 9 compuși (Figura 5.5, A, B) care caracterizează valoarea aromatică a uleiului de la cele 7 subpopulații studiate. Aceștia sunt: β -cariofilen (56,85%), oxid de cariofilen (33,8%), sabinen (29,96%), germacren D (28,25%), cis- β -ocimen (6,47%), τ -gurjunen (4,1%), β -bisabolen (3,14%), γ -terpinen (3,08%), p-cimen (3,00%) și poate fi considerată o **chemovarietate a uleiului volatil al populației din flora spontană a Republicii Moldova (rezervația Orheiul Vechi), care ar putea fi utilizat ca „marker” în**

autentificare. Compușii *β -cariofilen* ($r=0,98$) și *sabinen* ($r=-0,92$) sunt din grupul de asocieri corelative pe CP1, iar *oxidul de cariofilen* ($r=0,80$), *cis- β -ocimenul* ($r=-0,63$), *γ -terpinenul* ($r=-0,90$), *germacren D* ($r=-0,79$), *τ -gurjunenul* ($r=-0,92$) și *β -bisabolenu* ($r=-0,82$) – din grupul corelat cu CP2.

Din reprezentarea grafică (Figura 5.5, C) se poate concluda despre compușii care diferențiază subpopulațiile una de alta, reprezentând chemovarietatea acestora (valoare minimă a conținutului unui compus chimic – 4%).

În cele ce urmează sunt prezentate variații ale chemovarietății (succesiune descendentă a conținutului, %), care sugerează asemănarea după compoziția chimică a uleiului volatil al plantelor din subpopulațiile Or1, Or2, Or6 și Or5 și al celui extras din Or3, Or7, Or4:

Or1: *germacren D/ β -cariofilen/ sabinen/ cis- β -ocimen/ oxid de cariofilen;*

Or2: *β -cariofilen/ sabinen/ germacren D/ oxid de cariofilen;*

Or6: *β -cariofilen/ sabinen/ germacren D/ oxid de cariofilen;*

Or5: *β -cariofilen/ sabinen/ germacren D/ cis- β -ocimen;*

Or3: *β -cariofilen/ germacren D/ oxid de cariofilen/ p-cimen;*

Or7: *β -cariofilen/ germacren D/ oxid de cariofilen/ sabinen/ p-cimen;*

Or4: *β -cariofilen/ germacren D/ sabinen/ oxid de cariofilen/ τ -gurjunen.*

Constatăm că analiza ACP, completează grafic profilul biochimic al speciei *O. vulgare* prezentând o imagine mai clară a structurii fitochimice a populației în corelație cu factorii genetici și condițiile de creștere (structura solului, umiditatea, poziția pe versant etc.).

Acești șase compuși *β -cariofilen*, *germacren D*, *sabinen*, *oxid de cariofilen*, *cis- β -ocimen* și *p-cimen*, care se conțin în concentrații relativ mari în plantele din populația habitatului natural studiat, au fost incluși în analiza comparativă a profilului chimic al aceleiași specii, prelevate din flora spontană a diferitor regiuni geografice (date din literatură) pentru a identifica particularitățile distinctive pentru *O. vulgare* din flora spontană autohtonă.

Au fost utilizate valorile medii ale conținutului (%) compușilor chimici la nivelul întregii populații de plante, expuse grafic (Figura 5.6). Astfel, reieșind din conținuturile compușilor nominalizați, compoziția uleiului volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare* prelevată din habitatul natural al diferitor regiuni geografice: Italia [75, 112], Lituania [185, 186], Polonia [270], Turcia [57], Bulgaria [158] a relevat diferențe în conținut și structură.

În probele colectate din zona munților Rhodopa a Bulgariei (1100 m altitudine) s-au evidențiat prin concentrații ridicate *spatulenolul* (20,7%), *β -cariofilenul* (9,9%) și *oxidul de cariofilen* (5,7%), autorul studiilor prezentând-ul ca chemotip. Contrar acestor date, ponderea cantitativă a compusului sesquiterpenic – *spatulenol*, în plantele indigene autohtone este mult mai

mică: 1,09-2,23%.

Compoziții *β -ocimen*, *sabinen*, *germacren D* și *β -cariofilen*, identificați în plantele speciei *O. vulgare* din Republica Moldova, sunt prezenți și în cele colectate din opt localități ale Lituaniei, fiind considerate chemotip de *β -ocimen*. Însă, în uleiul esențial a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din Turcia (apropierea orașului Erzurum), *β -ocimenul* lipsește (Figura 5.6).

Cercetări fitochimice au fost efectuate și asupra ssp. *vulgare* din habitatul natural al Italiei. Plantele au fost colectate din regiunea Veneto (nord-estul Italiei) pentru a studia variabilitatea compoziției uleiului esențial în conformitate cu gradientul altitudinal (200-1509 m) [112]. Uleiul esențial obținut din plantele cu biotopul la 200 m altitudine (Colli Euganei, 200 m) conține compuși: (*Z*)- *β -ocimen* (6,6-19,0%), (*E*)- *β -ocimen* (10,4-17,5%), (*E*)-*cariofilen* (8,0-14,6%) și *germacren D* (11,1-20,7%), spre deosebire de cel extras din plantele de la o altitudine mult mai mare (Val Garés, 1509 m) descrisă cu un conținut ridicat de *γ -terpinen* (24,4-38,5%) și *carvacrol* (31,5-40,0%). Aceste cercetări sunt în concordanță cu datele obținute în cadrul lucrării de față, care au scos în evidență conținutul crescut de sesquiterpene, în special *β -cariofilen*, în uleiul volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare* prelevată de la o altitudine comparativ mică (74 m).

Datele descrise în lucrare sunt similare și cu cele prezentate de Nurzyńska-Wierdak (2012), care prin analizele GC-MS și GC-FID (cromatografie în fază gazoasă cu detector de ionizare în flacără) a uleiului volatil din plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare* cultivate în Polonia, au pus în evidență concentrații maxime la aceiași componenți chimici: *sabinen* (10,85-25,46%), *germacren D* (9,36-15,34%), *Z*-(*β*)-*ocimen* (9,10-16,33%) și *β -cariofilen* (9,38-12,87%) [199].

Studiul de sinteză privind cercetările plantelor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare*, provenite din diferite regiuni geografice și de la diferite altitudini, a confirmat faptul că subspecia care habitează în diferite condiții ecologice, chiar în același areal geografic, poate prezenta diferite chemovarietăți (chemotipuri) ale uleiului volatil. În același timp plantele sunt afectate de numeroși factori de stres combinați și pot schimba semnificativ compoziția lor biochimică. În cazul unui studiu recent s-a demonstrat o creștere a majorității SBA, cu excepția pigmentilor, în cazul plantelor de *O. vulgare* supuse la temperaturi relativ mici de creștere și în condiții de iradiere ușoară a luminii ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$) [252].

Comparativ cu plantele din subpopulațiile indigene, variabilitatea chimică a uleiului volatil între genotipuri este mai omogenă la cele din culturile experimentale. Astfel, analiza calitativă (GC și GC-MS) a uleiului esențial de la 6 genotipuri de *O. vulgare* ssp. *vulgare* provenite din culturi experimentale cultivate în cadrul IGFPP, a pus în evidență un număr similar de compuși la toate genotipurile studiate și o concentrație variabilă, dar nu în limite largi [117]. Au fost identificați 41 de componenți (VG-4), cu concentrații mari fiind: *germacren D* (17,01%), *β -*

cariofilen (13,05%), *carvacrol* (11,65%), *sabinen* (9,78%), *trans- β -ocimen* (9,38%), *cis- β -ocimen* (6,03%) și *γ -elemen* (4,10%).

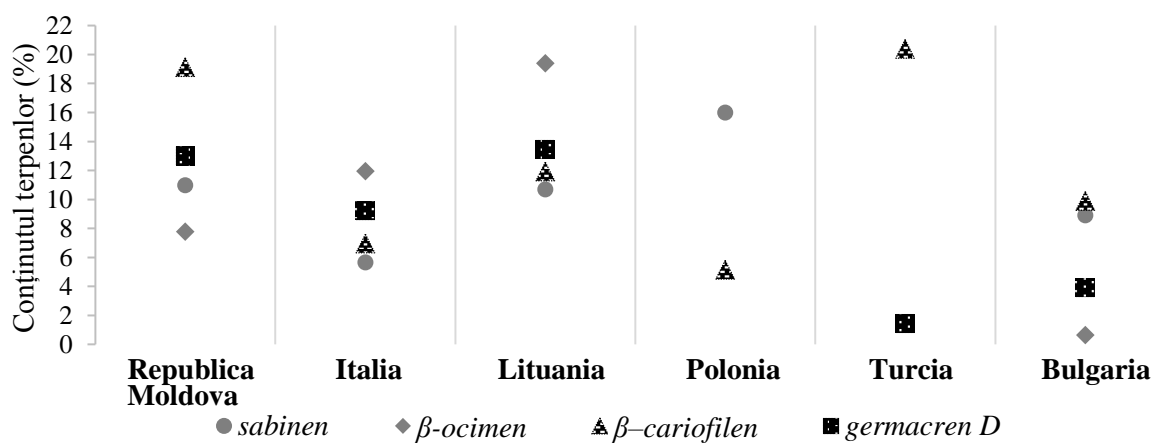


Fig. 5.6. Variația concentrației de sesquiterpene în extractele vegetale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* (flora spontană) în funcție de regiunea geografică

Particularitățile distinctive marcante ale uleiului volatil extras din plantele autohtone din flora spontană (rezervația Orheiul Vechi) față de cele din cultură este lipsa *carvacrolului*, concentrația variabilă, în unele cazuri mai mare de *β -cariofilen* (33,02%) și *sabinen* (15,31%).

Este important de menționat și datele unui studiu publicat cu un an mai târziu (2015), care a demonstrat la alte 5 genotipuri de *O. vulgare* ssp. *vulgare* (Ov 2,3,5,6,7), selectate tot din colecția IGFPP, o variabilitate comparativ mai mare, atât în numărul de componenți majoritari, cât și în concentrația acestora [115].

5.4. Concluzii la capitolul 5

În baza datelor obținute din investigațiile fitochimice a extractelor vegetale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* colectată din flora spontană a Republicii Moldova, pot fi emise următoarele concluzii:

1. Prin analiza cromatografică pe strat subțire a fost relevată prezența compușilor fenolici: acizi polifenolcarboxilici (*acid cafeic*, *acid clorogenic*, *acid rozmarinic*), flavonoidelor (*rutozida*, *luteolina*), triterpenelor (*β -sitosterolul*, *stigmasterolul*, *acidul oleanolic*, *acidul ursolic*) cunoscuți ca SBA cu multiple efecte terapeutice.

2. Ponderea acizilor polifenolcarboxilici în conținutul total al polifenolilor, care variază între 3-5 g/100 g s.u., constituie 63-69%. Plantele din subpopulațiile Or1 și Or6 se evidențiază prin conținutul în polifenoli totali cel mai mare, iar cele din Or3, Or4 și Or7 prezintă cu 25-40 % valori mai mici (3-3,7 g; $p < 0,05$) [18].

3. Cuantificarea acizilor polifenolcarboxilici prin HPLC (g echivalenți *acidul*

rozmarinic/100 g s.u.) a relevat valori maxime la Or6 și Or1 și mai mici, cu cca 18-47% – la subpopulațiile Or2, Or4 și Or7 [18].

4. Nivelul bioacumulării flavonoidelor prezintă diferențe în conținuturi între cele șapte subpopulații de circa 10-40%, de exemplu, 1,05 g la Or1 și 0,63 g/100 g s.u. la Or7 pentru *rutozidă* și în cazul *luteolinei*, 0,52 g la Or1 și 0,29 g/100 g s.u. la Or4 și Or7.

5. *Acidul rozmarinic* – component majoritar în fracția compușilor polifenolici are valori maxime de 1678,14±6,27 mg/ 100 g s.u. la Or6 și minime de 431,06±4,37 mg/ 100 g s.u. la Or4 (de 4 ori mai mici). În baza conținutului *acidului rozmarinic* se conturează următorul clasament a subpopulațiilor: Or4 < Or7 < Or5 < Or3 < Or2 < Or1 < Or6.

6. Analiza prin GC-SM a evidențiat în total 38 de compuși ai metabolismului secundar: 20 de monoterpene și 15 sesquiterpene, un compus din clasa norisoprenoizilor (*dihidro-edulan I*) și 2 compuși alifatici (*3-octanonă*, *3-octanol*) cu valori mai mici de 1%.

7. Sesquiterpenele au valori cantitative mai mari față de cele ale monoterpenelor. Cele mai mari diferențe între aceste 2 clase de compuși (MT/ST) sunt identificate la subpopulațiile: Or3 (de cca 70%), Or7, Or4 și Or2 (23-26%).

8. Nouă componenți: *β-cariofilen*, *oxid de cariofilen*, *sabinen*, *germacren D*, *cis-β-ocimen*, *τ-gurjunen*, *β-bisabolen*, *γ-terpinen*, *p-cimen* caracterizează valoarea aromatică a uleiului studiat și poate fi considerată o chemovarietate a uleiului esențial a populației din flora spontană a Republicii Moldova (rezervația Orheiul Vechi), ce ar putea fi utilizat ca „marker” în autentificare.

9. Modelul teoretic generat de ACP pe matricea de covarianță a concentrației (%) celor 38 de compuși din uleiul volatil a identificat relația de dependență cantitativă între variabile, caracteristică întregii populații de plante:

- *α-tujen* (r=0,94), *β-cariofilen* (r=0,98), (+)-*epi-biciclosesquifelandren* (r=0,71), *α-cariofilen* (r=0,98); *α-pinen* (r=-0,80), *sabinen* (r=-0,92), *β-mircen* (r=-0,72), *d-limonen* (r=-0,78), *4-terpineol* (r=-0,89);
- *oxid de cariofilen* (r=0,80), *τ-murolol* (r=0,89), *dihidro-edulan I* (r=0,53), *p-cimen* (r=0,51); *α-terpinen* (r=-0,86), *cis-β-ocimen* (r=-0,63), *γ-terpinen* (r=-0,90), *germacren D* (r=-0,79), *τ-gurjunen* (r=-0,92), *β-bisabolen* (r=-0,82), *3-octanonă* (r=-0,83), *3-octanol* (r=-0,77).

10. Compușii majoritari din probele de ulei volatil studiate prezintă variabilitate cantitativă la nivel intrapopulațional: *β-cariofilen* (14-33%), *germacren D* (9-17%), *sabinen* (1-15%) *oxidul de cariofilen* (3-12%), *β-ocimen* (*cis-* și *trans-*) (2-8%), *p-cimen* (2-5%), *τ-gurjunen* (2-4%), *β-bisabolen* (0,3-3%), *γ-terpinen* (0,3-2%).

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

Particularitatea distinctivă a uleiului volatil extras din plantele autohtone, indigene (rezervația Orheiul Vechi) constă în variabilitatea biochimică intrapopulațională determinată de cantități moderate de monoterpene (21-51%) și mari – de sesquiterpene (42-73%). Este important de menționat, pe de o parte, lipsa *carvacrolului* și *timolului*, iar pe de alta, prezența în cantități semnificative a precursorilor biosintetici și alți compuși, asociați căii metabolice de sinteză a acestora.

Diversitatea biochimică a metaboliților secundari în plante, în particular a compușilor terpenici (mai mult de 60 000 de reprezentanți) [66, 278] este rezultatul a numeroși factori intrinseci și extrinseci, precum variabilitatea genică, conexiunile dintre diferite sisteme fiziologice și biochimice de reglare [72, 84, 131], condițiile de creștere, componente abiotice etc.

La nivel biochimic, terpen-sintetazele sunt responsabile de sinteza unui număr mare de terpene, în prezența substratului generat prin două căi metabolice: dependentă de mevalonat (MVA), localizată în citozol, prin care are loc formarea sesquiterpenelor (C15) și 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP- *2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate*), activă în plastide, rezultând hemiterpene (C5), mono- (C10) și diterpene (C20).

Realizările recente în caracterizarea genelor și a enzimelor implicate în biosinteza substratului și a produsului final, au demonstrat existența unui număr de enzime terpen-sintetaze (TPS) funcționale pe mai multe substraturi (multi-substrat) [208]. Această proprietate a enzimelor poate determina o varietate largă de profile chimice a compușilor terpenici, asociate reacției adaptive a organismului atât în anumite etape de dezvoltare, cât și în diverse situații de stres biotic sau abiotic.

În contextul informației existente în literatură și a datelor analizate în prezenta lucrare cu referire la variabilitatea biochimică a terpenelor la plantele populației naturale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* au fost trasate următoarele obiective:

- analiza informației privind terpen-sintetazele în băncile de gene;
- cuantificarea nivelului de transcripti a genelor monoterpene-sintetaze (*Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5*, *Ovtps7*);
- cuantificarea nivelului de transcripti a genelor sesquiterpene-sintetaze (*Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps6*).

6.1. Analiza terpen-sintetazelor în băncile de gene

Analiza informației privind genele, care codifică proteinele cu rol funcțional în biosinteza metaboliților secundari în plante, în literatura de specialitate și în bazele de date genomice NCBI: EST, UniGene, Gene, Nucleotide [289] a relevat că terpen-sintetazele (*TPS*) reprezintă familii de gene, rezultate din duplicări, mutații și alte divergențe funcționale [256].

Progresele recente obținute în rezultatul clonării unor gene *TPS*, a investigațiilor transcriptomice prin utilizarea sistemelor heteroloage, au permis cercetătorilor stabilirea și caracterizarea funcției enzimelor codificate de acestea, precum și mecanisme de reglare a genelor implicate în căile de biosinteză a terpenelor atât în angiosperme, cât și în gimnosperme [64, 84, 146, 173, 208].

Un număr semnificativ de gene *TPS*, prezente în genomul plantelor, sunt localizate în tandem câte două, trei sau mai multe gene omoloage (uneori separate, una sau mai multe gene independente). În plantele de *Arabidopsis*, orez, plop, viță de vie și sorg, cca 42-85% din genele *TPS* formează astfel de rețele în tandem. Această modalitate de aranjare a genelor se presupune a fi o consecință a duplicării în rezultatul *crossing-over*-ului inegal [63] și are un rol important în reglarea genică a metabolismului terpenic în funcție de factorii de creștere și cei ecologici.

Actualmente, la specia *O. vulgare* este secvențiat doar genomul cloroplastic [165], iar în ceea ce privește structura și funcția genelor nucleare, în majoritatea cazurilor, este investigată prin identificarea gradului de omologie cu genele descrise la plantele cu genomul cunoscut. În baza de date NCBI sunt accesibile secvențe genice transcrise (*EST*-uri) cu funcția de candidat de terpen-sintetaze, identificate de Crocoll C. și echipa sa de cercetare (2010) la două varietăți/cultivare de *O. vulgare* (d06-01 și f02-04).

Astfel, în rezultatul analizei *EST*-urilor, identificate la această specie, prin programul bioinformatic BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), au fost puse în evidență 7 secvențe de ARNm cu grad diferit de similaritate (50-99%, scorul BLAST > 100) cu secvențele altor gene ce codifică terpen-sintetaze (Tabelul 6.1).

Transcripții (ADNc) *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5* și *Ovtps7* prezintă omologie cu *alfa-terpineol* (*Ovtps1* – 82%), *gamma-terpinen-sintetaza* (*Ovtps2* – 94%) din *Thymus*, *terpen-sintetaza* (*Ovtps1* – 67%) din *Salvia officinalis*, *linalol-sintetaza* (*Ovtps7* – 64%), *geraniol synthase* (*Ovtps5* – 71%) din *Perilla setoyensis* etc.

Secvențele genice *Ovtps3*, *Ovtps4* și *Ovtps6* au prezentat, de asemenea, similaritate față de sesquiterpen-sintetazele altor *Lamiaceae*, incluzând: *beta-cariofilen-sintetaza* (*Ovtps3* – 61%), *germacren D-sintetaza* (*Ovtps4* – 64%) din *Lavandula angustifolia*, *beta-cariofilen-sintetaza* (*Ovtps6* – 67%) din *Ocimum* etc. (Tabelul 6.1).

Tabelul 6.1. EST-uri de interes și gradul de similaritate al acestora cu alte secvențe genice

<i>EST</i> (denumire/ nr. de acces GenBank)	Secvențe similare (denumire/ nr. de acces NCBI)	Specia	Scor total	Blastx acoperire (%)	Similaritate (%)
<i>Ovtps1/</i> GU385980.1	terpene synthase 6	<i>Thymus vulgaris</i>	984	99	87
	alpha-terpineol	<i>Thymus caespititius</i>	934	99	82
	terpene synthase	<i>Salvia officinalis</i>	650	81	67
<i>Ovtps2/</i> GU385978.1	putative gamma-terpinene synthase	<i>Origanum syriacum</i>	1070	94	99
	putative monoterpene synthase	<i>Origanum majorana</i>	1129	98	99
	gamma-terpinene synthase	<i>Thymus caespititius</i>	1075	99	94
<i>Ovtps3/</i> GU385975.1	B-caryophyllene synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	596	97	61
	(-)-germacrene D synthase	<i>Salvia officinalis</i>	575	88	58
	beta-caryophyllene synthase	<i>Ocimum kilimandscharicum</i>	618	97	58
<i>Ovtps4/</i> GU385974.1	germacrene-D synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	713	99	64
	terpene synthase 4	<i>Origanum onites</i>	407	37	95
	B-caryophyllene synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	531	95	56
<i>Ovtps5/</i> GU385971	pinene synthase	<i>Salvia rosmarinus</i>	783	97	74
	geraniol synthase	<i>Perilla setoyensis</i>	772	98	71
	terpene synthase 7	<i>Thymus vulgaris</i>	731	96	69
<i>Ovtps6/</i> GU385970.1	(-)-germacrene D synthase	<i>Salvia officinalis</i>	689	91	73
	B-caryophyllene synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	699	98	67
	beta-caryophyllene synthase	<i>Ocimum kilimandscharicum</i>	678	98	67
<i>Ovtps7/</i> GU385967.1	monoterpene synthase	<i>Thymus caespititius</i>	939	99	80
	terpene synthase 5	<i>Thymus vulgaris</i>	939	99	79
	linalool synthase	<i>Perilla setoyensis</i>	682	92	64

Metabolismul compușilor terpenici este reglat la nivel molecular, prin codificarea și coordonarea activității enzimelor ce catalizează reacțiile de sinteză și catabolism ale acestora.

În Figura 6.1 este rezumată o prezentare schematică a formării terpenoidelor catalizată de diferite tipuri de sintetaze terpenice. Astfel, *izopentenil difosfatul* (IPP), produs în citozol (calea MVA), sau în plastide (calea MEP) este precursorul comun al tuturor terpenelor.

Prin reacții de izomerizare IPP se generează *dimetilalil pirofosfatul* (DMAPP), care servește în calitate de substrat pentru biosinteza hemiterpenelor sau prin fuzionare cu o unitate IPP formează *geranil difosfatul* (GPP). Condensarea unei molecule de GPP cu o moleculă IPP rezultă *farnesil difosfatul* (FPP), care prin condensarea cu o altă moleculă de IPP formează *geranilgeranil difosfatul* (GGPP). GPP, FPP și GGPP reprezintă precursori ai monoterenelor, sesquiterpenelor și respectiv a diterpenelor. Deși acești compuși de *izopentenil pirofosfați* în configurație *trans* se consideră substraturi naturale, omniprezente pentru terpen-sintetaze, studii recente au demonstrat că două molecule de *izopentenil pirofosfat* în configurație *cis* (*neryl difosfat* – NPP și *Z,Z-FPP*) servesc, de asemenea, în calitate de substraturi naturale pentru aceste enzime.

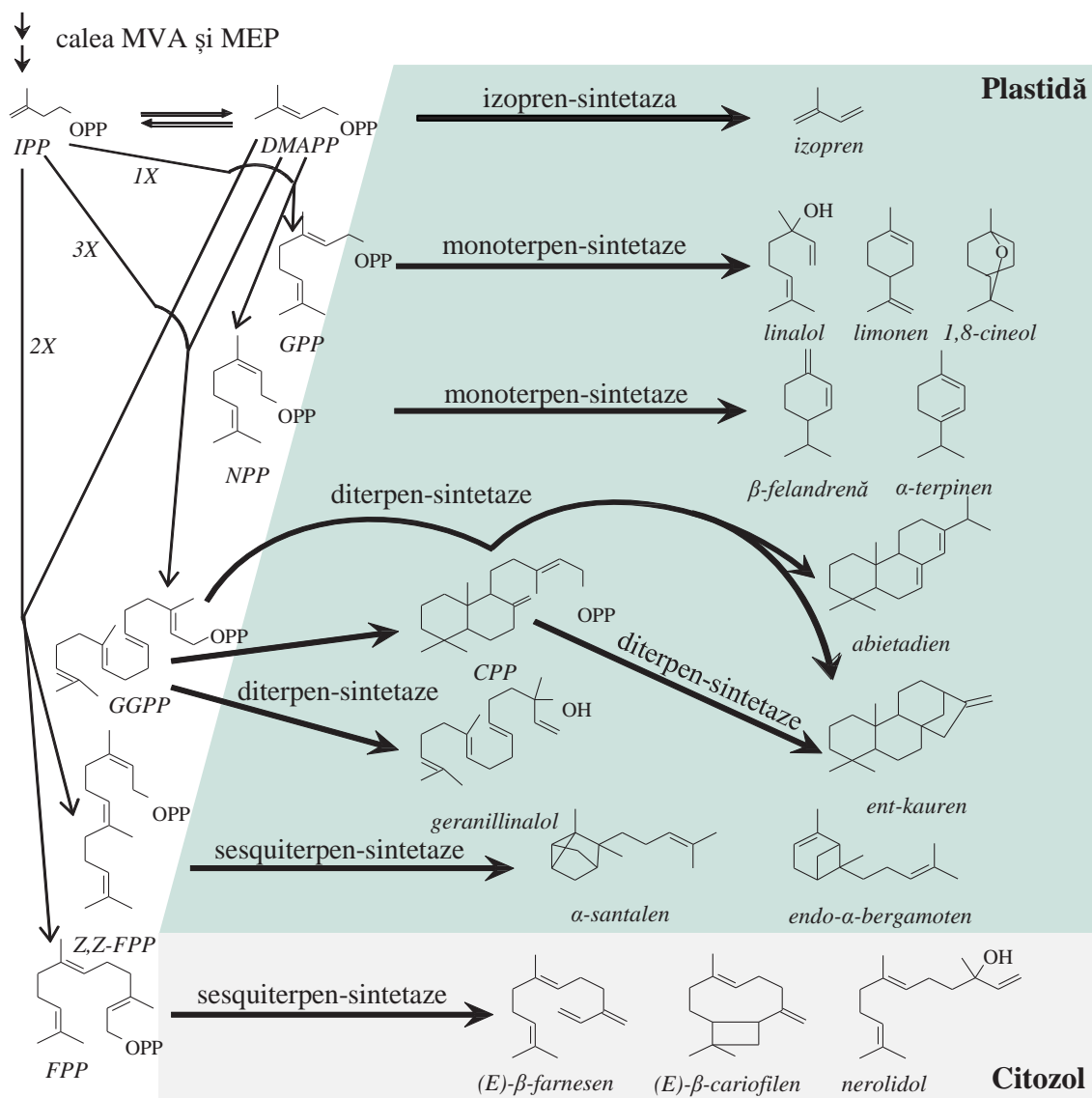


Fig. 6.1. Căile metabolice de formare a compușilor terpenici și sintetazele implicate în proces (după Chen F., 2011)

Notă: MVA – calea mevalonat; MEP – calea 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat; IPP – izopentenil difosfat; DMAPP – dimetilalil pirofosfat; GPP – geranil difosfat; FPP – farnesil difosfat; GGPP – geranilgeranil difosfat; NPP – neril difosfat; CPP – copalil difosfat.

Izopren-sintetaza, monoterpen-, sesquiterpen- și diterpen-sintetazele transformă DMAPP, GPP (sau NPP), FPP (sau Z, Z-FPP) și GGPP în izopren, monoterpene, sesquiterpene și respectiv diterpene. Sunt două grupuri de diterpen-sintetaze: bifuncționale și monofuncționale. Cele bifuncționale catalizează conversia consecutivă a GGPP în *copalil difosfat* (CPP) și ulterior în diterpeni stabili. Diterpen-sintetazele monofuncționale pot cataliza formarea diterpenelor din CPP sau direct din GGPP. Se consideră că biosinteza izoprenului, monoterpenei și diterpenelor are loc în plastide, iar a sesquiterpenelor – în citozol. Cu toate acestea, există dovezi că între plastide și citozol există un schimb de produse terpenice intermediare indicând asupra faptului că cele două

căi nu sunt complet independente [63, 64].

Este important de menționat și faptul că variabilitatea fitochimică a compușilor terpenici este în funcție de tipul de enzimă activă, cu specificitate ridicată sau redusă pentru produsul final. Deși enzimele cu specificitate largă a substratului pot scinda substraturi multiple, afinitatea pentru acestea variază prin ratele de reacție chimică [256].

Toate aceste caracteristici biochimice cu nivele complexe de reglare genică și fiziologică fac posibilă adaptarea PMA în diferite condiții ecologice, prin sinteza unui set variat de terpenoizi necesari în interacțiunea cu mediul biotic și abiotic, oferindu-le un avantaj selectiv [84]. Rolul terpenelor de compuși activi în aspect fiziologic și ecologic este determinat de funcțiile specializate în rezistența plantelor la atacul microorganismelor, insectelor, animalelor erbivore sau în calitate de atractanți pentru polenizatori, spre deosebire de compușii terpenici cu funcții primare în fotosinteză (carotenoizi, clorofile, plastochinone), respirație (ubichinona), creștere și dezvoltare (citochinine, steroli, brasinosteroidi, gibereline, acid abscizic).

Ameliorarea speciilor de PMA orientată pe anumite chemotipuri de valoare economică, determină deseori dezechilibre cantitative și calitative în metabolismul specializat al plantelor cu interferențe în potențialul de rezistență fiziologică a plantei. Din aceste considerente, o semnificație aparte în cercetările axate pe ameliorarea biotehnologică a culturilor de PMA trebuie să revină investigațiilor moleculare și fiziologice a genelor *TPS* și enzimelor specifice, realizate în mediul natural al plantelor care produc aceste terpene.

Astfel, pentru analiza activității de transcripție a genelor monoterpen-sintetaze și sesquiterpen-sintetaze, în flori și în frunze, la plantele speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană autohtonă, au fost utilizate secvențele ARNm identificate de Crocoll C. (2010), pentru elaborarea primerilor specifici [72].

6.2. Activitatea transcripțională a monoterpen-sintetazelor

Analiza nivelului de expresie a monoterpen-sintetazelor a fost realizată prin cuantificarea transcripțiilor *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5* și *Ovtps7*.

Terpene synthase 1 (TPS1): GU385980, cu o lungime a secvenței ARNm de 1806 pb, codifică proteina cu aceeași denumire „terpene synthase 1” de 601 de aminoacizi [*Origanum vulgare*, GenBank: ADK73623.1].

Această enzimă este implicată în procesul de transformare a substratului GPP în monoterpene ca: *sabinen* și *β -felandrenă* în cantități majore și mici de *mircen*, *γ -terpinen*, *α -tujen* și *α -pinen* [72].

Conținutul transcripțiilor *Ovtps1* analizat în frunze și în flori indică valori diferite la plantele

din fiecare subpopulație. Valorile minime și maxime ale transcriptului analizat în frunze variază de la 0,11 u.c. (Or3), care este de 16 ori mai mic comparativ cu nivelul de 1,75 u.c. (Or5). În flori, făcând abstracție de valorile foarte mici identificate la Or7 (0,02 u.c.), intervalul de valori cantitative este cuprins între valoarea minimă – 0,72 u.c. (Or6) și cea maximă – 2,76 u.c. (Or1). Diferența între valorile înregistrate în flori și frunze este de 2-6 ori mai mică în frunze (Figura 6.2).

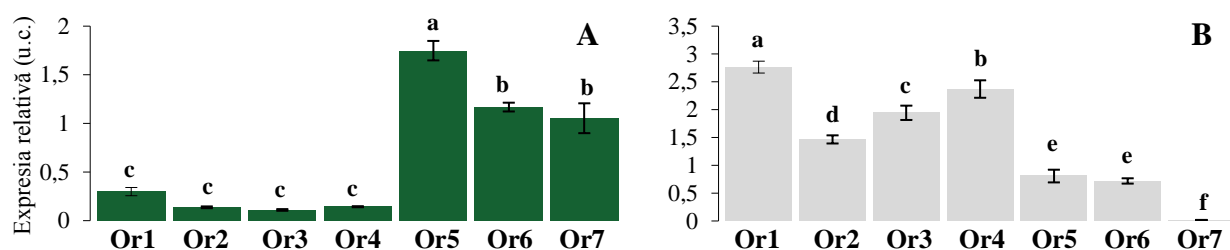


Fig. 6.2. Activitatea transcripțională a genei *Ovtps1* (GU385980) în frunze (A) și flori (B)
Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei±abaterea standard (n=3); analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

În dependență de țesutul analizat se observă discriminarea subpopulațiilor Or1, Or2, Or3, Or4 față de Or5, Or6, Or7, primele având cantități mici în frunze și mari în flori, pe când ultimele trei subpopulații din contra, valori mari în frunze și mici în flori.

Subpopulația Or5 se evidențiază statistic ($p < 0,05$) față de toate subpopulațiile, prin nivelul cel mai mare al ARNm *Ovtps1* în frunze. Subpopulațiile Or6 și Or7 au valori similare ale cantităților de transcript (1,17 u.c. respectiv 1,05 u.c.), mai mici comparativ cu cele înregistrate la Or1, Or2, Or3 și Or4, fără diferențe semnificative între ele ($p < 0,05$).

Activitatea acestei gene în flori, spre deosebire de frunze, are valori mai mari, cuprinse în intervalul de valori 1,47 - 2,76 u.c. la Or1, Or2, Or3, Or4, care diferă între ele semnificativ statistic ($p < 0,05$) și mici la Or5, Or6, Or7 (interval de 0,02-0,81 u.c.).

Terpene synthase 2 (TPS2): GU385978.1, lungimea secvenței ARNm este de 1785 pb, codifică proteina cu denumirea „terpene synthase 2” de 594 de aminoacizi [*Origanum vulgare*, GenBank: ADK73621.1]. *Ovtps2* este o monoterpen-sintetază care catalizează biosinteza γ -terpinenului din substratul GPP, inclusiv și a altor compuși ca: α -tujen, α -terpinen, mircen, sabinen, (+)-*R*-limonen, α -pinen și α -felandrenă [255]. A fost constatat, de asemenea, că este implicată și în biosinteza unor cantități minore de *p*-cimen și β -pinen. Monoterpena γ -terpinen este considerată precursor al timolului [72].

Spre deosebire de *Ovtps1*, activitatea de expresie *Ovtps2* a prezentat valori mai mici în frunze de la 0,001 u.c. (Or1) până la 0,018 u.c. (Or7). Subpopulațiile Or6 și Or7 se caracterizează prin nivelul cel mai mare (0,014 u.c. respectiv 0,018 u.c.) al transcripturilor *Ovtps2* ($p < 0,05$), în frunze, față de toate subpopulațiile. Nu au fost depistați transcripturi în frunzele plantelor din

subpopulația Or5. Cantități mai mari de ARNm *Ovtps2* au fost înregistrate în flori. Subpopulația Or3 se diferențiază prin conținutul de 0,18 u.c. față de celelalte 6, la care au fost constatate valori foarte mici (0,001-0,018 u.c.) cu diferențe între ele ne semnificative statistic (Figura 6.3, A, B).

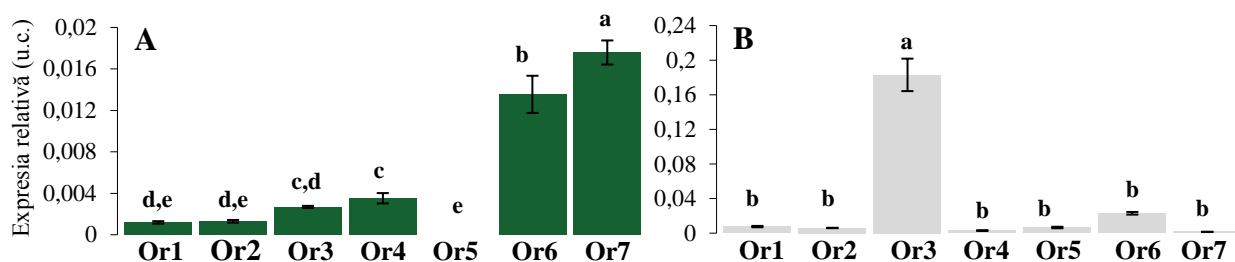


Fig. 6.3. Activitatea transcripțională a genei *Ovtps2* (GU385978) în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei \pm abaterea standard (n=3); analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

Studii recente pe sisteme de modelare a stresului hidric, au demonstrat o creștere semnificativă a activității genei *Ovtps2* sub acțiunea factorului stresogen, comparativ cu condițiile normale (martor) [187].

Terpene synthase 5 (TPS5): GU385971.1, lungimea secvenței ARNm este de 1662 pb, codifică proteina cu denumirea „terpene synthase 5” de 553 de aminoacizi [*Origanum vulgare*, GenBank: ADK73617.1].

Gena *Ovtps5* în literatura de specialitate este descrisă ca fiind o sesquiterpen-sintetază cu grad înalt de asemănare în structura secvenței nucleotidice cu cea a monoterpen-sintetazelor [72]. Producții de reacție a enzimei codificată de *Ovtps5* sunt terpenele complexe/ *sabinen/ γ -terpinen*. *Ovtps5*, spre deosebire de primele două terpen-sintetaze analizate, nu se deosebește esențial după nivelul cantitativ al transcripțiilor în frunze și în flori, în ambele organe fiind identificate conținuturi cu același rang de valori medii, cu maxime până la 0,12 u.c. (Figura 6.4, A, B).

Analiza statistică a datelor ce indică activitatea transcripțională a genei în frunze, a relevat nivelul cel mai mare (0,103 u.c.) al activității la subpopulația Or5, fapt care o diferențiază semnificativ ($p < 0,05$) față de celelalte subpopulații. Cele mai mici conținuturi (0,009-0,014 u.c.) s-au determinat la Or1, Or3 și Or7, cu diferențe statistic ne semnificative între ele. Plantele subpopulațiilor Or2 și Or6 sunt similare după conținutul transcripțiilor *Ovtps5* și au valori semnificativ mai mari (0,049 respectiv, 0,053 u.c., $p < 0,05$) comparativ cu cele înregistrate la plantele subpopulației Or4 (0,029 u.c.).

Analiza statistică a datelor privind activitatea transcripțională a genei în flori a relevat aproximativ un profil similar al nivelului de expresie relativă identificat în frunze: Or5 cu cele mai înalte valori (0,123 u.c., $p < 0,05$) a nivelului de expresie a transcriptului *Ovtps5*, urmat de Or2, Or3, Or6 și Or7 (0,088-0,101 u.c.) cu diferențe ne semnificative între ele. Subpopulațiile Or4 și

Or1, au înregistrat cele mai mici valori față de toate subpopulațiile, 0,044 u.c. ($p < 0,05$) și 0,006 u.c. ($p < 0,05$) respectiv (Figura 6.4, B).

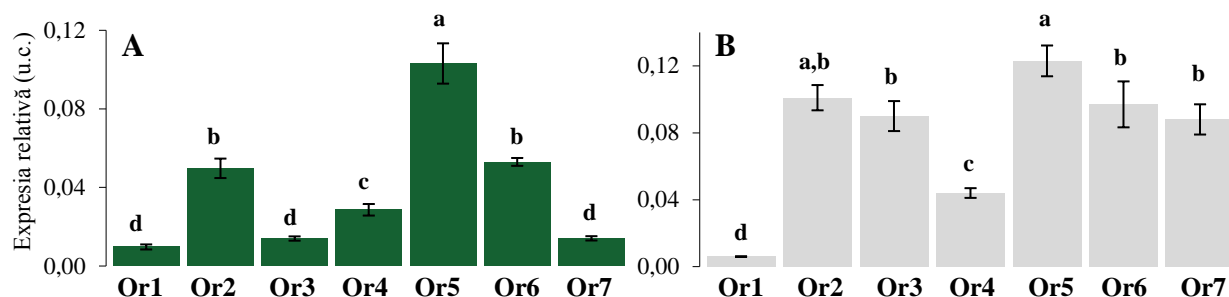


Fig. 6.4. Activitatea transcripțională a genei *Ovtps5* (GU385971) în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei \pm abaterea standard ($n=3$); analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

Terpene synthase 7 (TPS7): GU385967, lungimea secvenței ARNm este de 1788 pb, codifică proteina cu denumirea „terpene synthase 7” de 595 de aminoacizi [*Origanum vulgare*, GenBank: ADK73614.1].

Enzima OvTPS7 în prezență de GPP sintetizează *trans*- β -ocimen și cantități mici de *cis*- β -ocimen, *mircen*, α - și γ -terpinen. Conform unor autori, enzimele OvTPS1, OvTPS2 și OvTPS7 sunt active pe substratul de GPP generând monoterpene și nu formează nici-un produs sesquiterpen din substratul FPP [72].

Nivelul transcripților în frunze pentru *Ovtps7* este heterogen și poate fi divizat în trei grupuri de valori: Or6 care are cele mai mari valori – 1,57 u.c. ($p < 0,05$); Or1 și Or5 cu valori mai mici de 0,34 u.c., respectiv 0,47 u.c.; Or2, Or3, Or4 și Or7 variază de la 0,004 u.c. până la 0,12 u.c. Cu excepția subpopulației Or6, celelalte subpopulații nu ating nivelul de 0,60 u.c. al expresiei relative (Figura 6.5, A).

În flori (Figura 6.5, B), valorile medii ale conținutului transcripților studiați sunt mai omogene în cadrul populației, fiind superioare nivelului de 0,60 u.c. la 5 subpopulații (Or1, Or3, Or4, Or5 și Or6).

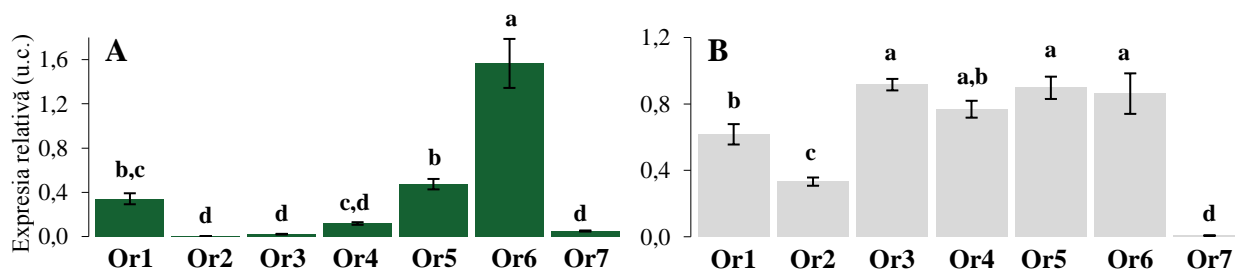


Fig. 6.5. Activitatea transcripțională a genei *Ovtps7* (GU385967) în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei \pm abaterea standard ($n=3$); analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

Cele mai mici valori sunt înregistrate la Or7 (0,01 u.c.). Subpopulațiile Or3, Or5 și Or6 s-au remarcat prin conținuturi ARNm al *Ovtps7* similare, cuprinse între 0,86-0,92 u.c.

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 și al similarității de secvență înaltă cu omologi de la alte specii de plante. Chiar dacă aceste enzime formează și monoterpene având în calitate de substrat GPP, secvența nucleotidică are un grad mare de similaritate cu alte sesquiterpen-sintetaze, sugerând faptul că acestea sunt funcționale în plantă ca sesquiterpen-sintetaze [72].

Terpene synthase 3 (TPS3): GU385976, lungimea secvenței ARNm este de 1692 pb, codifică o proteină de 563 de aminoacizi cu denumirea de „terpene synthase 3” [*Origanum vulgare*, GenBank: ADK73619].

În rezultatul unor studii de expresie pe sisteme bacteriene s-a constatat activitatea enzimei OvTPS3 sporită, în prezența substratului FPP, rezultând biosinteza de compuși (-)-*germacren D* și *biciclo-germacren* și redusă, în prezența substratului GPP, catalizând sinteza unor cantități moderate de *mircen*, *limonen*, *terpinolen* și *linalol* [72].

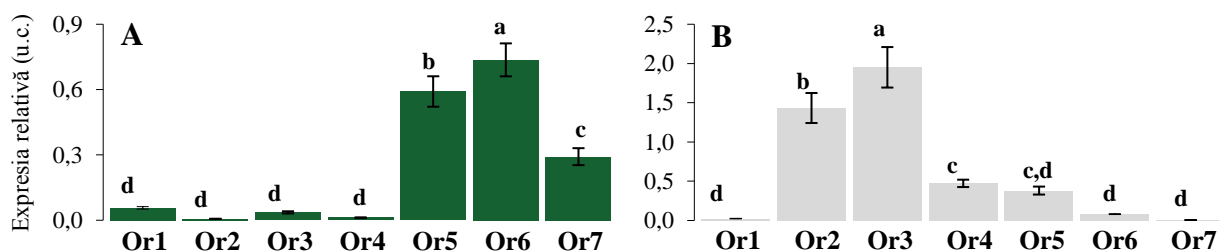


Fig. 6.6. Activitatea transcripțională a genei *Ovtps3* (GU385976) în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei±abaterea standard (n=3); analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

Activitatea transcripțională a genei în frunze (Figura 6.6, A) prezintă nivelul cel mai mare ($p < 0,05$) al transcripțiilor la subpopulațiile Or6 (0,74 u.c.), Or5 (0,59 u.c.) și Or7 (0,29 u.c.). Subpopulațiile Or1, Or2, Or3, Or4 prezintă cantități de ARNm mai mici (0,01 u.c.-0,04 u.c.), fără diferențe statistic semnificative între ele.

Contrar datelor obținute pentru frunze, în cazul conținutului de transcripți obținut în flori (Figura 6.6, B) sunt evidențiate subpopulațiile Or2 și Or3 cu cel mai mare nivel al transcripțiilor (1,43 u.c. respectiv, 1,95 u.c.) și diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$) față de toate subpopulațiile. Or4 și Or5 au conținuturi de 0,47 u.c. și 0,38 u.c. iar în plantele subpopulațiilor

Or1, Or6 și Or7 s-au identificat valori de 0,02 u.c., 0,08 u.c. și 0,01 u.c.

Terpene synthase 4-like (TPS4): GU385974, lungimea secvenței ARNm este de 1669 pb, prezintă similaritate (scor 2632/2632, E=0,0%, acoperire 100%, omologie 95%) cu *Origanum vulgare* cultivar f0204 „terpene synthase 4” (TPS4) ce codifică o proteină de 555 de aminoacizi cu denumirea „terpene synthase 4” [*Origanum vulgare*, GenBank:ADK73618].

Produsele reacției catalizate de enzima OvTPS4 pe substrat FPP sunt *aloaromadendren* și *biciclo-germacren*. Pe substrat GPP, OvTPS4 generează produse ca: *terpinolen*, *limonen*, *geraniol* și conținuturi mici de *mircen*, *α-terpineol*, *cis-β-ocimen*, *trans-β-ocimen* și *γ-terpinen* [72].

Nivelul transcripților în frunze pentru *Ovtps4* variază de la 0,02 u.c. (Or2) până la 3,85 u.c. (Or5), iar în flori, conținutul este în medie mai mic, cuprins între valorile 0,02 u.c. (Or7) și 1,34 u.c. (Or1). Analiza statistică a datelor ce indică activitatea de expresie a genei în frunze a scos în evidență subpopulațiile Or5, Or6 și Or7 cu nivelul cel mai mare al transcripților. Subpopulațiile Or5 și Or6 au valori similare ($p > 0,05$) în conținutul de transcripți. Or2, Or3 și Or4 au valorile cele mai mici (0,02 u.c.-0,13 u.c.) ale conținutului de ARNm cu diferențe statistic ne semnificative între ele (Figura 6.7, A).

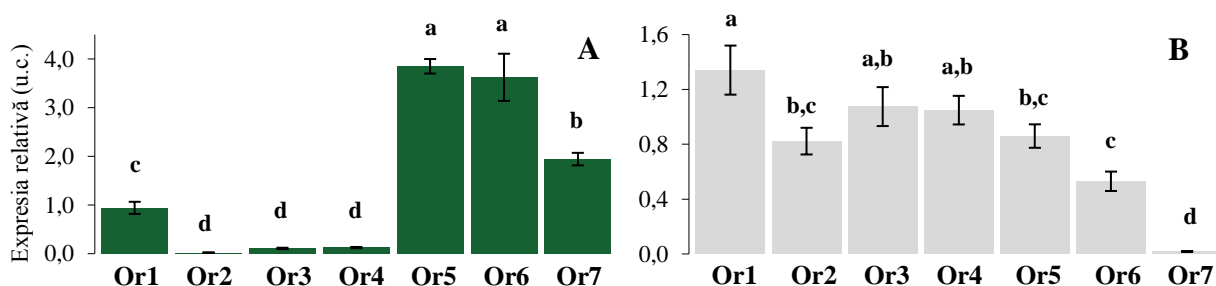


Fig. 6.7. Activitatea transcripțională a genei *Ovtps4* (GU385974) în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei ± abaterea standard (n=3); analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

În flori (Figura 6.7, B), după activitatea transcripțională a genei, s-a evidențiat subpopulația Or7 care se caracterizează prin cel mai mic conținut al transcripților, diferit statistic ($p < 0,05$), față de toate subpopulațiile. Subpopulațiile cu valori mai înalte sunt Or1 urmată de Or3 cu Or4 (1,05 u.c.-1,34 u.c.) și Or2 cu Or5 (0,82 u.c. respectiv 0,86 u.c.).

Terpene synthase 6 (TPS6): GU385970, lungimea secvenței ARNm este de 1665 pb, codifică o proteină de 554 de aminoacizi cu denumirea „terpene synthase 6” [*Origanum vulgare*, GenBank: ADK73616.1].

Gena *Ovtps6* a fost descrisă ca fiind o sesquiterpen-sintetază implicată în sinteza compusului *β-cariofilen*. Un nivel sporit de expresie s-a observat, într-un studiu, când plantele de *O. vulgare* au fost supuse unor condiții de stres hidric [187].

Nivelul transcripțiilor în frunze pentru *Ovtps6* variază 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). Activitatea de expresie a genei în frunze s-a evidențiat la subpopulațiile Or5 și Or6 prin nivelul cel mai mare al transcripțiilor ($p < 0,05$) față de toate subpopulațiile (Figura 6.8, A). Subpopulațiile Or1-Or4 au valori cantitative similare și statistic ne semnificative între ele. Nivelul transcripțiilor identificat în frunzele plantelor din Or1 diferă statistic ($p < 0,05$) doar de cel din frunzele plantelor Or5 și Or6, iar comparativ cu celelalte subpopulații este statistic ne semnificativ.

În cazul transcripțiilor *Ovtps6* în flori (Figura 6.8, B), s-au remarcat subpopulațiile Or1, Or4 și Or5 cu cel mai mare nivel (1,47 u.c., 1,22 u.c. respectiv, 0,90 u.c.). Testul de semnificație statistică indică similaritate în valorile conținutului de transcripți la: Or4 și Or5; Or1 și Or3; Or3 și Or6; Or2 și Or7.

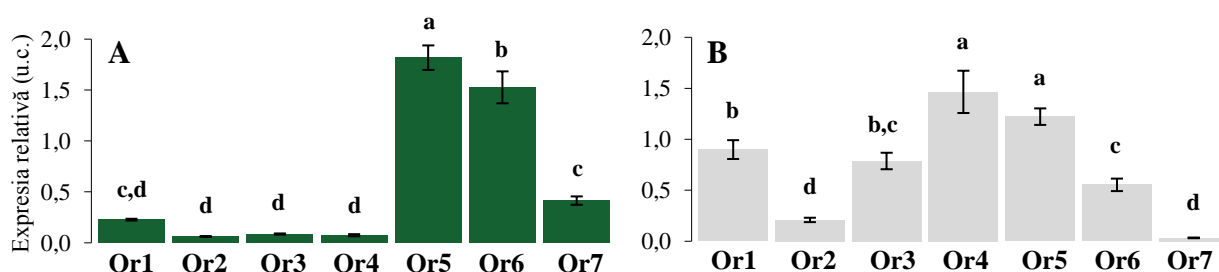


Fig. 6.8. Activitatea transcripțională a genei *Ovtps6* (GU385970) în frunze (A) și flori (B)

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei \pm abaterea standard ($n=3$); analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, care indică prin litere diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$) dintre subpopulații.

Gena *Ovtps6* a avut o activitate transcripțională mai înaltă la subpopulația Or5 atât în frunze, cât și în flori, iar Or2 și Or7 s-au evidențiat prin activitate transcripțională scăzută a genei în ambele organe.

Pentru a pune în evidență profilul general de expresie a mono- și sesquiterpen-sintetazelor la nivelul întregii populații este necesar de identificat asocierile corelative în conținutul de transcripți în flori și în frunze, care s-a realizat prin *analiza componentelor principale* (ACP). Astfel, au fost identificate două componente principale (CP) care explică 85% din variația datelor inițiale, indicând astfel, un grad înalt de corelație între variabile.

În combinația liniară a variabilelor independente – CP1, relația de dependență cantitativă caracteristică pentru întreaga populație este pusă în evidență prin corelații statistice pozitive pentru *Ovtps1* ($r=0,98$), *Ovtps3* ($r=0,98$), *Ovtps4* ($r=0,99$), *Ovtps6* ($r=0,95$) în frunze și negative – pentru *Ovtps1* din flori ($r=-0,72$). În cazul variabilelor care definesc CP2, corelează pozitiv: *Ovtps2* ($r=0,66$), *Ovtps3* ($r=0,94$), *Ovtps5* ($r=0,57$) în flori și *Ovtps5* – în frunze ($r=0,68$). Celelalte gene prezintă corelații pozitive/negative de intensitate slabă cu ambele componente.

După tipul relației de dependență cantitativă între transcripții terpen-sintetazelor studiate se

conturează un profil general de co-expresie în frunze și flori. Astfel, creșterea conținutului de transcripți din frunze (excepție *Ovtps5*) va determina, în flori, scăderea celui pentru *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps4* și sporirea valorilor cantitative în cazul genelor *Ovtps6* și *Ovtps7*.

La nivel de frunză s-a constatat asocieri negative a valorilor cantitative doar în cazul genei *Ovtps5*, celelalte gene studiate se asociază pozitiv între ele. Gena *Ovtps5*, expresată în frunze, corelează pozitiv cu toate genele analizate active transcripțional în flori. Spre deosebire de frunze, la care se observă asocieri negative doar în cazul unei gene, la nivel de flori se asociază negativ valorile pentru *Ovtps5* cu *Ovtps1*, *Ovtps4*, *Ovtps6* și pentru *Ovtps6* cu *Ovtps3* (Figura 6.9, A).

Analiza contribuției procentuale a 14 variabile în variația conținutului de transcripți a relevat doar 7 variabile care caracterizează profilul general de expresie a mono- și sesquiterpen-sintetazelor. Astfel, cele mai mari contribuții în caracterizarea populației o au conținuturile de transcripți *Ovtps4* (46%), *Ovtps3* (24%), *Ovtps6* (9%), *Ovtps1* (8%), *Ovtps5* (7%) din frunze și *Ovtps3* (86%), *Ovtps1* (9%) din flori (Figura 6.9, B).

Aceste variabile au grupat subpopulațiile Or1, Or2, Or3 și Or4 după conținutul mai înalt al transcripților în flori. Subpopulațiile Or5, Or6 și Or7 se evidențiază prin valori ridicate al conținutului de transcripți în frunze, excepții fiind observate în cazul genelor *Ovtps2*, *Ovtps5* (Or5 și Or6) și *Ovtps7* (Or5), la care nivelul de expresie a fost mai mare în flori.

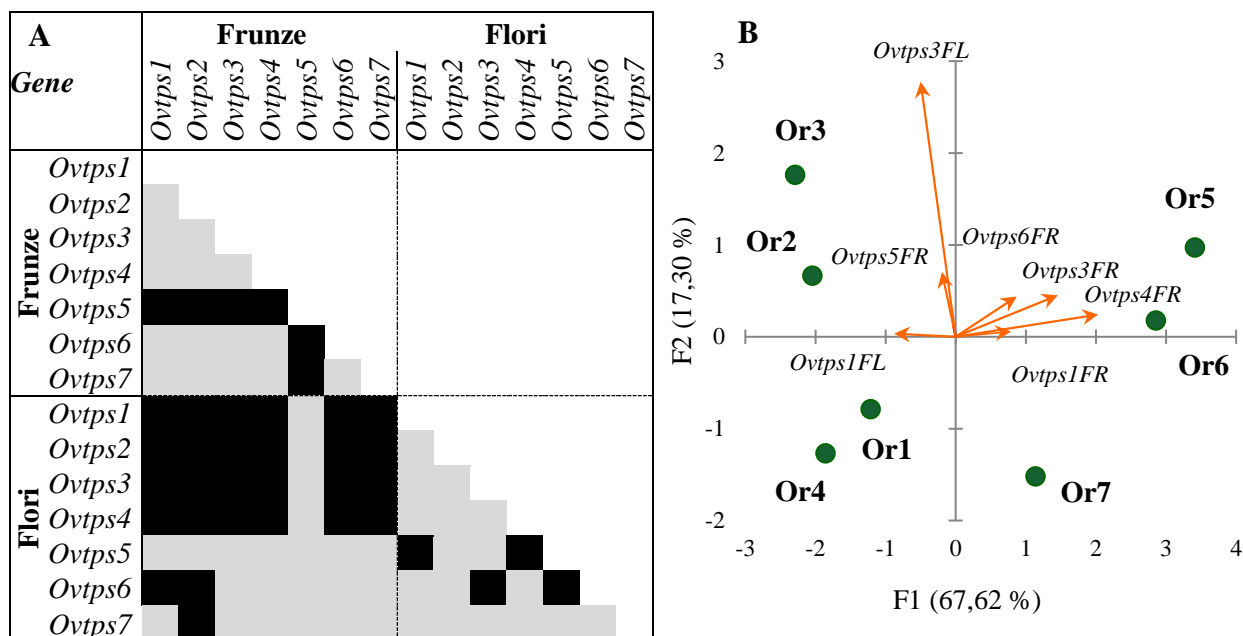


Fig. 6.9. Profilul general de co-expresie a terpen-sintetazelor în frunze și în flori (A) și distribuția subpopulațiilor în baza activității de transcripție a EST-urilor studiate (B)

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

Generalizând datele obținute în rezultatul studiului transcriptomic a șapte terpen-sintetaze la

O. vulgare ssp. *vulgare* din flora spontană s-a pus în evidență un profil de co-expresie, diferențiat în frunze și în flori, cu diverse asocieri corelative, relevând asupra unor efecte polimerice, pleiotropice și epistatice de interacțiune a genelor.

Multiple investigații au fost consacrate izolării și caracterizării din punct de vedere structural și funcțional a genelor codificatoare de *TPS* la plantele din familia *Lamiaceae*: *Thymus* [161, 223], *Lavandula* [85, 138], *Ocimum* [131] etc.

Rezultatele obținute în această lucrare sunt în concordanță cu studiile efectuate anterior de Crocoll C. și echipa sa (2010). Ei au studiat expresia heteroloagă (*E. coli*) a acestor gene potențial implicate în calea metabolică a terpenelor și activitatea enzimelor codificate de acestea. În studiul realizat de Crocoll C. genele *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5* și *Ovtps7* au codificat enzimele care au manifestat activitate enzimatică asupra substratului *geranil diforsfat* (GPP), sintetizând monoterpene, de exemplu, în calitate de componenți principali: *sabinenul* (*Ovtps1*), γ -*terpinen* (*Ovtps2*) și *trans- β -ocimen* (*Ovtps7*).

Expresia organ-diferențiată a genelor *TPS*, indusă de factorii fiziologici sau de mediu, este descrisă în mai multe lucrări. În cazul plantelor de *Matricaria recutita* (mușețel) a fost stabilit un nivel diferit de activitate a patru terpen-sintetaze (*MrTPS1-MrTPS5*) în organele aeriene studiate (flori sterile, fertile, frunze, tulpini). În rădăcină s-au identificat transcripții doar a genei *MrTPS2*. Profilul de acumulare a transcripților *TPS* în diferite organe ale mușețelului a fost convergent cu cel al terpenelor [133]. Compoziția calitativ și cantitativ diferită a terpenelor în funcție de organ (frunze, rădăcini) a fost descrisă și la specia *Zea mays* [156]. Autorii studiului au pus în evidență, de asemenea, reglarea posttranscripțională a terpen-sintetazelor dependentă de bioritmul circadian în acumularea substratului biochimic. Un alt grup de cercetători au constatat sporirea expresiei unei monoterpene-sintetaze (*ZMM1*) indusă de rănirea mecanică a frunzelor de *Cassumunar ginger* (ghimbir) atribuindu-i acestei particularități un rol esențial în sporirea conținutului și calității uleiului volatil [226].

Stresul hidric este unul dintre factorii abiotici, care afectează grav productivitatea și compoziția uleiului volatil de *O. vulgare* din regiunile aride și semiaride. Morshedloo M. R. și colab. (2017) studiind două subspecii de *O. vulgare* (ssp. *virens* și *gracile*) din Iran în condiții de modelare a stresului hidric, au demonstrat creșterea semnificativă a activității genelor *Ovtps2* și *Ovtps6* în condiții de stres [187]. Astfel de reacții de răspuns au fost descrise și în cazul plantelor de *Artemisia annua* L. [280]. Toate aceste studii demonstrează cu certitudine relațiile de dependență dintre transcriptomul terpen-sintetazelor și mediul de creștere și dezvoltare.

Datele prezentate în capitolul de față confirmă rezultatele altor autori cu privire la reglarea genică a metabolismului compușilor terpenici, prin codificarea și coordonarea activității enzimelor *TPS* ce catalizează reacțiile de sinteză și catabolism ale acestora.

6.4. Concluzii la capitolul 6

Analiza expresiei relative a terpen-sintetazelor la plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană relevă următoarele concluzii:

1. Se sintetizează un conținut mai mare de transcripti ai sesquiterpen-sintetazelor comparativ cu cel al monoterpen-sintetazelor atât în frunze (de cca 3,3 ori), cât și în flori (de 1,7 ori) [21].

2. Activitatea de transcripție este mai mare în flori comparativ cu cea din frunze în cazul a patru gene: trei monoterpen-sintetaze *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps7* (de 1,5-8 ori) și a unei sesquiterpen-sintetază *Ovtps3* (de 2-3 ori). Această particularitate nu se constată, cu unele excepții, la monoterpen-sintetaza *Ovtps5* și sesquiterpen-sintetaza *Ovtps6*, care au un nivel de expresie relativ similar în flori și frunze, precum și la *Ovtps4*, pentru care au fost înregistrate valori mai mari în frunze și nu în flori [21].

3. În flori, diferența între valorile minime și maxime ale conținutului de transcripti studiați este mult mai mică (de 3-8 ori) comparativ cu cea din frunze (de 10-30 de ori). În cazul sesquiterpen-sintetazei *Ovtps3* se constată un nivel de variabilitate intrapopulațională înalt, atât în frunze, cât și în flori de 18-20 de ori.

4. Cea mai mare pondere în caracterizarea populației o au valorile conținutului de transcripti *Ovtps4* (46%), *Ovtps3* (24%), *Ovtps1* (8%), *Ovtps6* (9%), *Ovtps5* (7%) din frunze și *Ovtps3* (86%), *Ovtps1* (9%) din flori.

5. Au fost stabilite două grupuri de corelații statistice de intensitate medie și puternică: *Ovtps1*, *Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps6* din frunze, asociate pozitiv între ele și negativ cu *Ovtps1* expresată în flori, și genele *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps5* din flori asociate pozitiv atât între ele, cât și cu *Ovtps5* din frunze [21].

6. După tipul relației de dependență cantitativă între transcripti terpen-sintetazelor studiate se conturează un profil general de co-expresie prin supraexpresia acestora în frunze (excepție *Ovtps5*) asociată cu subexpresia *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps4* în flori. Valorile conținutului *Ovtps5* din frunze se asociază pozitiv cu cel al transcriptiilor codificați de toate genele studiate în flori [21].

7. Spre deosebire de frunze, la care se observă asocieri negative doar în cazul unei gene, la nivel de flori, se asociază negativ valorile pentru *Ovtps5* cu *Ovtps1*, *Ovtps4*, *Ovtps6* și pentru *Ovtps6* cu *Ovtps3*.

8. În cazul subpopulațiilor Or1, Or2, Or3 și Or4 conținutul mai înalt al transcriptiilor codificați de genele investigate s-a identificat în flori, cu excepția genei *Ovtps5*, care are valori mai mari în frunze la Or1 și Or3.

9. Subpopulațiile Or5, Or6 și Or7 se evidențiază prin valori ridicate ale conținutului de transcripti în frunze, excepții fiind observate în cazul genelor *Ovtps5*, *Ovtps2* (Or5 și Or6) și *Ovtps7* (Or5), la care nivelul de expresie a fost mai mare în flori.

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

Studiul diversității structurale și funcționale a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană (rezervația Orheiul Vechi) la nivel morfologic (10 parametri), molecular (genotipare RAPD, SSR), biochimic (metaboliți secundari, transcripti ai genelor terpen-sintetaze) și aplicarea statisticii comparative (analiză multivariată, indici de diversitate și diferențiere moleculară, metode de clusterizare) au pus în evidență asocieri corelative între variabilele fiecărui nivel abordat.

În acest capitol de sinteză a datelor s-a decis de a identifica congruența matricilor de disimilaritate a parametrilor analizați intrapopulațional. Acest obiectiv va completa cu elemente relevante informațiile, analizate în prezenta lucrare, atât în aspectul cunoașterii structurii molecular-genetice a populației de *O. vulgare* ssp. *vulgare* în arealul geografic studiat și al variabilității fitochimice a unor metaboliți secundari cu rol fiziologic în adaptarea plantelor, cât și în aspect aplicativ al evaluării germoplasmei în perspectiva ameliorării, conservării și exploatării resursei vegetale autohtone de *O. vulgare*.

Testele statistice *Mantel* [86] sunt cele mai utilizate tehnici de comparare a matricilor de distanță derivate din diverse date biologice pentru a evidenția posibile interrelaționări.

Schema generală de asociere a variabilității datelor morfologice, molecular-genetice și biochimice au inclus diferite combinații formate din: *matrici integrale a datelor inițiale, grupuri de variabile asociate corelativ, parametri în perechi, variabile cu cea mai mare pondere informațională (%) în caracteristica subpopulațiilor relevate prin ACP.*

Asocieri corelative cu datele morfologice

Reieșind din faptul că markerii SSR utilizați în lucrare au fost elaborați pentru regiuni microsatelite din secvențe genice, care se expresează în trihomii glandulari ai țesutului epidermic din frunze [198], a fost presupusă a priori lipsa unor corelații între variabilitatea alelică și cea morfologică pentru cele 7 subpopulații de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

Pentru verificare a fost aplicat testul Mantel pe matricile de disimilaritate a **parametrilor morfologici și frecvența alelelor SSR** (Anexa 1 și 3) la nivelul întregii populații. Rezultatele testului a prezentat valori statistic ne semnificative ($p > 0,05$) ale coeficientului de corelație $r(AB) < 0,2$ în combinații formate dintre (A): 9 parametri morfologici cantitativi; 6 parametri morfologici extrași prin ACP (*înălțimea plantei, diametrul tulpinii, nr. noduri/tulpină, distanța internodurilor, nr. frunze/nod, lățimea frunzei*); 3 parametri (*înălțimea plantei, diametrul tulpinii, nr. frunze/nod*), care în pereche cu alte caractere au cele mai multe corelații; 2 parametri (*distanța*

internodurilor și *lățimea frunzei*), care determină cel mai mare grad de variabilitate intrapopulațională și matricile de date (B): 11 loci SSR (total 82 de alele) și 9 loci (OR09, OR10, OR13, OR14, OR27, OR44, OR64, OR75 și OR81) cu variantele lor alelice (total 64 de alele).

Datele obținute, confirmă ipoteza înaintată, în același timp pot fi presupuse prezența unor corelații între coeficienții de distanță ce indică variabilitatea genică și biochimică după conținutul metaboliților secundari și al transcripturilor, asocieri care vor fi descrise în cele ce urmează.

Analiza corelativă a matricilor de disimilaritate (A) ale **parametrilor morfologici și conținutului în terpeni și acizi polifenolcarboxilici** a prezentat în majoritatea cazurilor de comparație rezultate statistic ne semnificative ($p > 0,05$) ale coeficientului de corelație $r(AB) < 0,3$. În calitate de matrici (B) au fost: toate cele 15 sesquiterpene și 20 de monoterpene; 9 compuși care constituie chemovarietatea generală a populației (*sabinen*, *p-cimen*, *cis-β-ocimen*, *γ-terpinen*, *β-cariofilen*, *τ-gurjunen*, *β-bisabolen*, *oxid de cariofilen*, *germacren D*) și acizii polifenolcarboxilici (*acid clorogenic*, *cafeic*, *p-cumaric* și *rozmarinic*).

În cazuri separate de comparații, cu un număr mai mic de variabile, au fost obținute date convergente privind variabilitatea unor parametri morfologici și metaboliți (Figura 7.1, A și B). Astfel, corelații de intensitate medie cu valoare negativă ($r(AB) = -0,45$, $p = 0,03$), statistic semnificative au fost identificate între trei parametri morfologici: *lungimea frunzei* (LF), *lungimea ramurilor* (LR) și *nr. ramuri/plantă* (RP) și 19 monoterpene (a fost exclus *sabinenul*, compusul cu cel mai mare conținut procentual din acest grup).

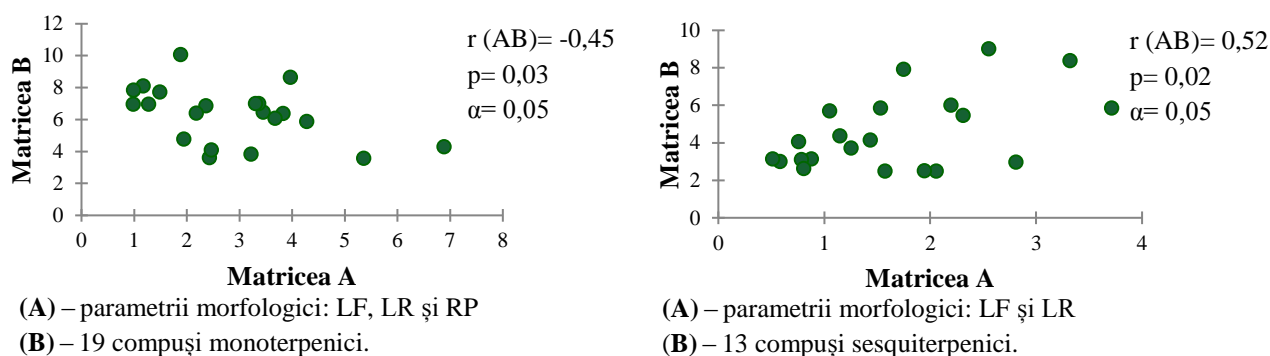


Fig. 7.1. Analiza corelativă a parametrilor morfologici și a compușilor terpenici identificați în uleiul volatil de *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Este important de concretizat faptul că matricea derivată din datele doar ale LF și LR a corelat pozitiv ($r(AB) = 0,52$, $p = 0,02$) cu 13 compuși sesquiterpenici (au fost excluși compușii cu cele mai mari concentrații, *β-cariofilen* – 15-33% și *germacren D* – 9-17%). Aceste asocieri corelative sunt redate grafic în Figura 7.1, A și B.

Întrucât au fost stabilite date convergente în variabilitatea morfologică și cea biochimică,

deși doar în anumite cazuri (compuși cu concentrații mai mici de 8% – monoterpene și 12% – sesquiterpene), s-a decis de a determina posibilele corelații liniare (*Spearman*) dintre parametrii morfologici și cei 9 compuși terpenici identificați în concentrații comparativ mai mari și care determină chemovarietatea uleiului volatil (Tabelul 7.1).

Tabelul 7.1. Valorile coeficienților de corelație *Spearman* (r_s) între parametrii morfologici și conținutul a 9 compuși terpenici

Terpene	Parametri morfologici								
	HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF
<i>γ-terpinen</i>	-0,14	0,07	-0,07	0,71*	0,68*	-0,21	-0,11	0,29	-0,04
<i>p-cimen</i>	-0,11	0,18	0,75*	-0,43	0,14	0,00	0,11	-0,32	-0,25
<i>sabinen</i>	-0,14	-0,36	-0,71*	-0,32	-0,50	-0,39	-0,57	0,11	-0,14
<i>cis-β-ocimen</i>	0,07	0,00	-0,71*	0,68*	0,39	-0,11	0,00	0,00	0,18
<i>oxid de cariofilen</i>	-0,14	-0,11	0,57	-0,68*	-0,11	0,00	0,00	-0,25	-0,21
<i>germacren D</i>	0,18	0,46	0,04	0,86*	0,71*	0,14	0,39	-0,11	0,18
<i>β-bisabolen</i>	-0,29	-0,29	-0,57	0,36	0,86*	-0,36	-0,04	-0,46	-0,14
<i>τ-gurjunen</i>	-0,39	-0,07	-0,04	0,57	0,71*	-0,32	-0,11	0,14	-0,29
<i>β-cariofilen</i>	-0,64	-0,29	0,21	-0,25	0,36	-0,32	0,00	-0,39	-0,64

Notă: HP – înălțimea plantei (cm); RP – nr. ramuri/plantă; LR – lungimea ramurii (cm); DT – diametrul tulpinii (mm); NT – nr. noduri/tulpină; DI – distanța internoduri (cm); FN – nr. frunze/nod; LF – lungimea frunzei (cm); IF – lățimea frunzei (cm); * – corelații statistic semnificative (*Spearman*, r_s , $p < 0,05$).

Spre deosebire de cei trei parametri morfologici *lungimea frunzei*, *lungimea ramurilor* și *nr. ramuri/plantă* relevați prin testul Mantel, care identifică în ce măsură diversitatea intrapopulațională după parametrii morfologici este similară cu variabilitatea în conținutul terpenelor, în cazul comparației rangurilor de valori, de asemenea, s-a evidențiat *lungimea ramurilor* și alți 2 parametri: *diametrul tulpinii* și *nr. noduri/tulpină* care au prezentat corelații cu conținutul anumitor compuși chimici.

Astfel, în cazul *lungimii ramurilor* sunt corelații medii, pozitive cu *p-cimenul* ($r_s=0,75$, $p=0,02$), însă, negative – cu compușii monoterpene: *sabinen* ($r_s=-0,71$, $p=0,03$) și *cis-β-ocimen* ($r_s=-0,71$, $p=0,03$). Corelații negative s-au constatat și pentru *diametrul tulpinii* în pereche cu sesquiterpena *oxidul de cariofilen* ($r_s=-0,68$, $p=0,04$). Valorile acestui parametru corelează pozitiv cu conținutul procentual a două monoterpene, considerați precursori ai carvacrolului și timolului [72]: *γ-terpinen* ($r_s=0,71$, $p=0,03$) și *cis-β-ocimen* ($r_s=0,68$, $p=0,04$), dar și cu un compus sesquiterpenic *germacren D* ($r_s=0,86$, $p=0,01$). Dependente corelative pozitive au fost constatate și în cazul parametrului morfologic *nr. noduri/tulpină* cu conținutul a patru compuși terpenici: *γ-terpinen* ($r_s=0,68$, $p=0,04$), *germacren D* ($r_s=0,71$, $p=0,03$), *β-bisabolen* ($r_s=0,86$, $p=0,01$) și *τ-gurjunen* ($r_s=0,71$, $p=0,03$).

În urma analizei comparative a diversității intrapopulaționale la nivelul **parametrilor morfologici și cel al conținutului în transcriptii a 7 terpen-sintetaze** nu s-au obținut rezultate statistic semnificative ($r(AB) < 0,3$, $p > 0,05$).

Asocieri corelative cu datele molecular-genetice

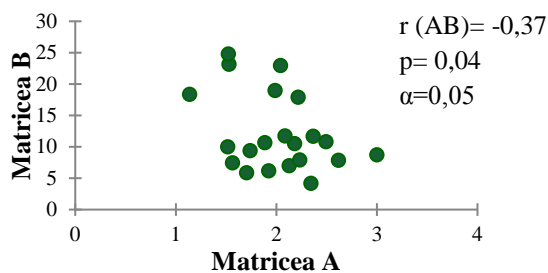
Divergența genică determinată de **frecvența diferită a alelelor locilor SSR în raport cu conținutul în terpeni și acizi polifenolcarboxilici** a prezentat o asociere corelativă slabă, negativă ($r(AB) = -0,37$, $p = 0,04$) în cazul matricilor de disimilaritate a 64 de alele pentru 9 loci din 11 studiați (OR09, OR10, OR13, OR14, OR27, OR44, OR64, OR75 și OR81) și cei 9 compuși terpenici care formează chemovarietatea populației indigene (*sabinen*, *p-cimen*, *cis-β-ocimen*, *γ-terpinen*, *β-cariofilen*, *τ-gurjunen*, *β-bisabolen*, *oxid de cariofilen*, *germacren D*), prezentată grafic în Figura 7.2, A. În cazul comparațiilor, separat pe loci, s-a evidențiat locusul OR09 (6 alele) asociat cu toate monoterpenele identificate (20) printr-o corelație slabă, negativă ($r(AB) = -0,41$, $p = 0,03$).

Spre deosebire de corelațiile în sens negativ ale diversității molecular-genetice și conținutul în metaboliți secundari, în asocierea variabilității frecvenței alelice a locilor SSR cu conținutul transcriptiilor terpen-sintetazelor sunt corelații pozitive. Astfel, a fost constatată o corelație pozitivă statistic semnificativă ($r(AB) = 0,51$, $p = 0,03$) a **frecvenței tuturor alelelor studiate** (Anexa 3) **cu conținutul transcriptiilor monoterpen-sintetazelor** (Anexa 7) (*Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5*, *Ovtps7*) exprimate în flori (Figura 7.2, B).

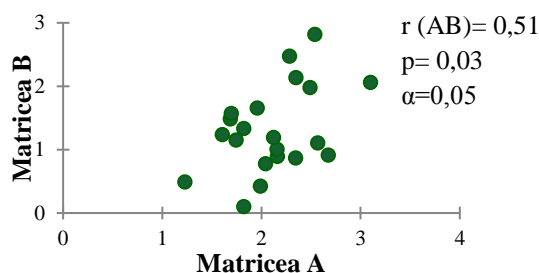
Locusul OR44 (4 alele) și locusul OR40 (10 alele) a prezentat corelații medii pozitive ($r(AB) = 0,50$, $p = 0,02$ și respectiv $r(AB) = 0,49$, $p = 0,03$) cu conținutul transcriptiilor a 7 terpen-sintetaze în flori (Anexa 7).

Spre deosebire de corelațiile frecvenței alelice a locilor cu expresia relativă a genelor studiate în flori, în frunze au fost depistate dependențe corelative ($r(AB) = 0,43$, $p = 0,04$) doar în cazul a doi loci OR64 (4 alele) și OR40 (10 alele) cu conținutul transcriptiilor sesquiterpen-sintetazelor (*Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps6*).

Nu au fost constatate corelații statistice între matricile de disimilaritate a datelor integrale (frecvența a 82 de alele studiate cu 15 sesquiterpene, 20 de monoterpene, acizi polifenolcarboxilici: *acidul clorogenic*, *cafeic*, *p-cumaric* și *rozmarinic*), sesquiterpen-sintetaze din flori; sesquiterpen-sintetaze din frunze; monoterpen-sintetaze din frunze.



(A) – frecvența a 64 de alele (9 loci EST-SSR);
 (B) – conținutul (%) a nouă compuși terpenici (*sabinen*, *p-cimene*, *cis-β-ocimene*, *γ-terpinen*, *β-cariofilen*, *τ-gurjunen*, *β-bisabolen*, *oxid de cariofilen*, *germacren D*).



(A) – frecvența a 82 de alele (toți 11 loci EST-SSR);
 (B) – conținutul transcripților (*Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5* și *Ovtps7*) în flori.

Fig. 7.2. Analiza corelativă a datelor moleculare (frecvența alelelor) între conținutul compușilor terpenici (A) și a transcripților EST (B)

Asocieri corelative cu datele biochimice

Preliminar statisticii comparative a coeficienților de distanță dintre matricile de date cantitative ale metaboliților secundari și ale transcripților genelor implicate în sinteza acestora, a fost analizată corelația rangurilor de valori (*Spearman*). Astfel, corelații liniare puternice, pozitive se identifică în cazul conținutului de monoterpene în pereche cu transcripții *Ovtps1* (monoterpene-sintetază) și *Ovtps3*, *Ovtps4* (sesquiterpen-sintetaze) identificați în frunze. Surprinzător este rezultatul care indică corelația negativă puternică ($r_s = -0,82$, $p = 0,02$) dintre sesquiterpene și sesquiterpen-sintetaza *Ovtps3* din frunze (Tabelul 7.2).

Tabelul 7.2. Valorile coeficienților de corelație Spearman (r_s) între conținutul sumar al compușilor terpenici cu cel al transcripților sintetizați în frunze

Terpene	EST	r_s	$p < 0,05^*$; $0,01^{**}$; $0,001^{***}$	Terpene	r_s	$p < 0,05^*$; $0,01^{**}$; $0,001^{***}$
Monoterpene	<i>Ovtps1</i>	0,89	0,007**	Sesquiterpene	0,36	0,156
	<i>Ovtps2</i>	0,44	0,278		0,45	0,301
	<i>Ovtps3</i>	0,71	0,036*		-0,82	0,023*
	<i>Ovtps4</i>	0,86	0,014*		0,21	0,123
	<i>Ovtps5</i>	0,54	0,221		0,42	0,356
	<i>Ovtps6</i>	0,40	0,345		0,35	0,201
	<i>Ovtps7</i>	0,48	0,208		0,11	0,525

Ulterior a fost efectuată analiza corelativă pentru fiecare compus separat (valori medii ale subpopulațiilor) cu fiecare genă expresată în frunze și în flori. În Tabelul 7.3 și 7.4, sunt prezentați doar compușii, conținutul procentual al cărora corelează puternic cu conținutul de transcripți ai terpen-sintetazelor. Astfel, în cazul a 7 din 20 de monoterpene (*pinen*, *β-pinen*, *β-mircen*, *d-limonen*, *eucaliptol*, *4-terpineol*, *α-terpineol*) au fost constatate corelații puternice pozitive cu una

sau mai multe terpen-sintetaze, de exemplu:

- *eucaliptolul* (1-7%) corelează cu monoterpen-sintetaza *Ovtps1* ($r_s = 0,96$) și cu sesquiterpen-sintetazele *Ovtps3* ($r_s = 0,79$), *Ovtps4* ($r_s = 0,93$) și *Ovtps6* ($r_s = 0,86$);
- *d-limonenul* (1-2,6%) și *α -terpineol* (0,2-3,5%) corelează cu monoterpen-sintetaza *Ovtps1* ($r_s = 0,96$ respectiv $r_s = 0,93$) și cu sesquiterpen-sintetazele *Ovtps4* și *Ovtps6*;
- *α -pinenul* (0,2-1,2%) corelează cu monoterpen-sintetaza *Ovtps1* ($r_s = 0,79$) și cu sesquiterpen-sintetaza *Ovtps4* ($r_s = 0,93$);
- *β -mircen* (1-1,6%) corelează cu monoterpen-sintetazele *Ovtps5* ($r_s = 0,79$) și *Ovtps7* ($r_s = 0,86$).

Tabelul 7.3. Valorile coeficientului de corelație Spearman (r_s) între conținutul monoterpenelor și cel al transcripțiilor genelor studiate

EST	Monoterpene	r_s (Spearman)	$p < 0,05^*$; $0,01^{**}$; $0,001^{***}$
<i>Ovtps1</i>	<i>α-pinen</i>	0,79	0,036*
	<i>d-limonen</i>	0,96	0,000***
	<i>eucaliptol</i>	0,96	0,000***
	<i>α-terpineol</i>	0,93	0,003**
<i>Ovtps3</i>	<i>eucaliptol</i>	0,79	0,036*
<i>Ovtps4</i>	<i>d-limonen</i>	0,93	0,003**
	<i>α-terpineol</i>	0,86	0,014*
	<i>eucaliptol</i>	0,93	0,003**
	<i>α-pinen</i>	0,93	0,003**
<i>Ovtps5</i>	<i>β-mircen</i>	0,79	0,036*
<i>Ovtps6</i>	<i>d-limonen</i>	0,82	0,023*
	<i>eucaliptol</i>	0,86	0,014*
	<i>α-terpineol</i>	0,82	0,023*
<i>Ovtps7</i>	<i>β-mircen</i>	0,86	0,014*
<i>Ovtps1</i>	<i>α-terpinen + γ-terpinen</i>	0,86	0,014*
<i>Ovtps4</i>		0,86	0,014*
<i>Ovtps6</i>		0,96	0,000***
<i>Ovtps7</i>		<i>trans-β-ocimen</i>	0,93

Asocierea compușilor monoterpenici cu conținutul transcripțiilor terpen-sintetazelor exprimate în flori, spre deosebire de frunze, au relevat mai puține corelații:

- *α -terpinen* (0,1-0,6%) și *γ -terpinen* (0,3-2,2%) corelează cu monoterpen-sintetaza *Ovtps1* ($r_s = 0,86$) și cu sesquiterpen-sintetazele *Ovtps4* ($r_s = 0,86$) și *Ovtps6* ($r_s = 0,96$);
- *trans- β -ocimen* (2-8%) corelează cu monoterpen-sintetaza *Ovtps7* ($r_s = 0,93$).

În ceea ce privește conținutul de sesquiterpene au fost constatate corelații semnificative statistic cu conținutul transcripțiilor în frunze și în flori în cazul următorilor compuși:

- *τ -gurjunenul* (2-4,3%) corelează cu monoterpen-sintetaza *Ovtps1* ($r_s = 0,86$) și cu sesquiterpen-sintetazele *Ovtps4* ($r_s = 0,86$) și *Ovtps6* ($r_s = 0,82$) exprimate în flori;

- β -bisabolen (0,3-2,6%) cu monoterpen-sintetaza *Ovtps1* ($r_s= 0,86$) din flori;
- β -cariofilen (15-33%) și α -cariofilen (3-6,5%) cu sesquiterpen-sintetaza *Ovtps3* ($r_s= 0,78$) din flori;
- τ -murolol (0,4-2%) corelează cu monoterpen-sintetaza *Ovtps2* ($r_s= 0,86$) expresată în frunze.

Tabelul 7.4. Valorile coeficientului de corelație Spearman (r_s) între conținutul sesquiterpenelor și cel al transcripțiilor genelor studiate

EST	Sesquiterpene	r_s (Spearman)	$p < 0,05^*$; $0,01^{**}$; $0,001^{***}$
<i>Ovtps2</i>	Frunze <i>τ-murolol</i>	0,86	0,014*
<i>Ovtps1</i>	Flori <i>β-bisabolen</i>	0,86	0,014*
<i>Ovtps3</i>		<i>β-cariofilen, α-cariofilen</i>	0,78
<i>Ovtps1</i>	Flori <i>τ-gurjunen</i>	0,86	0,014*
<i>Ovtps4</i>		0,86	0,014*
<i>Ovtps6</i>		0,82	0,023*

Analiza corelativă Spearman a facilitat identificarea datelor pentru testul statistic Mantel, de comparație a variațiilor intrapopulaționale. Astfel, compararea matricilor de disimilaritate a compușilor terpenici din extractele de ulei esențial și a nivelului de expresie a EST-lor a prezentat asocieri diferite cu transcripții cuantificați în frunze și flori (Figura 7.3).

Profilul de variație intrapopulațională a șapte monoterpene selectate în baza corelației Spearman cu concentrațiile maxime cuprinse între 3,5-7,2% (*α -pinen, β -pinen, β -mircen, d-limonen, eucaliptol, 4-terpineol, α -terpineol*) este convergent cu matricea de disimilaritate a conținutului transcripțiilor monoterpen-sintetazelor *Ovtps1, Ovtps2, Ovtps5, Ovtps 7* ($r(AB)= 0,57$, $p= 0,004$) și sesquiterpen-sintetazelor *Ovtps3, Ovtps4, Ovtps6* ($r(AB)= 0,65$, $p= 0,001$) din frunze (Figura 7.3).

Rezultatele testului Mantel a matricii de disimilaritate pentru sesquiterpene (15) cu cea a EST-lor studiate a prezentat o relație corelativă de intensitate moderată cu sesquiterpen-sintetazele (*Ovtps4, Ovtps3, Ovtps6*) expresate în flori ($r(AB)= 0,63$, $p=0,001$). Tot cu matricea sesquiterpen-sintetazelor din flori ($r(AB)= 0,56$, $p= 0,01$) a corelat și cea derivată din 9 compuși (5 sesquiterpene și 4 monoterpene), care au fost incluși în chemovarietatea plantelor de *O. vulgare ssp. vulgare* din rezervația Orheiul Vechi (Figura 7.3).

Un coeficient de corelație pozitivă, puternică ($r(AB)= 0,82$, $p < 0,0001$) s-a constatat între variația compușilor monoterpenici (20) și a celor sesquiterpenici (15) (Figura 7.3).

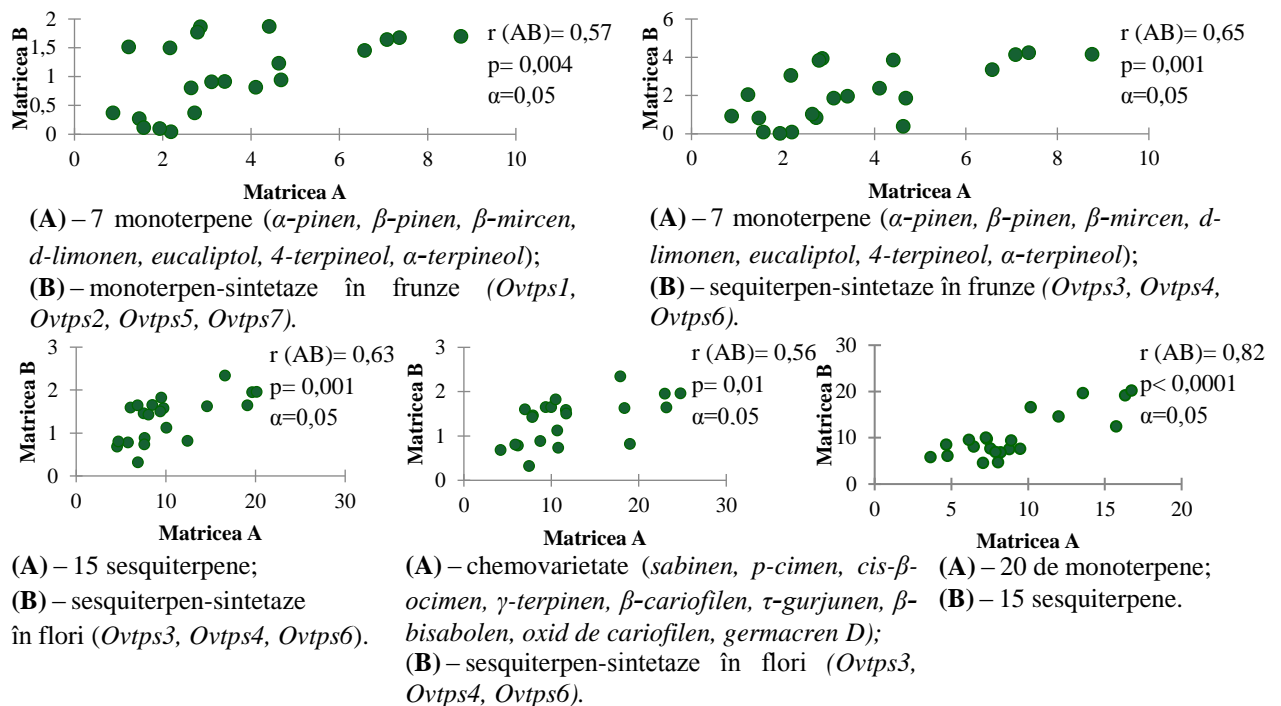


Fig. 7.3. Analiza corelativă între conținutul compușilor terpenici și al transcripțiilor EST

Generalizând datele expuse în acest capitol se poate afirma că asocierile corelative între diferite variabile, puse în evidență prin testele statistice de analiză a covarianței și de comparare a variabilității datelor biologice, prezintă rezultatul fenomenelor de pleiotropie și epistazie. Expresia fenotipică a relațiilor dintre genele ce controlează caracterele morfologice cantitative, influențată de mulți factori intrinseci și extrinseci, prezintă o variabilitate foarte largă de manifestare, dificil de monitorizat și cuantificat. Testele Mantel (distanța euclideană) utilizate în prezenta lucrare au relevat corelații de intensitate medie, indicând congruența variabilității intrapopulaționale a plantelor la nivelul unor parametri morfologici și metaboliți secundari. Astfel, variabilitatea subpopulațiilor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* după conținutul în sesquiterpene (13 compuși, cu concentrații procentuale sub 12%) este determinată de variația valorilor medii ale *lungimii frunzei* și *a ramurilor*. Spre deosebire de conținutul în sesquiterpene, cel al monoterpenelor (19 compuși, cu concentrația sub 8%) nu variază semnificativ la plantele cu diferite valori ale acestor doi parametri morfologici *lungimea frunzei* și *a ramurilor* în combinație cu *numărului de ramuri/plantă*. Deci în baza acestor asocieri corelative pozitive/negative între matricile de distanță a parametrilor morfologici și metaboliți se poate presupune o tendință de modificare în conținutul de sesquiterpene din uleiul volatil prin variații ale *lungimii frunzei* și *a ramurilor* plantei.

Corelațiile medii pozitive între matricile de disimilaritate moleculară și expresie relativă a terpen-sintetazelor demonstrează o tendință de modificare în activitatea de transcripție a monoterpen-

sintetazelor din flori (*Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5*, *Ovtps7*) în funcție de variația frecvenței alelelor studiate (82) în genomul plantelor. Locii OR44 cu 4 alele și OR40 cu 10 alele sunt direct asociați cu conținutul transcripțiilor a 7 terpen-sintetaze exprimate în flori. La nivelul frunzelor s-au evidențiat, de asemenea, locusul OR40 (10 alele), precum și OR64 (4 alele) a căror frecvență alelică influențează conținutul sesquiterpen-sintetazelor (*Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps6*).

O dovadă a controlului molecular-genetic în acumularea terpenelor în plantele studiate este și coeficientul de corelație negativă, slabă dar statistic semnificativă ($r(AB) = -0,37$, $p = 0,04$) între variabilitatea frecvenței a 64 de alele pentru 9 loci din 11 studiați (OR09, OR10, OR13, OR14, OR27, OR44, OR64, OR75 și OR81) și 9 compuși terpenici care s-au evidențiat prin concentrații mai mari (*sabinen*, *p-cimen*, *cis- β -ocimen*, *γ -terpinen*, *β -cariofilen*, *τ -gurjunen*, *β -bisabolen*, *oxid de cariofilen*, *germacren D*). Acest rezultat presupune o variabilitate relativ scăzută a valorilor cantitative a terpenelor menționate în subpopulații cu diferită frecvență alelică a locilor SSR, fapt ce confirmă stabilirea corectă a chemovarietății speciei *O. vulgare* autohtone.

Congruența datelor privind distanța între cele 7 subpopulații de plante după nivelul de expresie relativă a terpen-sintetazelor și al conținutului compușilor terpenici, constatată în cadrul prezentei lucrări, indică asupra unui mecanism de control a biosintezei acestora la nivel de transcripție, care în aspect aplicativ, ar avea un rol de marker de selecție a plantelor potențial bogate în compuși terpenici de interes. Date similare axate pe identificarea unor asocieri între variabilitatea populațională la nivel morfologic, chimic și molecular-genetic în scopul identificării unor markeri eficienți pentru programe de screening și selecție au fost descrise atât pentru specia *O. vulgare*, cât și alte PMA. Astfel, în investigațiile realizate de către Azizi A. și colab. (2012, 2016) pe un număr de 42 de populații de *O. vulgare*, în majoritate, originare din Europa au fost identificate corelații relativ înalte între chemotip și markeri moleculari, și slabe între matricea parametrilor morfologici și a distanței genetice (AFLP și SAMPL). Prin analiza corelativă în perechi (*Pearson*) a trăsăturilor morfologice, autorii au constatat corelarea *diametrului tulpinii* cu randamentul uleiului esențial și conținutul de carvacrol, concluzionând asupra posibilității de utilizare a acestui caracter morfologic, în calitate de indicator pentru selecția indirectă și ameliorarea a două trăsături importante economic, producția de ulei esențial și conținutul de carvacrol în *O. vulgare* [41, 43].

Corelații relativ înalte între profilele metaboliților secundari și cele molecular-genetice au fost relevate și în cadrul unor studii de genotipare a unor specii din genul *Origanum* L. din Egipt, fiind expuse, de asemenea, argumente cu referire la eficiența și puterea de discriminare intraspecifică a germoplasmei mai înaltă a markerilor SRAP în comparație cu cei ISSR [31]. În această ordine de idei se înscriu și investigațiile compoziției uleiului esențial în funcție de variabilitatea genetică a plantelor de *Salvia officinalis* L. A fost subliniată corespunderea profilelor RAPD cu raportul dintre principalii

compuși chimici volatili, fiind sugerată relația de dependență înaltă între profilul chimic și cel genetic [30].

În cadrul unor cercetări privind variabilitatea uleiului volatil al plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* și ssp. *hirtum* din 16 regiuni din flora spontană a Albaniei au fost emise concluzii privind rolul de bază al structurii genetice în determinarea compoziției chimice a terpenelor, în contrast cu factorii de mediu, care au cauzat doar unele efecte minore [96]. În același timp, sunt informații care demonstrează efecte semnificative ale unor factori de mediu ce influențează căile de sinteză ale metaboliților secundari și care trebuie luați în considerație în programele de ameliorare. De exemplu, prin experiențe de modelare ale stresului hidric, Morshedloo M. R. (2017) prezintă dovezi cu referire la variația metaboliților secundari și a nivelului de expresie a genelor la două subspecii native de *O. vulgare* (ssp. *virens* și ssp. *gracile* cu diferit conținut în monoterpene) din Iran. Sub acțiunea stresului hidric, uleiul esențial de *O. vulgare* ssp. *gracile* a fost bogat în *carvacrol*, în timp ce sesquiterpena (*Z*)-*a-bisabolen* a fost constituentul major al uleiului de *O. vulgare* ssp. *virens*. Tot la această subspecie considerată săracă în monoterpene, cantitatea de (*E*)-*b-cariofilen* a crescut semnificativ sub acțiunea factorului stresor, indicând cu certitudine asupra unei reacții de adaptare la condițiile specifice de mediu. [187, 188].

La final de capitol este prezentată sinteza datelor relevante pentru fiecare subpopulație, fiind urmărite particularitățile distinctive de asemănare/discriminare între ele. Conform structurii moleculare intrapopulaționale a plantelor din habitatul natural, s-a constatat o tendință de asociere în funcție de biotopul colectării plantelor. Astfel, între Or2 și Or1; Or3, Or4 și Or5 se atestă diferite nivele de similaritate, spre deosebire de Or6 și Or7, care sunt mai distanțate de celelalte subpopulații. Această configurare asociativă a subpopulațiilor are loc într-o măsură mai mare sau mai mică în funcție de parametrii studiați (morfologici, molecular-genetici și biochimici). În calitate de caracteristici principale de autentificare a subpopulațiilor studiate pot fi menționate, pentru:

- **Or1** – valori maxime pentru *diametrul tulpinii plantelor, numărul de noduri/tulpină, lungimea frunzei*; conținut înalt al acizilor polifenolcarboxilici, polifenolilor totali, *acidului rozmarinic*, transcripțiilor genelor investigate în flori și a *Ovtps5* în frunze; cea mai scăzută pondere a heterozigoților ($He=0,38$; $Ho=0,42$); profilul terpenic: *germacren D/β-cariofilen/ sabinen/ cis-β-ocimen/ oxid de cariofilen*;
- **Or2** – valori minime la șapte din nouă parametri și lipsa corelațiilor caracter/caracter; valori mai mici cu 18-47% ale conținutului de acizi polifenolcarboxilici și cu 23% – a monoterpenele față de sesquiterpene. Similar cu subpopulația Or1 sunt valorile înalte ale conținutului în *acid rozmarinic*, transcripțiilor genelor în flori, ponderea scăzută a heterozigoților ($He=0,38$, $Ho=0,34$). Profilul terpenic: *β-cariofilen/ sabinen/ germacren D/oxid de cariofilen*;
- **Or3** – cea mai înaltă variație individuală după *lungimea ramurii* ($CV>30$); valori comparativ mai mici

de polifenoli totali cu 25-40% și cu 70% a monoterpenelor față de sesquiterpene; valori cantitative medii ale *acidului rozmarinic*; valori înalte ale conținutului transcripțiilor genelor investigate în flori, *Ovtps5* în frunze și a indicilor de diversitate alelică ($A=49$; $N_A=4,46$; $N_E=3,64$; $N_S=3$; $PLP=100\%$); profilul terpenic: *β -cariofilen/germacren D/oxid de cariofilen/p-cimen*;

- **Or4** – cea mai înaltă variație individuală după *lungimea ramurii* ($CV>30$); cele mai mici valori ale parametrului *distanța internodurilor*; valori comparativ mai mici de polifenoli totali cu 25-40%, cu 18-47% – de acizi polifenolcarboxilici și cu 23-26% – a monoterpenelor față de sesquiterpene; cele mai mici valori cantitative ale *acidului rozmarinic*; valori înalte ale conținutului transcripțiilor genelor investigate în flori, indicilor de diversitate alelică ($A=46$; $N_A=4,18$; $N_E=3,77$; $N_S=3$; $PLP=100\%$.) și ale ponderii heterozigoților ($H_o=0,75$, $H_e=0,72$); profilul terpenic: *β -cariofilen/germacren D/sabinen/oxid de cariofilen/ τ -gurjunen*;
- **Or5** – cea mai înaltă variație individuală după *lungimea ramurii* ($CV>30$); valori comparativ mai mici de polifenoli totali cu 25-40%, cu 18-47% a acizilor polifenolcarboxilici și conținut procentual egal al monoterpenelor și sesquiterpenelor, valori cantitative mici ale *acidului rozmarinic*; valori înalte ale conținutului transcripțiilor genelor investigate în frunze, a monoterpen-sintetazelor în flori și a indicilor de diversitate alelică ($A=44$; $N_A=4$; $N_E=2,82$; $PLP=91\%$); profilul terpenic: *β -cariofilen/ sabinen/germacren D/ cis- β -ocimen*;
- **Or6** – valori maxime ale *lungimii frunzelor* și minime a *numărului de frunze/nod*; conținutul cel mai înalt în polifenoli totali, acizilor polifenolcarboxilici și *acidului rozmarinic*; conținut procentual egal al monoterpenelor și sesquiterpenelor; nivel înalt al expresiei genelor investigate în frunze și doar a monoterpen-sintetazelor în flori; devieri semnificative ($F= -0,42$) de la EHW, indicând asupra unui exces de heterozigoție; profilul terpenic: *β -cariofilen/ sabinen/ germacren D/ oxid de cariofilen*;
- **Or7** – valori maxime pentru 6 parametri morfologici; valori mai mici cu 25-40% a polifenolilor totali, cu 47% a acizilor polifenolcarboxilici, cu 23-26% a monoterpenelor față de sesquiterpene; valori ridicate ale conținutului de transcripți în frunze; cea mai scăzută pondere a heterozigoților ($H_e=0,36$; $H_o=0,42$); profilul terpenic: *β -cariofilen/ germacren D/ oxid de cariofilen/ sabinen/ p-cimen*.

Concluzii la capitolul 7

Stabilirea asocierilor în variația diferitor variabile biologice a pus în evidență unele particularități corelative ale diversității molecular-genetice, chimice și morfologice a plantelor de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană:

1. Testele *Mantel* au relevat congruența variabilității intrapopulaționale a plantelor la nivelul unor parametri morfologici și metaboliți secundari. Astfel, variabilitatea subpopulațiilor de *O. vulgare* după conținutul în sesquiterpene (13 compuși, concentrații $<12\%$) este determinată de variația valorilor medii ale *lungimii frunzei* și a *ramurilor* ($r(AB)=0,52$). Spre deosebire de conținutul în sesquiterpene,

cel al monoterpenelor (19 compuși, concentrații <8%) nu variază semnificativ la plantele cu diferite valori ale acestor doi parametri morfologici *lungimea frunzei* și *a ramurilor* în combinație cu *numărului de ramuri/plantă* ($r(AB) = -0,45$).

2. Analiza corelativă *Spearman* a pus în evidență corelații medii, pozitive ($r_s = 0,75$) a *lungimii ramurilor* cu *p-cimenu* și negative cu *sabinenu* ($r_s = -0,71$) și *cis-β-ocimenu* ($r_s = -0,71$). Corelații negative s-au constatat și pentru *diametrul tulpinii* în pereche cu sesquiterpena *oxidul de cariofilen* ($r_s = -0,68$). Valorile acestui parametru morfologic corelează pozitiv cu conținutul procentual a două monoterpene, precursori ai *carvacrolului* și *timolului*: *γ-terpinen* ($r_s = 0,71$) și *cis-β-ocimenu* ($r_s = 0,68$), dar și cu un compus sesquiterpenic *germacren D* ($r_s = 0,86$). Dependente corelative pozitive au fost constatate și în cazul parametrului morfologic *nr. noduri/tulpină* cu conținutul a patru compuși terpenici: *γ-terpinen* ($r_s = 0,68$), *germacren D* ($r_s = 0,71$), *β-bisabolen* ($r_s = 0,86$) și *τ-gurjunen* ($r_s = 0,71$).

3. Corelațiile medii pozitive ($r(AB) = 0,51$) între matricile de disimilaritate moleculară și expresie relativă a terpen-sintetazelor demonstrează o tendință de modificare în activitatea de transcripție a monoterpen-sintetazelor în flori (*Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5*, *Ovtps7*) în funcție de variația frecvenței alelelor locilor SSR în genomul plantelor.

4. Variația nivelului de expresie a 7 terpen-sintetaze în flori este convergentă cu variația frecvenței alelice a locilor OR40 ($r(AB) = 0,49$) și OR44 ($r(AB) = 0,50$) în subpopulații. La nivelul frunzelor s-au evidențiat, de asemenea, locusul OR40 în combinație cu OR64 a căror frecvență alelică influențează conținutul sesquiterpen-sintetazelor (*Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps6*) ($r(AB) = 0,43$).

5. A fost constatată o variație relativ scăzută ($r(AB) = -0,37$, $p = 0,04$) a valorilor cantitative a 9 compuși terpenici (*sabinen*, *p-cimenu*, *cis-β-ocimenu*, *γ-terpinen*, *β-cariofilen*, *τ-gurjunen*, *β-bisabolen*, *oxid de cariofilen*, *germacren D*) în subpopulații cu diferită frecvență alelică a 9 din 11 loci SSR, fapt ce confirmă stabilirea corectă a chemovarietății generale a populației.

6. Un coeficient de corelație pozitivă, puternică ($r(AB) = 0,82$) s-a identificat între variația compușilor monoterpenici (20) și sesquiterpenici (15) identificați în plantele din habitatul natural.

7. Congruența matricilor de disimilaritate după conținutul în transcripti al terpen-sintetazelor și compușilor terpenici, constatată în cadrul prezentei lucrări, indică asupra unui mecanism de control a biosintezei acestora la nivel de transcripti, care în aspect aplicativ, ar avea un rol de marker în selecția plantelor potențial bogate în compuși terpenici de interes.

8. Au fost identificate unele particularități specifice subpopulațiilor la nivelul parametrilor morfologici, moleculari și biochimici, asocieri pe bază de similaritate într-o măsură mai mare sau mai mică a subpopulațiilor: Or2 și Or1; Or3, Or4 și Or5; Or6 și Or7, acestea din urmă fiind cele mai diferite.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

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 (OR09GST= 0,42, OR14GST= 0,34, OR64GST= 0,55 și OR81GST= 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. CALALB, T., CHIȚAN, E. Unele aspecte structurale și fitochimice ale speciei *Cynara scolymus* L. din colecția Centrului de cultivare a plantelor medicinale a USMF „Nicolae Testemițanu”. În: *Analele științifice ale USMF „N. Testemițanu”*. 2008, vol. 1, pp. 332-336. ISSN: 1857-1719.
2. CARAGHIAUR, T., PISOV, M., CIOBANU, V. Variabilitatea caracterilor în descendența generativă F3 a *Mentha rotundifolia* (L.) Huds. În: *Studia Universitatis Moldaviae, Științe ale naturii*. 2010, nr. 1(31), pp. 13-17. ISSN 1857-1735.
3. CASIAN, I., CASIAN, A., UNGUREANU, I. Evaluarea compoziției substanțelor fenolice ale unor specii de plante din familia *Lamiaceae*. În: *Analele științifice ale IP USMF “N. Testemițanu”, ed. a 9-a. Chișinău: CEP Medicina*. 2013, vol. 1: Probleme medico-biologice și farmaceutice, pp. 379-382. ISSN: 1857-1719.
4. CIOBANU, N. și al. Evaluarea fitochimică a uleiului volatil de busuioc. În: *Buletinul AȘM. Științe Medicale*. 2010, nr. 1(24), pp. 74-77. ISSN 1857-0011.
5. CIOBANU, V. și al. Polimorfismul biochimic la plantele genului *Mentha*. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Științe reale și ale naturii*. 2012, nr. 6(56), pp. 10-15. ISSN 1814-3237.
6. COTELEA, L. Selectarea formelor parentale pentru crearea hibrizilor de perspectivă de *Salvia sclarea* L. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2009, nr. 3(309), pp. 96-102. ISSN 1857-064X.
7. DICU, T., POPESCU, I. D., COSMA, C. Determinarea activității antioxidante a unor extracte naturale din plante. În: *Ecoterra*. 2009, nr. 22-23, pp. 10-11. ISSN online 2248-3128.
8. 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. ISSN 1857-064X.
9. GONCEARIUC, M., BALMUȘ, Z., COTELEA, L. Perfecționarea calității la *Salvia sclarea* L. prin creșterea capacității de acumulare a uleiului esențial. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2016, nr. 2(329), pp. 69-78. ISSN 1857-064X.
10. GONCEARIUC, M. și al. Caractere cantitative, conținutul și compoziția chimică a uleiului esențial la genotipuri noi de *Ocimum basilicum* L. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2011, vol. 1(313), pp. 62-72. ISSN 1857-064X.
11. HEMCINSCHI LUNGU, A. *Contribuții la studiul unor specii indigene de Galium și Ajuga*: rezumat. tz. de doct. șt. farmacologice. Iași, 2010. 56 p.
12. MARTEA, R. *Variabilitatea genotipică-moleculară la genotipurile de Salvia sclarea* L.:

- autoref. tz. de doct. în științe biologice. Chișinău, 2016. 30 p.
13. MĂRUȘTERI, M. Ș. *Noțiuni fundamentale de biostatistică: note de curs*. Târgu-Mureș: University Press. 2006, 218 p.
 14. MIRON, A., STĂNESCU, U. *Antioxidanții naturali - între medicament și aliment*. Iași: Ed. UMF „Gr. T. Popa”, 2003. 112 p. ISBN 973-7906-22-5.
 15. 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.
 16. 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. ISSN online 1857-498X.
 17. 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. ISSN online 1857-498X.
 18. 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.
 19. NEGRU, A. *Determinator de plante din flora Republicii Moldova*. Chișinău: Universul, 2007, 391 p. ISBN 978-9975-47-007-0.
 20. POPESCU, A. *Genetică*. Editura Universității din Pitești, 2013. ISBN 978-973-744-288-8.
 21. 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. ISSN 1857-064X.
 22. 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. ISSN 1857-064X.
 23. POSTICĂ, Gh. *Peisajul Cultural Orheiul Vechi*. Chișinău: CEP USM, 2010, 138 p. ISBN 978-9975-71-016-9.
 24. STRATEGIA privind diversitatea biologică a Republicii Moldova pentru anii 2015-2020. Disponibil: http://gov.md/sites/default/files/document/attachments/intr02_21.pdf, [Accesat la 06.04.2017].
 25. ABDALLAH, H. M. et al. Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activities of

- various extracts from leaves and stems of *Chrozaphora tinctoria*. In: *Phytochemistry Letters*. 2015, vol. 13, pp. 74-80.
26. ABOUKHALID, K. et al. Analysis of genetic diversity and population structure of the endangered *Origanum compactum* from Morocco, using SSR markers: Implication for conservation. In: *Biological Conservation*. 2017, vol. 212, pp. 172-182.
 27. ABUSHADY, H. M., EL-SHATOURY, E. H., ABD-ELMEGEED, AL-S. S. Biological activity of *Curcuma longa* and *Origanum marjorana*, cultivated in Egypt. In: *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*. 2017, vol. 5(2), pp. 126-137.
 28. AFSHARYPUOR, S., SAJJADI, S. E., MANESH, M. E. Volatile constituents of *Origanum vulgare* ssp. *viride* (syn.: *O. heracleoticum*) from Iran. In: *Planta Medica*. 1997, vol. 63, pp. 179-180.
 29. AGIOMYRGIANAKI, A., DAIS, P. Simultaneous determination of phenolic compounds and triterpenic acids in oregano growing wild in Greece by ³¹P NMR spectroscopy. In: *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2012, vol. 50(11), pp. 739-748.
 30. AKEEL, R. N. et al. Genetic variation between and among *Origanum syriacum* L. and *Origanum majorana* L. populations collected from different locations in Jordan using RAPD marker. In: *Journal of Crop Research*. 2009 vol. 38(1,2,3), pp. 245-257.
 31. AMAR, H. M., WAHAB EL, A. M. Comparative genetic study among *Origanum* L. plants grown in Egypt. In: *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 2013, vol. 3(12), pp. 208-222.
 32. ANDERSON, J. A. et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. In: *Genome*. 1993, vol. 36(1), pp.181-186.
 33. ANDI, S. A. et al. Morphological diversity of wild *Origanum vulgare* (*Lamiaceae*) in Iran. In: *The Iranian Journal of Botany*. 2011, vol. 17, pp. 88-97.
 34. ARNOLD, N., BELLOMARIA, B., VALENTINI, G. Composition of the essential oil of three different species of *Origanum* in the Eastern Mediterranean. In: *Journal of Essential Oil Research*. 2000, vol. 12, pp. 192-196.
 35. ARUOMA, O. I. et al. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs. In: *Food and Chemical Toxicology*. 1996, vol. 34(5), pp. 449-456.
 36. ARYA, V., YADAV, S., YADAV, J. P. Intra-specific genetic diversity of different accessions of *Cassia occidentalis* by RAPD markers. In: *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*. 2011, vol. 22, pp. 1-8.
 37. ASCENSAO, L., MOTA, L., CASTRO, M. D. M. Glandular trichomes on the leaves and

- flowers of *Plectanthurus ornatus*: Morphology, distribution and histochemistry. In: *Annals of Botany*. 1999, vol. 84, pp. 437-447.
38. ASHRAF, S. A. et al. In-vitro antimicrobial activity and identification of bioactive components using GC–MS of commercially available essential oils in Saudi Arabia. In: *Journal of Food Science and Technology*. 2017, vol. 54(12), pp. 3948-3958.
 39. AUBOURG, S., LECHARNY, A., BOHLMANN, J. Genomic analysis of the terpenoid synthase (*AtTPS*) gene family of *Arabidopsis thaliana*. In: *Molecular Genetics and Genomics*. 2002, vol. 267, pp. 730-745.
 40. AYANOĞÇU, F., ERGÜL, A., ARSLAN, M. Assessment of genetic diversity in Turkish oregano (*Origanum onites* L.) germplasm by AFLP analysis. In: *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2006, vol. 81(1), pp. 45-50.
 41. 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.
 42. AZIZI, A. et al. Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. In: *Plant Systematics and Evolution*. 2009, vol. 281, pp. 151-160.
 43. AZIZI, A., WAGNER, C., HONERMEIER, B. Statistical analysis of the associations between phenolic monoterpenes and molecular markers, AFLPs and SAMPLs in the spice plant Oregano. In: *Herba Polonica Journal*. 2016, vol. 62(2), pp. 42-56.
 44. AZIZI, A., YAN, F., HONERMEIER, B. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. In: *Industrial crops and products*. 2009, vol. 29, pp. 554-561.
 45. 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.
 46. BARBOSA, P. et al. Bioassays against pinewood nematode: assessment of a suitable dilution agent and screening for bioactive essential oils. In: *Molecules*. 2012, vol. 17, pp. 12312-12329.
 47. BARDAKCI, F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. In: *Turkish Journal of Biology*. 2001, vol. 25, pp. 185-196.
 48. BARIČEVIČ, D., BARTOL, T. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus. 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.

177-213.

49. BEJAOU, A., BOULILA, A., BOUSSAID, M. Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. In: *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013, vol. 7, pp. 2429-2435.
50. BERGHOLD, H. et al. Yield, content and composition of the essential oil of five Oregano strains (*Origanum vulgare* L.) depending on the developmental stage. In: *Journal of Medicinal & Spice Plants*. 2008, vol. 13, pp. 36-43.
51. BISIO, A. et al. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling grown in Italy. In: *Annals of Botany*. 1999, vol. 83, pp. 441-452.
52. BITTNER, M. C. C. et al. Effects of essential oils from five plant species against the granary weevils *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). In: *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2008, vol. 53(1), pp. 1455-1459.
53. BOSABALIDIS, A. M. Cultivation of Oregano. 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. 11-58.
54. BOSKOVIC, M. et al. Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. In: *Procedia Food Science*. 2015, vol. 5, pp. 18-21.
55. BOURETT, T. M. et al. Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. In: *International Journal of Plant Sciences*. 1994, vol. 155, pp. 623-632.
56. BOWER, A. M. et al. Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, vol. 62(26), pp. 6147-6158.
57. BOZARI, S. et al. Toxic Effects of Essential Oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* Against to *Zea mays* Seedlings. In: *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2014, vol. 17(1), pp. 67-77.
58. BRUNI, A., MODENESI, P. Development, oil storage and dehiscence of peltate trichomes in *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). In: *Nordic Journal of Botany*. 1983, vol. 3(2), pp. 245-251.
59. CAMPOS-VEGA, R., OOMAH, B. D. Chemistry and classification of phytochemicals. In: *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*. Publisher: Wiley-Blackwell, 2013. pp. 5-48.
60. CHALCHAT, J. C., PASQUIER, B. Morphological and chemical studies of *Origanum* clones: *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*. In: *Journal of Essential Oil Research*. 1999, vol. 10, pp. 119-125.

61. CHANG, T. S. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. In: *Materials*. 2012, vol. 5, pp. 1661-1685.
62. CHARAI, M., MOSADDAK, M., FAID, M. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. In: *Journal of Essential Oil Research*. 1996, vol. 8(6), pp. 657-664.
63. CHEN, F. et al. Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene *1,8-cineole*. In: *Plant Physiology*. 2004, vol. 135, pp. 1956-1966.
64. CHEN, F. et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. In: *The Plant Journal*. 2011, vol. 66, pp. 212-229.
65. CHEN, X. et al. Terpene synthase genes in eukaryotes beyond plants and fungi: Occurrence in social amoebae. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, vol. 113(43), pp. 12132-12137.
66. CHENG, A. X. et al. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. In: *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007, vol. 49, pp. 179-186.
67. CIOCARLAN, N. Family *Lamiaceae*: main important spontaneous medicinal and aromatic species in the Republic of Moldova. In: *Jurnal of Botany*. 2016, vol. VIII, nr. 1(12), pp. 86-91.
68. CIOCARLAN, N. *Mentha gattefossei* Maire – a threatened medicinal species cultivated in the Botanical Garden (I) of ASM. In: *Mediul Ambient*. 2014, nr. 2(74), pp. 19-22.
69. CLEFF, M. B. et al. *In Vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. In: *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, vol. 41(1), pp. 116-123.
70. COLE, C. T. Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*). In: *New Phytologist*. 2005, vol. 167(1), pp. 155-164.
71. CORDELL, S. et al. Physiological and morphological variation in *Metrosidero polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: The role of phenotypic plasticity. In: *Oecologia*. 1998, vol. 113, pp. 188-196.
72. 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.
73. CRUZAN, M. B. Genetic markers in plant evolutionary ecology. In: *Ecology*. 1998, vol. 79, pp. 400-412.
74. CSERHÁTI, B. et al. In situ morphological variability of wild marjoram (*Origanum vulgare*

- L.) populations in Hungary. In: *Acta Alimentaria*. 2012, vol. 41 (Suppl), pp. 12-23.
75. D'ANTUONO, L. F., GALLETI, G. C., BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). In: *Annals of Botany*. 2000, vol. 86, pp. 471-478.
76. DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N., POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, vol. 48(6), pp. 2576-2581.
77. DAGDEMIR, E., CAKMAKCI, S., GUNDOGDU, E. Effect of *Thymus haussknechtii* and *Origanum acutidens* essential oils on the stability of cow milk butter. In: *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2009, vol. 111(11), pp. 1118-1123.
78. DANIN, A. Two new species of *Origanum* (Labiatae) from Jordan. In: *Willdenowia*. 1990, vol. 19, pp. 15-26.
79. DANIN, A., KÜNNER, I. *Origanum jordanicum* (Labiatae), a new species from Jordan, and notes on other species of sect. *Campanulaticalyx*. In: *Willdenowia*. 1996, vol. 25, pp. 601-611.
80. DAVIDENCO, V. et al. Development in *Origanum* ssp.: A simple phenological scale to determine thermal time requirements to critical reproductive events. In: *Scientia Horticulturae*. 2015, vol. 186, pp. 70-76.
81. DAVIDENCO, V. et al. Floral transition in *Origanum vulgare* L.: anatomical analysis across phenological stages in response to different photoperiodic regimes. In: *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2014, vol. 74, pp. 349-354.
82. DAVIS, E. M., CROTEAU, R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: *Topics in Current Chemistry: Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*. Edited by LEEPER, F. J., VEDERAS, J. C. Springer-Verlag, 2000. vol. 209, pp. 53-95.
83. DEBNATH, S. C. Development of ISSR markers for genetic diversity studies in *Vaccinium angustifolium*. In: *Nordic Journal of Botany*. 2009, vol. 27, pp. 141-148.
84. DEGENHARDT, J., KÖLLNER, T. G., GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. In: *Phytochemistry*. 2009, vol. 70, pp. 1621-1637.
85. DEMISSIE, Z. A. et al. Cloning, functional characterization and genomic organization of *l,8-cineole* synthases from *Lavandula*. In: *Plant Molecular Biology*. 2012, vol. 79, pp. 393-411.
86. DINIZ-FILHO, J. A. F. et al. Mantel test in population genetics. In: *Genetics and Molecular Biology*. 2013, vol. 36, nr. 4, pp. 475-485.

87. DIRMENCI, T. et al. A new species and a new natural hybrid of *Origanum* L.(*Lamiaceae*) from the west of Turkey. In: *Turkish Journal of Botany*. 2018, vol. 42(1), pp. 73-90.
88. DOCIC, M., BILKEI, G. Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics. In: *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 2003, vol. 50, pp. 27-30.
89. DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2000, vol. 88(2), pp. 308-316.
90. DRAGOEVA, P. A. et al. Allelopathy of Cold Water Extracts from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. In: *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*. 2014, vol. 23(6), pp. 914-924.
91. DUCA, M. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among populations of the *Hypericum perforatum* L. in R. Moldova. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2012, nr. 1(316), pp. 104-110.
92. DUDAREVA, N. et al. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. In: *Plant Cell*. 2003, vol. 15, pp. 1227-1241.
93. DUKE, J. A. Biting the biocide bullet. In JAMES, L.F. et al. eds. *Proceedings of the Third International Symposium, Poisonous plants*. 1992, pp. 474-478.
94. DUMAN, H., BASER, K. H. C., AYTEC, Z. Two new species and a new hybrid from Anatolia. In: *Turkish Journal of Botany*. 1998, vol. 22, pp. 51-55.
95. DURAND, J. E. et al. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. In: *BMC Genomics*. 2010, vol. 11, pp. 570.
96. ELEZI, F. et al. Genetic variation of oregano (*Origanum vulgare* L.) for etheric oil in Albania. In: *Agricultural Sciences*. 2013, vol. 4, nr. 9, pp. 449-454.
97. ELSHAFIE, H. S. et al. Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit. In: *Journal of Medicinal Food*. 2015, vol. 18(8), pp. 929-934.
98. ERENLER, R. et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016, vol. 96(3), pp. 822-836.
99. FARÍAS, G. et al. Morphological, yielding and quality descriptors of four clones of *Origanum* spp. (*Lamiaceae*) from the Argentine Littoral region Germplasm bank. In: *Industrial Crops and Products*. 2010, vol. 32(3), pp. 472-480.
100. FARRIS, J. S. On the cophenetic correlation coefficient. In: *Systematic Zoology*. 1969, vol.

- 18(3), pp. 279-285.
- 101.FERRÉ, L. Selection of components in principal component analysis: A comparison of methods. In: *Computational Statistics & Data Analysis*. 1995, vol. 19(6), pp. 669-682.
- 102.FIGUÉRÉDO, G., CHALCHAT, J. C., PASQUIER, B. Studies of Mediterranean Oregano Populations IX: Chemical Composition of Essential Oils of Seven Species of Oregano of Various Origins. In: *Journal of essential oil research*. 2006, vol. 18, pp. 411-415.
- 103.FOUAD, R. et al. Chemical composition and herbicidal effects of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Eucalyptus cladocalyx*, *Origanum vulgare* L and *Artemisia absinthium* L. cultivated in Morocco. In: *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2015, vol. 18(1), pp. 112-123.
- 104.FOURNOMITI, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae*. In: *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2015, vol. 26, pp. 1-7.
- 105.FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids in nepalese propolis is attributed to inhibition of the il-33 signaling pathway. In: *International Immunopharmacology*. 2015, vol. 25, pp. 189-198.
- 106.*Genetic diversity analysis with molecular marker data: Learning module. Measures of genetic diversity.* IPGRI and Cornell University, 2003. Vol. 2, 71 p. https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_en.pdf
- 107.GEWERS, F. L. et al. Principal Component Analysis: A Natural Approach to Data Exploration. In: *Computational Engineering, Finance, and Science (cs.CE)*. 2018. <https://arxiv.org/pdf/1804.02502>.
- 108.GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of *beta-caryophyllene*. In: *Farmaco*. 2001, vol. 56(5), pp. 387-389.
- 109.GIATROPOULOS, A. et al. Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 *Lamiaceae* essential oils against *Aedes albopictus*. In: *Parasitology Research*. 2018, vol. 117(6), pp. 1953-1964.
- 110.GILL, B. S. et al. Triterpenes in cancer: significance and their influence. In: *Molecular Biology Reports*. 2016, vol. 43(9), pp. 881-896.
- 111.GILLING, D. H. et al. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2014, vol. 116(5), pp. 1149-1163.

112. GIULIANI, C. et al. Congruence of phytochemical and morphological profiles along an altitudinal gradient in *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* from Venetian Region (NE Italy). In: *Chemistry & Biodiversity*. 2013, vol. 10, pp. 569-583.
113. GIXHARI, B. et al. Geographic distribution and diversity assessment in *ex situ* collection of albanian medicinal plants. In: *The 8th CMAPSEEC: Book of abstracts*. Albania: Durres, 2014, pp. 51-58.
114. GONCEARIUC, M. et al. Biochemical diversity of the *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart genotypes from Moldova. In: *Buletinul AȘM, Științele vieții*. 2015, nr. 2 (326), pp. 92-100.
115. GONCEARIUC, M. et al. Creating and evaluating the new *Ocimum basilicum* L. genotypes. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2008, nr. 1(304), pp. 94-100.
116. GONCEARIUC, M. et al. Essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart from Moldova: content and chemical composition. In: *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2014, vol. 3(2), pp. 659-663.
117. GONCEARIUC, M., BALMUȘ, Z. Diversity of the essential oil content and chemical composition of *Hyssopus officinalis* L. genotypes. In: *Muzeul Olteniei Craiova. Studii și comunicări. Științele Naturii*. 2013, vol. 29, nr. 1, pp. 171-178.
118. GONZALEZ-QUEVEDO, C. et al. Drift, not selection, shapes toll-like receptor variation among oceanic island populations. In: *Molecular Ecology*. 2015, vol. 24, pp. 5852-5863.
119. GOTO, T. et al. Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism. In: *PPAR Research*. 2010, pp. 1-9.
120. GOUNARIS, Y. et al. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 2002, vol. 30, pp. 249-258.
121. GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. et al. Flavonoids and phenolic acids from Oregano: occurrence, biological activity and health benefits. In: *Plants*. 2017, vol. 7(1), no. 2, pp. 1-23.
122. HAE-YOUNG, K. Statistical notes for clinical researchers: *posr-hoc* multiple comparisons. In: *Restorative Dentistry & Endodontics*. 2015, vol. 40(2), pp. 172-176.
123. HAMRICK, J. L., GODT M. J. Allozyme diversity in plant species. In BROWN, A. H. D. et al. eds. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer: Sunderland, 1989. pp. 43-63.
124. HARTL, D. L., CLARK, A. G. *Principles of Population Genetics*. Vol. 116. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 1997, 545 p.

- 125.HOSSAIN, M. B. et al. Characterization of phenolic composition in *Lamiaceae* spices by LC-ESI-MS/MS. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, vol. 58, pp. 10576-10581.
- 126.HOUMANI, Z. et al. The essential oil composition of Algerian zaatar: *Origanum* spp. and *Thymus* spp. In: *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 2002, vol. 9, pp. 275-280.
- 127.HU, J., WANG, L., LI, J. Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. In: *Biologia Plantarum*. 2011, vol. 55, pp. 577-580.
- 128.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.
- 129.IBRAHIM, S. K., IBRAHIM, L., CHOUEIRY, I. The occurrence of burrowing nematodes on banana in Lebanon and their control using plant extracts and essential oil of *Origanum* sp. In: *World Research Journal of Entomology and Nematology*. 2012, vol. 1(1), pp. 01-06.
- 130.IETSWAART, J. H. *A Taxonomie Revision of the Genus Origanum (Labiatae)*. In: Leiden Botanical Series: Leiden University Press. 1980, vol. 4, 153 p.
- 131.IIJIMA, Y. et al. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. In: *Plant Physiology*. 2004, vol. 134(1), pp. 370-379.
- 132.INCE, A. G., KARACA, M., ELMASULU, S. Y. New microsatellite and CAPS-microsatellite markers for clarifying taxonomic and phylogenetic relationships within *Origanum* L. In: *Molecular Breeding*. 2014, vol. 34(2), pp. 643-654.
- 133.IRMISCH, S. et al. The organ-specific expression of terpene synthase genes contributes to the terpene hydrocarbon composition of chamomile essential oils. In: *BMC Plant Biology*. 2012, vol. 12(84), pp 1-13.
- 134.IVASK, K. et al. Composition of the essential oil from wild marjoram (*Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*) cultivated in Estonia. In: *Journal of Essential Oil Research*. 2005, vol. 17(4), pp. 384-387.
- 135.JARNE, P., LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. In: *Trends in Ecology & Evolution*. 1996, vol. 11, p. 424-429.
- 136.JOLLIFFE, I. T, CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2016, p. 1-16.
- 137.JOSHI, P. K. et al. Chemical, biocidal and pharmacological aspects of *Origanum* species : A brief review. In: *Journal of the Indian Chemical Society*. 2015, vol. 92(11), pp. 1603-1615.
- 138.JULLIEN, F. et al. Isolation and functional characterization of a τ -*cadinol synthase*, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia*. In: *Plant Molecular Biology*. 2014, vol.

- 84(1-2), pp. 227-241.
- 139.KADIASI, N. et al. Field studies of variability of *Origanum vulgare* L. based in some important quantitative and qualitative parameters. In: *Albanian Journal of Agricultural Sciences*. 2016, special. edition, pp. 115-120.
- 140.KADIASI, N. et al. Representativeness of oregano *Origanum vulgare* (L.) accesions stored in Abanian Genebank. In: *Book of Abstracts „New trends in the ecological and biological Research” International Scientific Conference*. Slovak Republic: University of Prešov, 2015, pp. 71-77.
- 141.KADIASI, N. et al. Variability of the essential oil composition in *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* collected in Albania. In: *Albanian Journal of Agricultural Sciences*. 2018, vol. 17(1), pp. 91-97.
- 142.KAO, W. Y., TSAI, T. T., CHEN, W. H. A comparative study of *Miscanthus floridulus* (Labill) Warb and *M. transmorrisonensis* Hayata: photosynthetic gas exchange, leaf characteristics and growth in controlled environments. In: *Annals of Botany*. 1998, vol. 81, pp. 295-299.
- 143.KARAN, T. et al. Chemical composition and insecticidal activity of *Origanum syriacum* L. essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica*. In: *International Journal of Secondary Metabolite*. 2018, vol. 5(2), pp. 87-93.
- 144.KARAN, T., SIMSEK, S. Phytochemical composition and insecticidal effect of essential oil from *Origanum vulgare* L. In: *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences*. 2018, vol. 8, pp. 19-23.
- 145.KATSIOTIS, A., NIKOLOUDAKIS, N., LINOS, A. Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intragenetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. In: *Scientia Horticulturae*. 2009, vol. 121, pp. 103-108.
- 146.KEELING, C. I., BOHLMANN, J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. In: *New Phytologist*. 2006, vol. 170, pp. 657-675.
- 147.KELLER, L. F., WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. In: *Trends in Ecology & Evolution*. 2002, vol. 17(5), pp. 230-241.
- 148.KETTENRING, J. R. The practice of cluster analysis. In: *Journal of Classification*. 2006, vol. 23, pp. 3-30.
- 149.KHEYR-POUR, A. Wide nucleo-cytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare* L. In: *Journal of Heredity*, 1981, vol. 72(1), pp. 45-51.
- 150.KILIC, O., ÖZDEMİR, F. A. Variability of essential oil composition of *Origanum vulgare* L.

- subsp. *gracile* populations from Turkey. In: *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016, vol. 19(8), pp. 2083-2090.
151. KITIKI, A. Status of cultivation and use of oregano in Turkey. In: *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEA*. 8-12 May 1996, Valenzano (Bari): Italy, pp. 122-132.
152. KLOCKE, E. et al. DNA Fingerprinting by RAPD on *Origanum majorana* L. In: *Journal of herbs spices and medicinal plants*. 2002, vol. 9, pp. 171-176.
153. 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.
154. KOH, H. J., KWON, S. Y., THOMSON, M. *Current technologies in plant molecular breeding*. New York, London: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2015. 352 p.
155. KOKKINI, S. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In: PADULOSI, S. eds. *Oregano, 14. Proceedings of IPGRI International workshop*. Italy: Rome, 1997, pp. 2-12.
156. KÖLLNER T. G. et al. The sesquiterpene hydrocarbons of maize (*Zea mays*) form five groups with distinct developmental and organ-specific distribution. In: *Phytochemistry*. 2004, vol. 65(13), pp. 1895-1902.
157. 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.
158. KULA, J. et al. Chemical composition of *Origanum vulgare* L. essential oil from Bulgaria. In: *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2007, vol. 10, pp. 215-220.
159. LIANG, C. H., CHOU, T. H., DING, H. Y. Inhibition of melanogenesis by a novel organoside from *Origanum vulgare*. In: *Journal of Dermatological Science*. 2010, vol. 57(3), pp. 170-177.
160. LIČINA, B. Z. et al. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. In: *Food Control*. 2013, vol. 33, pp. 498-504.
161. LIMA, A. S. et al. Genomic characterization, molecular cloning and expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespitius* (Lamiaceae). In: *Planta*. 2013, vol. 238(1), pp. 191-204.
162. LIVAK, J. K., SCHMITTGEN, D. T. Analysis of relative gene expression data using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta T}$ Method. In: *Methods*. 2001, vol. 25, pp. 402-408.
163. LOOY, K. V. et al. Effects of flood events on the genetic structure of riparian populations of

- the grassland plant *Origanum vulgare*. In: *Biological Conservation*. 2009, vol. 142(4), pp. 870-878.
- 164.LUKAS, B. *Molecular and phytochemical analyses of the genus Origanum L. (Lamiaceae)*. dissertation. Dissertationsgebiet (lt. Studienblatt):Botanik. Wien: Austria, 2010. 183 p.
- 165.LUKAS, B., NOVAK, J. The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*). In: *Gene*. 2013, vol. 528(2), pp. 163-169.
- 166.LUKAS, B., SCHMIDERER, C., NOVAK, J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*). In: *Phytochemistry*. 2015, vol. 119, pp. 32-40.
- 167.MAFFEI, M., CHIALVA, F., SACCO, T. Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. I. Variation of peltate trichome number and terpene distribution within leaves. In: *New Phytologist*. 1989, vol. 111, pp. 707-716.
- 168.MAKKAR, 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.
- 169.MAKRI, O. Structural features of *Origanum* sp. 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. 153-162.
- 170.MANNINO, G., ABDI, G., MAFFEI, M. E., BARBERO, F. *Origanum vulgare* terpenoids modulate *Myrmica scabrinodis* brain biogenic amines and ant behaviour. In: *PLoS One*. 2018, vol. 13, pp. 1-12.
- 171.MARIESCHI, M. et al. RAPD-based method for the quality control of mediterranean Oregano and its contribution to pharmacognostic techniques. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, vol. 57, pp. 1835-1840.
- 172.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), pp. 125-131.
- 173.MARTIN, D. M., FALDT, J., BOHLMANN, J. Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. In: *Plant Physiology*. 2004, vol. 135, pp. 1908-1927.
- 174.MARTINS, N. et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. In: *Food Chemistry*. 2014, vol. 158, pp. 73-80.
- 175.MASI, L. et al. Assessment of agronomic chemical and genetic variability in common basil

- (*Ocimum basilicum* L.). In: *Bruna Laratta European Food Research and Technology*. 2006, vol. 223, nr. 2, pp. 273-281.
- 176.MASON, A. S. SSR Genotyping. In: BATLEY, J. ed. *Plant Genotyping*. New York: Springer, NY. 2015, pp. 77-89.
- 177.MASTRO, G. D. et al. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. In: *Food Chemistry*. 2017, vol. 235, pp. 1-6.
- 178.MASTRO, G. D., RUTA, C., MARZI, V. Agronomic and technological assessment of oregano (*Origanum vulgare* ssp.) Biotypes. In: *Acta Horticulturae*. 2004, vol. 629, pp. 355-364.
- 179.MCDONALD, T. A. et al. Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukaemia. In: *Leukemia*. 2001, vol. 15, pp. 10-20.
- 180.MECHERGUI, K. et al. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010, vol. 90, pp. 1745-1749.
- 181.MECHERGUI, K. et al. Genetic structure and differentiation among oregano [*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart] provenances from North Africa: bioinformatic approaches cause systematic bias. In: *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2017, vol. 64(4), pp. 717-732.
- 182.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.
- 183.MELEGARI, M. et al. Chemical characterization of essential oils of some *Origanum vulgare* L. subspecies of various origin. In: *Rivista Italiana EPPOS*. 1995, vol. 16, pp. 21-29.
- 184.MIROSSAY, L., VARINSKÁ, L., MOJŽIŠ, J. Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, vol. 19(1), 27 p.
- 185.MOCKUTE, D., BERNOTIENE, G., JUDZENTIENE, A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). In: *Phytochemistry*. 2001, vol. 57(1), pp. 65-69.
- 186.MOCKUTE, D., BERNOTIENE, G., JUDZENTIENE, A. The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* growing wild in Lithuania. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003, vol. 31, pp. 269-278.

- 187.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.
- 188.MORSHEDLOO, M. R. et al. Prolonged water stress on growth and constituency of Iranian of Oregano (*Origanum vulgare* L.). In: *Journal of Medicinally Active Plants*. 2016, vol. 5, pp. 7-19.
- 189.MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. In: *Food Chemistry*. 2001, vol. 72(2), pp. 145-171.
- 190.MUNOZ CENTENO, L. M. Plantas medicinales espanolas: *Origanum Vulgare* L. (*Lamiaceae*) (Oregano). In: *Acta Botanica Malacitana*. 2002, vol. 27, pp 273-280.
- 191.MURIEL-GALET, V. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of Oregano essential oil and green tea extract components. In: *Journal of Food Engineering*. 2015, vol. 149, pp. 9-16.
- 192.MURRAY, M. G., THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic Acids Research*. 1980, vol. 8(19), pp. 4321-4325.
- 193.MUTU, A. et al. Intraspecific genetic variability of *Hyssopus officinalis* L. In: *Analele Universității Al. I. Cuza din Iași, Genetică și Biologie Moleculară*. 2014, Tom XV, pp. 1-8.
- 194.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. 6, nr. 2(9), pp. 23-29.
- 195.NAGHIBI, F. et al. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. In: *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2005, vol. 2, pp. 63-79.
- 196.NAKIBOGLU, M. et al. Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. In: *Food Chemistry*. 2007, vol. 104, pp. 630-635.
- 197.NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973, vol. 70(12), part I, pp. 3321-3323.
- 198.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.
- 199.NURZYŃSKA-WIERDAK, R. et al. The composition of essential oil from three ecotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivated in Poland. In: *Farmacologia*. 2012, vol. 60(4), pp. 571-577.
- 200.OKA, Y. et al. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. In: *Phytopathology*. 2000, vol. 90(7), pp. 710-715.

201. OKE-ALTUNTAS, F. et al. Phytochemical screening, antiproliferative and antioxidant properties of various extracts from endemic *Origanum acutidens*. In: *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2018, vol. 21(4), pp. 281-291.
202. OLMEDO, R. H. et al. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavoured with oregano essential oil and olive oil. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009, vol. 89(12), pp. 2128-2136.
203. ONIGA, I. et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: chemical composition and biological studies. In: *Molecules*. 2018, vol. 23(8), pp. 2077-2091.
204. OZDEMIR, N. et al. Effect of different drying methods on the essential oil yield, composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* L. and *Origanum onites* L. In: *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017, vol. 12(2), pp. 820-825.
205. ÖZER, Z. et al. Effect of different drying methods and development stages on the essential oil chemical composition of aerial parts of *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Letsw. In: *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2018, vol. 21(4143), pp. 1-7.
206. PAPACHRISTOS, D., STAMOPOULOS, D. C. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). In: *Journal of Stored Products Research*. 2002, vol. 38, pp. 117-128.
207. PATEL, H. K. et al. Detection of genetic variation in *Ocimum* species using RAPD and ISSR markers. In: *3 Biotech*. 2015, vol. 5, pp. 697-707.
208. PAZOUKI, L., NIINEMETS, Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. In: *Frontiers in Plant Science*. 2016, vol. 7, pp. 1-16.
209. 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.
210. PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. In: *Philosophical Magazine*. 1901, vol. 2, pp. 559-572.
211. PERES-NETO, P. R., JACKSON, D. A., SOMERS, K. M. Giving meaningful interpretation to ordination axes: assessing loading significance in principal component analysis. In: *Ecology*. 2003, vol. 84, pp. 2347-2363.
212. PETERS, M. M. et al. Cytotoxicity and cell-proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(trisglutathion-Syl) hydroquinone. In: *Carcinogenesis*. 1997, vol. 18, pp. 2393-2401.
213. PEZZANI, R. et al. Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. In: *Phytochemistry Reviews*. 2017, vol. 16(6), pp. 1253-1268.

214. PORTER, C. L. *Taxonomy of Flowering Plants*. FREEMAN, W. H. and Company, California: San Francisco USA. 1967, 472 p.
215. POYRAZ, İ., SÖREN, E., ARSLANYOLU, M. Isolation of quality total RNA from the aromatic plant *Origanum onites*. In: *Zeitschrift für Naturforschung*. 2010, vol. 65c, pp. 266-270.
216. PRERNA, V. N. *Origanum majorana* L. - Phyto-pharmacological review. In: *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2015, vol. 6(4), pp. 261-267.
217. PRITCHARD, J. K. M., STEPHENS-DONNELL, Y. P. Inference of population structure using multilocus genotype data. In: *Genetics*. 2000, vol. 155, pp. 945-959.
218. PUTIEVSKY, E., NATIV, D., UZI, R. Cultivation, selection and conservation of oregano species in Israel. In: *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM*. 8-12 May 1996, Valenzano (Bari): Italy, pp. 103-110.
219. 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.
220. REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. In: *Integrated Pest Management Reviews*. 1997, vol. 2(1), pp. 25-34.
221. RO, D. K. et al. Microarray expression profiling and functional characterization of *AtTPS* genes: duplicated *Arabidopsis thaliana* sesquiterpene synthase genes *At4g13280* and *At4g13300* encode root-specific and wound-inducible (Z)-g-bisabolene synthases. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005, vol. 448(1-2), pp. 104-116.
222. ROCHA, J. et al. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. In: *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2014, vol. 116(5), pp. 398-413.
223. RUDOLPH, K. et al. Expression, crystallization and structure elucidation of γ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. In: *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*. 2016, vol. 72(1), pp. 16-23.
224. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.: New York, vol. I-III, 2001, 1885 p.
225. SANJAY, L., KINNARI, N. M., RIDDHI, T. Genetic diversity assessment in six medicinally important species of *Ocimum* from central Gujarat (INDIA) utilizing RAPD, ISSR and SSR markers. In: *International Journal of Advanced Biological Research*. 2012, vol. 2(2), pp. 279-288.
226. SAOWALUCK, B. I. et al. Molecular cloning and expression levels of the monoterpene synthase

- gene (ZMM1) in *Cassumunar ginger* (*zingiber montanum* (koenig) link ex dietr.). In: *Archives of Biological Science Belgrade*. 2014, vol. 66 (4), pp. 1321-1331.
- 227.SARAÇLI, S., DOĞAN, N., DOĞAN, İ. Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. In: *Journal of Inequalities and Applications*. 2013, vol. 203, pp. 2-8.
- 228.SARIKURKCU, C. et al. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. In: *Industrial Crops and Products*. 2015, vol. 70, pp. 178-184.
- 229.SARROU, E. et al. Conventional breeding of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and development of improved cultivars for yield potential and essential oil quality. In: *Euphytica*. 2017, vol. 213(104), pp. 1-16.
- 230.SARROU, E. et al. Evaluation of agronomical and qualitative characteristics of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) germplasm for breeding purposes. In: *Julius-Kühn-Archiv*. 2016, vol. 453, pp. 139-142.
- 231.SARROU, E. et al. Genetic diversity and metabolic profile of *Salvia officinalis* populations: implications for advanced breeding strategies. In: *Planta*. 2017, vol. 246, nr. 2, pp. 201-215.
- 232.SCHLÖTTERER, C. Microsatellites. In: HOELZEL, A.R. ed. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford University Press: New York, 1998, pp 237-261.
- 233.SCHMITZ, S., WEIDENBÖRNER, M., KUNZ, B. Herbs and spices as selective inhibitors of mould growth. In: *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel*. 1993, vol. 15(6), pp. 175-177.
- 234.SELLAMI, I. H. et al. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). In: *Industrial Crops and Products*. 2009, vol. 30(3), pp. 395-402.
- 235.SERVETTAZ, O. et al. Micromorphological and phytochemical research on *Teucrium scorodonia* and *Teucrium siculum* from the Italian flora. In: *Botanica Acta*. 1994, vol. 107, pp. 416-421.
- 236.SEYEDI, Z., SALMAKI, Y. Trichome morphology and its significance in the systematics of Phlomoides (*Lamiaceae*; *Lamioideae*; *Phlomideae*). In: *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 2015, vol. 213, pp. 40-48.
- 237.SHAFIEE-HAJIABAD, M., HARDT, M., HONERMEIER, B. Comparative investigation about the trichome morphology of common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) and greek oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*). In: *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2014, vol. 1(2), pp. 50-58.

238. SHAFIEE-HAJIABAD, M., NOVAK, J., HONERMEIER, B. Characterization of glandular trichomes in four *Origanum Vulgare* L. accessions influenced by light reduction. In: *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2015, vol. 88, pp. 300-307.
239. 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.
240. SHAN, B. et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, vol. 53(20), pp. 7749-7759.
241. SHANAIDA, M. et al. Antioxidant activity of essential oils obtained from aerial part of some Lamiaceae species. In: *International Journal of Green Pharmacy*. 2018, vol. 12(3), pp. 200-204.
242. SHEN, D. et al. LC-MS Method for the simultaneous quantitation of the anti-inflammatory constituents in oregano (*Origanum* species). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, vol. 58, pp. 7119-7125.
243. SINGH, P., KOTHIYAL, 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.
244. SINHA, S. et al. Assessment of microtubule depolymerization property of flavonoids isolated from *Tanacetum gracile* in breast cancer cells by biochemical and molecular docking approach. In: *Chemico-Biological Interactions*. 2015, vol. 239, pp. 1-11.
245. SIVICKA, I., ŽUKAUSKA, I., ADAMOVIČS, AL. Aspects of morphological diversity of oregano in Latvia. In: *Modern Phytomorphology*. 2013, vol. 4, pp. 61-64.
246. SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, vol. 44, pp. 1202-1205.
247. SKOULA, M. et al. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). In: *Phytochemistry*. 1999, vol. 52 (4), pp. 649-657.
248. 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.
249. SKWAREK, T. et al. Plant inducers of interferons. In: *Herba Polonica*. 1994, vol. 40(1-2), pp. 42-49.
250. SŁOWIANEK, M., LESZCZYŃSKA, J. Antioxidant properties of selected culinary spices. In: *Herba Polonica*. 2016, vol. 62(1), pp. 29-41.

- 251.ŠUŠTAR-VOZLIČ, J. Genetic variability of native populations of oregano in Slovenia. In: *Report of a Working Group on Medicinal and Aromatic Plants. First Meeting, 12-14 September, 2002*. Gozd Martuljek: Slovenia. pp. 147-149.
- 252.SZCZALBA, M. et al. Combined effect of chilling and light stress on the metabolic profile of *Origanum vulgare* L. in the juvenile stage. In: *Fresenius Environmental Bulletin*. 2019, vol. 28(5), pp. 3981-3990.
- 253.ŞİMŞEK, Ş. et al. Toxicity of some essential oils and plant extracts against *Sitophilus oryzae*, *Aconthocelides obtectus* and *Rhizoperta dominica*. In: *AIP Conference Proceedings*. 2017, vol. 1833(1), pp. 1-5.
- 254.TAŞCIOĞLU, T. et al. Molecular genetic diversity in the *Origanum* genus: EST-SSR and SRAP marker analyses of the 22 species in eight sections that naturally occur in Turkey. In: *Industrial Crops and Products*. 2018, vol. 123, pp. 746-761.
- 255.THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2015, vol. 148, pp. 63-106.
- 256.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.
- 257.THOLL, D., LEE, S. Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Arabidopsis Book: The American Society of Plant Biologists*, 2011, vol. 9, pp. 1-28.
- 258.TIWARI, K. L., JADHAV, S. K., KUMAR, A. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker based genetic relationship study of medicinal plants collected from tribal region of Chhattisgarh. India. In: *Research Journal of Biotechnology*. 2011, vol. 6(3), pp.63-66.
- 259.TONK, F. A. et al. Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. In: *Plant Systematics and Evolution*. 2010, vol. 288, pp. 157-165.
- 260.TSIMIDOU, M., PAPAVERGOU, E., BOSKOU, D. Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil. In: *Food Research International*. 1995, vol. 28(4), pp. 431-433.
- 261.VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Characterization of the phenolic and antioxidant profiles of selected culinary herbs and spices: caraway, turmeric, dill, marjoram and nutmeg. In: *Food Science and Technology (Campinas)*. 2015, vol. 35(1), pp. 189-195.
- 262.VAZIRIAN, M. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. In: *Resear Jour Pharmacognosy*. 2015, vol. 2(1), pp. 41-46.
- 263.VERES, K. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of four lines of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart. In: *Grown in Hungary Natural*

- Product Communications*. 2007, vol. 2, pp. 1155-1158.
264. VERES, K. et al. Investigation of the content and stability of essential oils of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *O. vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. In: *Chromatographia*. 2003, vol. 57, pp. 95-98.
265. VICENTE, M. C., LÓPEZ, C., FULTON, T. *Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 2004, 194 p.
266. VICHI, S. et al. Determination of the presence of antioxidants deriving from sage and oregano extracts added to animal fat by means of assessment of the radical scavenging capacity by photochemiluminescence analysis. In: *Nahrung*. 2001, vol. 45(2), pp. 101-104.
267. VIEIRA, M. L. C. et al. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. In: *Genetics and Molecular Biology*. 2016, vol. 39(3), pp. 312-328.
268. VIEIRA, R., GOLDSBROUGH, P., SIMON, J. E. Genetic diversity of basil (*Ocimum* spp.) based on RAPD markers. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2003, vol. 128, pp. 94-99.
269. VOKOU, D., KOKKINI, S., BESSIERE, J. M. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 1993, vol. 21, pp. 287-295.
270. W'GLARZ, Z. et al. Intraspecific variability of wild marjoram (*Origanum vulgare* L.) naturally occurring in Poland. In: *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2006, vol. 8, pp. 23-26.
271. WALLER, S. B. et al. Polar *Origanum vulgare* (*Lamiaceae*) extracts with antifungal potential against *Sporothrix brasiliensis*. In: *Medical Mycology*. 2018, vol. 56(2), pp. 225-233.
272. WEBER, J., WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. In: *Human Molecular Genetics*. 1993, vol. 2, pp. 1123-1128.
273. WERKER, E. et al. Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (*Lamiaceae*). In: *Annals of Botany*. 1993, vol. 71, pp. 43-50.
274. WERKER, E., PUTIEVSKY, E., RAVID, U. The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. In: *Annals of Botany*. 1985, vol. 55, pp. 793-801.
275. WERKER, E., RAVID, U., PUTIEVSKY, E. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in same species of the *Labiatae*. In: *Israel Journal of Botany*. 1985, vol. 34, pp. 31-45.
276. WILLIAMS, C. A., GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. In: *Natural Product Reports*. 2004, vol. 21(4), pp. 539-573.

277. WOODHEAD, M. et al. Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. In: *Molecular ecology*. 2005, vol. 14, pp. 1681-1695.
278. 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.
279. XIE, Y. et al. Efficacy of *Origanum vulgare* essential oil and carvacrol against the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2019, pp. 1-8. doi:10.1007/s11356-019-05671-4.
280. YADAV, R. K. et al. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. In: *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014, vol. 74, pp. 70-83.
281. YILMAZ, H. et al. Screening of chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of section Brevifilamentum of *Origanum* (L.) Species. In: *Records of Natural Products*. 2017, vol. 11(5), pp. 439-455.
282. ZHENG, W., WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, vol. 49(11), pp. 5165-5170.
283. ДОСПЕХОВ, Б. А. *Методика полевого опыта*. Москва, Колос, 1979. 414 с.
284. МЯГКИХ, Е. Ф. *Морфо-биологические особенности и хозяйственно ценные признаки *Origanum vulgare* L. в Предгорной зоне Крыма в связи с задачами селекции*: дис. д-ра биолог. наук. Симферополь, 2015. 223 с.
285. ПЕЛЯХ, Е. и др. Внутривидовой полихимизм *Mentha spicata* L. В: *Studia Universitatis Moldaviae. Științe ale naturii*. 2008, nr. 2(12), с. 23-26. ISSN 1857-1735.
286. <http://www.upov.int/portal/index.html.en>
287. <https://www.discoverlife.org/mp/20m?&kind=Origanum+vulgare> (accesat la 16.02.2018)
288. <https://www.khanacademy.org/science/biology/her/heredity-and-genetics/a/allele-frequency-the-gene-pool>
289. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/> (accesat la 06.02.2017)
290. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023.
who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/ (accesat: 08.04.2017).
291. <http://www.ars-grin.gov/duke>

ANEXE

Anexa 1. Parametrii morfologici ai subpopulațiilor speciei *O. vulgare* ssp. *vulgare*

Parametri morfologici	Rezervația Orheiul Vechi						
	Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or6	Or7
<i>Înălțimea plantei (cm)</i>	54,64±2,5	33,66±1,04	44,33±2,17	47,64±1,56	52,31±1,96	50,60±1,2	54,94±2,76
<i>Nr. ramuri pe plantă</i>	9,25±1,35	6,15±0,76	8,75±0,71	11,1±0,88	9,85±1,03	9,00±0,88	11,95±0,9
<i>Lungimea ramurii (cm)</i>	2,19±0,16	1,83±10,15	4,50±0,32	3,76±0,54	2,97±0,48	3,39±0,34	5,50±0,53
<i>Diametrul tulpinii (mm)</i>	2,82±0,17	1,34±0,11	2,53±0,21	2,57±0,16	2,76±0,14	1,95±0,12	2,36±0,16
<i>Nr. noduri pe tulpină</i>	18,25±0,79	16,9±0,52	17,45±0,86	18,05±0,8	16,1±0,99	15,35±0,76	16,45±0,51
<i>Distanța internod (cm)</i>	3,59±0,42	2,00±0,1	3,29±0,47	2,35±0,19	3,72±0,14	2,99±0,21	3,79±0,33
<i>Nr. frunze per nod</i>	11,45±0,73	8,55±0,49	10,55±1,1	10,55±0,67	13,1±1,37	7,25±0,59	14,00±1,15
<i>Lungimea frunzei (cm)</i>	2,65±0,16	1,85±0,09	2,72±0,14	2,56±0,2	2,72±0,16	3,01±0,09	2,40±0,12
<i>Lățimea frunzei (cm)</i>	1,52±0,1	0,94±0,07	1,25±0,08	1,19±0,14	1,38±0,09	1,34±0,06	1,46±0,11
Parametri morfologici	Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”, mun. Chișinău						
	Ch8	Ch9	Ch10				
<i>Înălțimea plantei (cm)</i>	44,32±0,96	63,62±1,02	49,92±1,6				
<i>Nr. ramuri pe plantă</i>	9,65±0,65	8,40±0,44	11,75±0,62				
<i>Lungimea ramurii (cm)</i>	4,31±0,42	4,57±0,21	4,86±0,44				
<i>Diametrul tulpinii (mm)</i>	1,94±0,08	2,25±0,08	2,30±0,13				
<i>Nr. noduri pe tulpină</i>	15,85±0,41	16,90±0,45	16,35±0,65				
<i>Distanța internod (cm)</i>	2,85±0,12	4,13±0,16	3,19±0,28				
<i>Nr. frunze per nod</i>	10,20±0,29	12,00±0,66	11,80±0,69				
<i>Lungimea frunzei (cm)</i>	2,65±0,11	2,34±0,1	2,57±0,17				
<i>Lățimea frunzei (cm)</i>	1,925±0,07	1,66±0,09	1,48±0,08				

Notă: valorile sunt prezentate sub forma $\bar{x} \pm SEM$ (media±eroarea standard a mediei); Or1-Or7 – subpopulații prelevate din flora spontană; Ch8-Ch10 – subpopulații colectate de la GBNI.

Anexa 2. Coeficienții de corelație *Pearson* între parametrii morfologici la cele 10 subpopulații

Subpopulația Or1										Subpopulația Or2									
HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF		HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF	
HP	1									HP	1								
RP	0,42	1								RP	0,28	1							
LR	0,07	0,42	1							LR	-0,19	0,00	1						
DT	0,25	0,26	0,3	1						DT	0,38	0,36	0,22	1					
NT	-0,05	-0,01	-0,10	-0,15	1					NT	-0,30	0,04	0,38	-0,02	1				
DI	0,58*	0,47*	0,45	0,36	-0,28	1				DI	-0,10	-0,24	-0,05	-0,21	0,28	1			
FN	0,06	0,30	0,34	0,54*	0,17	0,40	1			FN	0,02	0,13	0,27	-0,01	0,41	0,46*	1		
LF	0,15	-0,58	-0,25	-0,05	0,00	0,17	0,07	1		LF	-0,17	-0,21	-0,23	-0,18	-0,33	0,23	0,3	1	
IF	-0,14	-0,39	-0,36	0,06	-0,15	0,02	0,24	0,36	1	IF	0,10	0,04	-0,18	0,00	-0,04	0,35	0,16	0,35	1

Subpopulația Or3										Subpopulația Or4									
HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF		HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF	
HP	1									HP	1								
RP	0,18	1								RP	0,00	1							
LR	0,16	0,26	1							LR	0,24	0,07	1						
DT	-0,07	0,27	0,28	1						DT	0,03	0,22	0,54*	1					
NT	-0,07	0,25	-0,13	-0,05	1					NT	0,31	-0,08	-0,15	-0,11	1				
DI	0,64*	-0,01	0,38	0,07	-0,35	1				DI	0,12	0,29	0,16	0,48*	-0,13	1			
FN	0,56*	0,34	0,56*	0,24	-0,07	0,35	1			FN	0,16	-0,18	0,49*	0,40	0,18	0,21	1		
LF	0,07	-0,25	0,56*	-0,04	-0,32	0,43	0,17	1		LF	-0,20	-0,25	0,11	0,31	-0,11	0,44*	-0,1	1	
IF	0,26	-0,26	0,04	0,02	0,10	0,24	0,09	0,28	1	IF	0,01	-0,35	-0,25	-0,13	-0,21	0,28	0,05	0,41	1

Subpopulația Or5										Subpopulația Or6									
HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF		HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF	
HP	1									HP	1								
RP	0,03	1								RP	0,47*	1							
LR	0,21	-0,23	1							LR	0,35	0,31	1						
DT	-0,19	-0,05	-0,02	1						DT	0,18	0,48*	-0,15	1					
NT	0,16	0,22	-0,09	-0,39	1					NT	0,00	-0,38	0,31	-0,84	1				
DI	0,31	0,29	-0,07	0,47*	-0,37	1				DI	0,40	-0,25	-0,22	-0,10	0,16	1			
FN	0,27	-0,05	0,27	0,16	0,20	0,30	1			FN	-0,19	-0,11	0,15	-0,15	0,11	-0,27	1		
LF	-0,15	-0,16	0,07	0,45*	-0,11	0,10	0,14	1		LF	-0,03	-0,11	-0,27	0,01	-0,12	0,03	-0,2	1	
IF	-0,04	-0,29	0,40	0,46*	-0,41	0,24	0,00	0,70*	1	IF	0,13	-0,13	-0,06	0,23	-0,16	0,29	-0,51	-0,07	1

Subpopulația Or7										Subpopulația Ch8									
HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF		HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF	
HP	1									HP	1								
RP	0,01	1								RP	0,20	1							
LR	-0,09	0,02	1							LR	0,23	0,58*	1						
DT	-0,49	0,35	-0,15	1						DT	0,41	0,16	0,08	1					
NT	0,13	0,26	-0,24	0,33	1					NT	-0,01	0,00	0,08	-0,10	1				
DI	0,56*	0,08	0,02	-0,02	0,08	1				DI	-0,05	0,14	0,23	-0,19	-0,22	1			
FN	-0,27	-0,04	0,27	0,21	0,22	-0,23	1			FN	0,22	0,33	-0,21	-0,02	0,06	-0,20	1		
LF	-0,11	-0,11	-0,17	-0,12	0,17	-0,46	-0,1	1		LF	0,39	0,32	0,33	0,25	-0,24	0,09	0,32	1	
IF	-0,28	-0,22	-0,10	0,27	-0,08	-0,40	-0,06	0,41	1	IF	0,17	0,17	0,29	-0,01	-0,01	0,12	0,28	0,74*	1

Subpopulația Ch9										Subpopulația Ch10									
HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF		HP	RP	LR	DT	NT	DI	FN	LF	IF	
HP	1									HP	1								
RP	0,10	1								RP	0,63*	1							
LR	0,22	0,12	1							LR	0,50*	0,58*	1						
DT	0,39	0,32	0,40	1						DT	0,23	0,23	0,46*	1					
NT	0,16	0,39	-0,32	0,41	1					NT	-0,17	-0,12	-0,25	0,01	1				
DI	0,38	-0,26	0,49*	0,13	-0,32	1				DI	0,33	0,00	0,48*	0,54*	-0,31	1			
FN	0,44*	0,28	0,18	0,17	0,00	0,21	1			FN	0,01	0,16	0,45*	0,15	-0,25	0,24	1		
LF	-0,05	0,22	-0,20	-0,16	-0,05	-0,18	0,17	1		LF	0,50*	0,42	0,69*	0,21	-0,17	0,53*	0,42	1	
IF	0,37	0,14	0,17	-0,13	0,06	0,33	0,45*	0,43	1	IF	0,61*	0,31	0,49*	0,51	-0,12	0,42	0,10	0,48*	1

Notă: HP-înălțimea plantei (cm); RP-nr. ramuri/plantă; LR-lungimea ramurei (cm); DT-diametrul tulpinii (mm); NT-nr. noduri/tulpină; DI-distanța internoduri (cm); FN-nr. frunze/nod; LF-lungimea frunzei (cm); IF - lățimea frunzei (cm); *- Corelații statistic semnificative (*Pearson* r (20), P=95%).

Anexa 3. Frecvența alelelor locilor EST-SSR la plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare*
A3.1. Frecvența alelelor locilor OR09, OR10, OR12, OR13, OR27, OR44 și OR64

Populații	Locus/ alele	OR09						Populații	Locus/ alele	OR10					
		140pb	146pb	150pb	165pb	170pb	181pb			102pb	112pb	127pb	130pb	135pb	155pb
Rezervația Orheiul Vechi	Or1					1,00		Rezervația Orheiul Vechi	Or1		1,00				
	Or2	0,25		0,25	0,25		0,25		Or2	0,91		0,09			
	Or3	0,19	0,19	0,38		0,19	0,06		Or3	0,15	0,50		0,20		0,15
	Or4		0,33	0,33		0,33			Or4		0,43	0,13	0,30	0,13	
	Or5			0,50		0,50			Or5		0,83	0,08		0,08	
	Or6			1,00					Or6		0,50		0,50		
	Or7			0,50	0,50				Or7		1,00				
GBNI	Ch8	1,00						GBNI	Ch8	1,00					
	Ch9	0,50		0,50					Ch9	1,00					
	Ch10	0,39		0,39		0,22			Ch10	1,00					

Populații	Locus/ alele	OR12								Populații	Locus/ alele	OR44			
		100pb	115pb	117pb	125pb	128pb	135pb	140pb	150pb			148pb	153pb	163pb	170pb
Rezervația Orheiul Vechi	Or1	0,45		0,55						Rezervația Orheiul Vechi	Or1	0,17	0,42	0,25	0,17
	Or2	0,19	0,03	0,23	0,03	0,23	0,23	0,03	0,03		Or2	0,83	0,08		0,08
	Or3			0,40	0,13	0,33	0,13				Or3	0,44	0,38		0,19
	Or4	0,32		0,26	0,16	0,26					Or4	0,38	0,44		0,19
	Or5	0,40	0,40		0,07			0,07	0,07		Or5	0,50	0,40		0,10
	Or6	0,25		0,25		0,25	0,25				Or6	1,00			
	Or7	0,22	0,20		0,20			0,20	0,20		Or7	1,00			
GBNI	Ch8	0,62		0,38						GBNI	Ch8	0,33	0,33		0,33
	Ch9	0,50	0,50								Ch9	0,33	0,33		0,33
	Ch10	0,50	0,50								Ch10	0,27	0,45		0,27

Populații	Locus/ alele	OR13							Populații	Locus/ alele	OR64			
		130pb	140pb	148pb	172pb	183pb	195pb	200pb			84pb	87pb	92pb	95pb
Rezervația Orheiul Vechi	Or1			1,00					Rezervația Orheiul Vechi	Or1		1,00		
	Or2			1,00						Or2		1,00		
	Or3		0,18	0,45	0,14	0,18	0,05			Or3	0,41	0,35		0,24
	Or4		0,29	0,42			0,29			Or4	0,26	0,26	0,24	0,24
	Or5	0,29	0,32	0,03			0,32	0,03		Or5	0,80	0,20		
	Or6		0,33	0,33			0,33			Or6	1,00			
	Or7		0,33	0,33			0,33			Or7	0,26	0,26	0,24	0,24
GBNI	Ch8		0,91	0,09					GBNI	Ch8		1,00		
	Ch9		0,33	0,33			0,33			Ch9		1,00		
	Ch10	0,33	0,20	0,13		0,20	0,13			Ch10		1,00		

Populații	Locus/ alele	OR27								
		106pb	110pb	114pb	117pb	121pb	128pb	133pb	139pb	141pb
Rezervația Orheiul Vechi	Or1		0,45	0,18		0,18	0,18			
	Or2	0,08	0,77		0,08	0,08				
	Or3	0,27	0,18		0,27			0,27		
	Or4	0,23	0,10	0,23				0,23	0,23	
	Or5	0,26		0,23	0,03			0,23	0,03	0,23
	Or6	0,33			0,33				0,33	
	Or7		1,00							
GBNI	Ch8				0,33		0,33	0,33		
	Ch9		1,00							
	Ch10	0,27		0,18	0,09			0,18	0,09	0,18

Notă: Or1-Or7 – subpopulații prelevate din flora spontană; Ch8-Ch10 – subpopulații colectate de la Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru” (GBNI); pb – perechi de baze.

A3.2. Frecvența alelelor locilor OR14, OR40, OR75 și OR81

Populații	Locus/ alele	OR40										Populații	Locus/ alele	OR14						
		86pb	99pb	123pb	127pb	133pb	143pb	176pb	183pb	192pb	198pb			87pb	91pb	95pb	98pb	100pb	112pb	
Rezervația Orheiul Vechi	Or1		0,11		0,37			0,26			0,26	Rezervația Orheiul Vechi	Or1	0,31	0,31		0,06			0,31
	Or2		0,17		0,28		0,03	0,28		0,25	Or2		0,91			0,09				
	Or3			0,23	0,23		0,13	0,23		0,06	0,13		Or3	0,21	0,47		0,32			
	Or4	0,09	0,09	0,21	0,09			0,26	0,09		0,18		Or4	0,23	0,33	0,10	0,23	0,10		
	Or5	0,11	0,32	0,04		0,04	0,29		0,04		0,18		Or5	1,00						
	Or6		0,42				0,33				0,25		Or6	0,33	0,33		0,33			
	Or7	0,13	0,43				0,26				0,17		Or7	1,00						
GBNI	Ch8	0,15	0,15	0,02	0,22		0,02	0,22		0,02	0,20	Ch8	0,04	0,29	0,29		0,29	0,08		
	Ch9			0,33				0,33		0,33	Ch9	0,12	0,47			0,41				
	Ch10	0,08	0,20	0,20		0,20	0,16		0,14		Ch10		0,50			0,50				

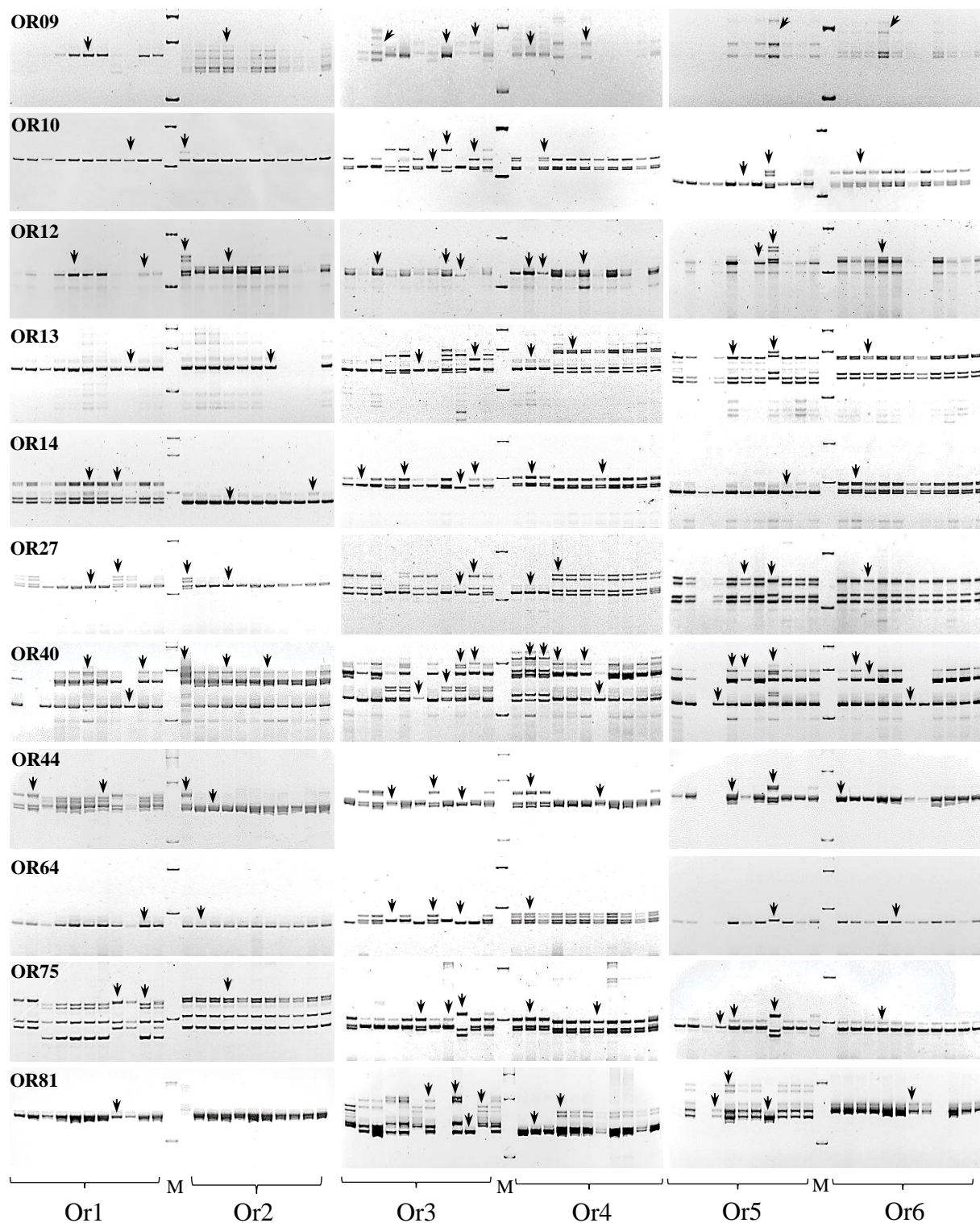
Populații	Locus/ alele	OR75										
		78pb	86pb	91pb	94pb	98pb	100pb	103pb	106pb	108pb	114pb	117pb
Rezervația Orheiul Vechi	Or1		0,17	0,11		0,28				0,17	0,17	0,11
	Or2			0,33				0,33				0,33
	Or3	0,05	0,05	0,43			0,43		0,05			
	Or4		0,35	0,15		0,35	0,15					
	Or5	0,05	0,05	0,47			0,37		0,05			
	Or6			0,50			0,50					
	Or7				0,50			0,50				
GBNI	Ch8			0,36		0,36						0,29
	Ch9			0,56		0,44						
	Ch10		0,38		0,23	0,15			0,23			

Populații	Locus/ alele	OR81										
		136pb	145pb	155pb	158pb	166pb	178pb	187pb	193pb	197pb	202pb	210pb
Rezervația Orheiul Vechi	Or1	1,00										
	Or2	0,90	0,10									
	Or3	0,21	0,18	0,09		0,09	0,18		0,18		0,09	
	Or4	0,32	0,23		0,23	0,23						
	Or5	0,24	0,21	0,18			0,18		0,18			
	Or6		0,50	0,50								
	Or7	1,00										
GBNI	Ch8			1,00								
	Ch9		0,25	0,25			0,25			0,25		
	Ch10	0,25	0,10	0,15			0,10	0,10	0,15		0,15	

Notă: Or1-Or7 – subpopulații prelevate din flora spontană; Ch8-Ch10 – subpopulații colectate de la Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru” (GBNI); pb – perechi de baze.

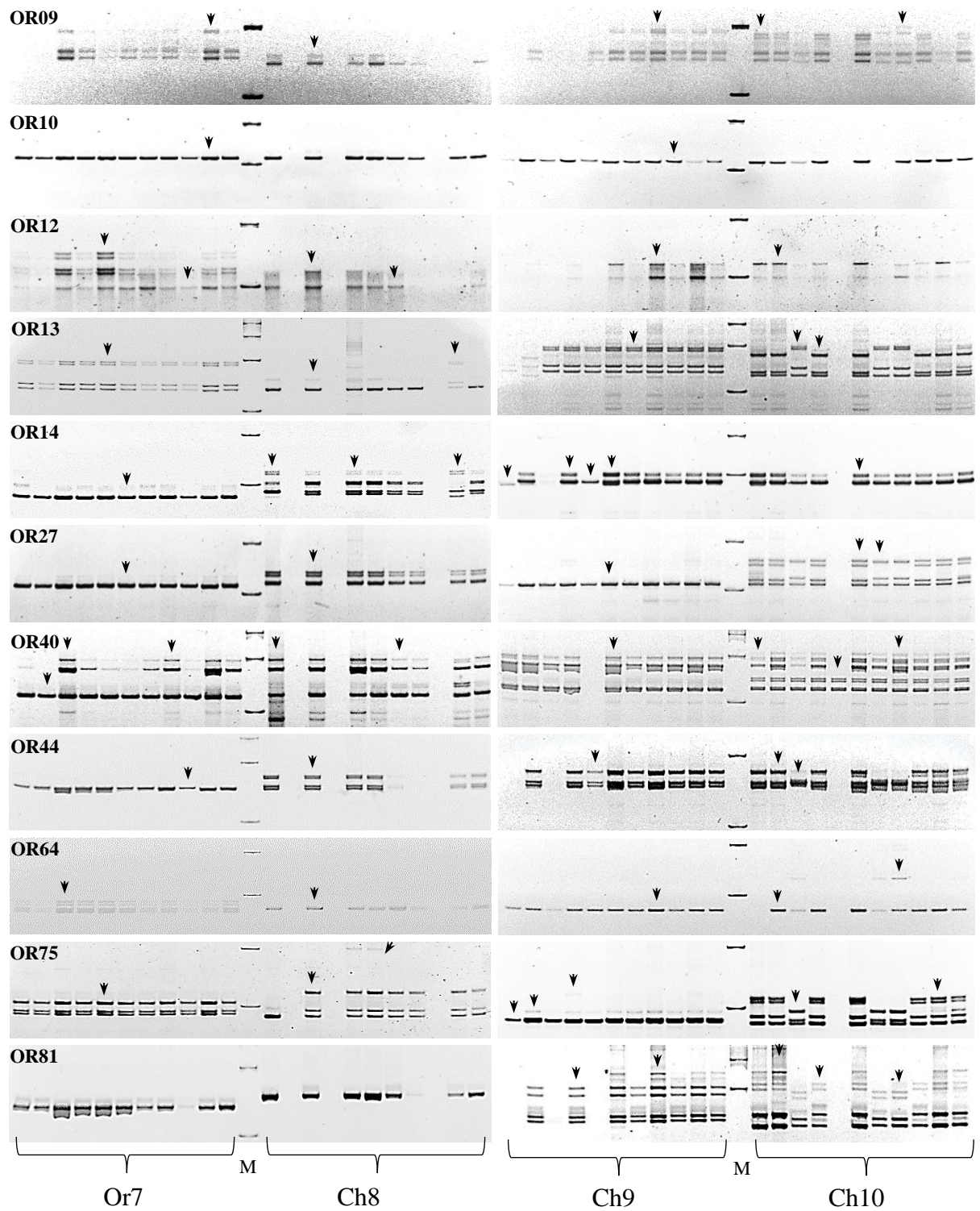
Anexa 4. Exemple de profile EST-SSR la plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare*

A4.1. Exemple de profile EST-SSR la plantele din subpopulațiile Or1-Or6



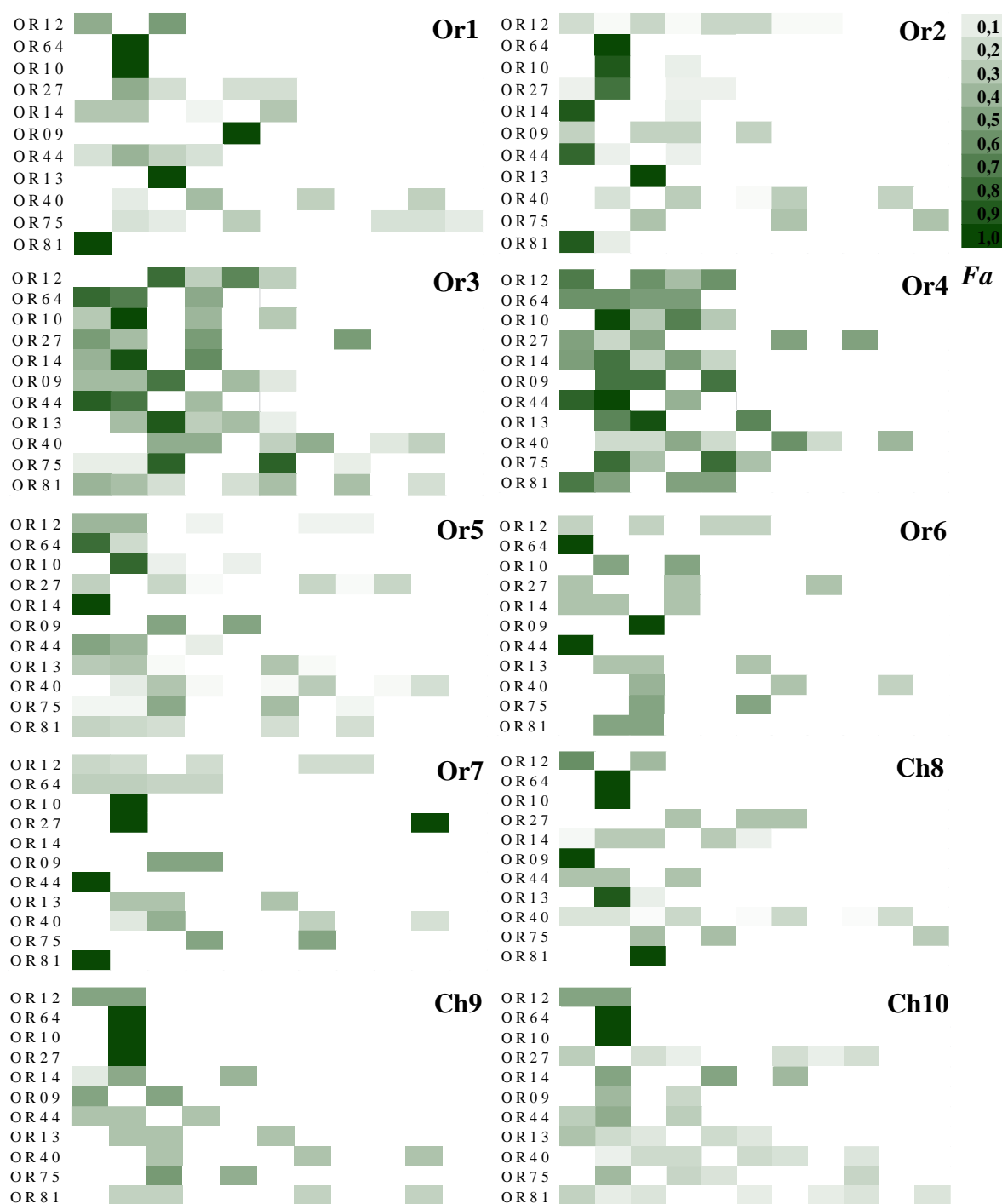
Notă: Or1-Or6 – subpopulații de *O. vulgare* prelevate de pe versantul Butuceni din rezervația Orheiul Vechi; prin săgeți sunt marcate profile diferite; M – markerul masei moleculare, 100 bp (*Thermo Scientific*).

A4.2. Exemple de profile EST-SSR la plantele din subpopulațiile Or7, Ch8-Ch10



Notă: Or7 – subpopulație prelevată din flora spontană (rezervația Orheiul Vechi); Ch8-Ch10 – subpopulații de *O. vulgare* colectate de la Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciobotaru”; prin săgeți sunt marcate diferite profile; M – markerul masei moleculare, 100 bp (*Thermo Scientific*).

Anexa 5. Amprente moleculare EST-SSR



Notă: Or1-Or7 – subpopulații prelevate din flora spontană; Ch8-Ch10 – subpopulații din colecția Grădinii Botanice Naționale (Institut „Alexandru Ciubotaru”); *Fa* – frecvența alelelor (0,1-1,0).

Anexa 6. Valori generate de ACP privind genotiparea cu EST-SSR

A6.1. Asocieri corelative a variabilelor pe CP (componentele principale)

Grupul de asociere	CP1		Coeficient de corelație <i>Pearson</i> $p \leq 0,05\%$	CP2		Coeficient de corelație <i>Pearson</i> $p \leq 0,05\%$
	Alele ale locilor EST-SSR	Intensitatea corelațiilor		Alele ale locilor EST-SSR	Intensitatea corelațiilor	
I	OR64 ⁸⁷ OR75 ⁹⁸ OR09 ¹⁴⁰ OR44 ¹⁷⁰	Pozitive cu CP 0,6 - 1,0	0,5 - 0,7			
II	OR27 ¹⁰⁶ OR27 ¹³⁹ OR10 ¹³⁰ OR75 ¹⁰⁰ OR81 ¹⁴⁵ OR09 ¹⁵⁰ OR64 ⁸⁴	Negative cu CP (-0,7) - (-1,0)	(-0,5) - (-0,9)			
III				OR12 ¹⁴⁰ OR12 ¹⁵⁰ OR09 ¹⁶⁵ OR75 ¹⁰³ OR14 ⁸⁷	0,7 - 0,8	0,8 - 1,0
IV	OR44 ¹⁴⁸ / OR44 ¹⁷⁰ OR64 ⁸⁴ / OR64 ⁸⁷ OR10 ¹¹² / OR10 ¹³⁰ OR09 ¹⁴⁰ / OR09 ¹⁵⁰ OR75 ⁹⁸ / OR75 ¹⁰⁰	0,6 - 1,0	-0,83 -0,88 -0,88 -0,43 -0,52	OR14 ⁸⁷ / OR14 ⁹¹ / OR14 ¹⁰⁰	0,6 - 0,8	-0,94 -0,65

A6.2. Combinațiile liniare de valori care saturează primele cinci CP (componente principale)

CP	Varianța cumulată (%)	Contribuția variabilelor pe CP			Loci SSR ale căror alele sunt variabile corelate cu diferite CP	Loci SSR caracteristici doar unui CP	Nr. variabile
		≥10%	≥ 5%	>1,2% - < 5			
CP1	28,13	OR64 ⁸⁷ (23) OR64 ⁸⁴ (17)	OR09 ¹⁴⁰ (6) OR09 ¹⁵⁰ (8) OR44 ¹⁴⁸ (6)	OR75 ⁹⁸ OR75 ¹⁰⁰ OR10 ¹¹² OR10 ¹³⁰ OR27 ¹⁰⁶ OR81 ¹⁴⁵	OR09 OR75 OR27 OR81 OR14	OR64 OR44 OR10	11
CP2	50,27	OR81 ¹³⁶ (26) OR14 ⁸⁷ (19)	OR14 ⁹¹ (5)	OR09 ¹⁶⁵ OR75 ¹⁰³ OR14 ¹⁰⁰			6
CP3	63,54	OR27 ¹¹⁰ (36) OR09 ¹⁷⁰ (13)		OR27 ¹¹⁴			3
CP4	74,33	OR13 ¹⁴⁸ (23) OR12 ¹¹⁵ (13) OR12 ¹¹⁷ (10)		OR12 ¹²⁸ OR14 ⁹⁸ OR13 ¹³⁰	OR13 OR14 OR81	OR12	6
CP5	85,96	OR81 ¹⁵⁵ (23) OR13 ¹⁴⁰ (14)		OR14 ⁹⁵			3

Anexa 7. Expresia relativă a genelor TPS la *O. vulgare* ssp. *vulgare*, unități convenționale

Subpopulații de <i>O. vulgare</i>	FRUNZE						
	<i>Ovtps1</i>	<i>Ovtps2</i>	<i>Ovtps3</i>	<i>Ovtps4</i>	<i>Ovtps5</i>	<i>Ovtps6</i>	<i>Ovtps7</i>
Or1	0,299±0,105	0,001±0,000	0,057±0,014	0,941±0,309	0,010±0,003	0,228±0,021	0,341±0,124
Or2	0,137±0,023	0,001±0,000	0,006±0,002	0,022±0,007	0,050±0,012	0,062±0,010	0,004±0,001
Or3	0,110±0,021	0,003±0,000	0,036±0,013	0,108±0,036	0,014±0,003	0,086±0,014	0,021±0,007
Or4	0,143±0,013	0,004±0,001	0,012±0,004	0,126±0,031	0,029±0,007	0,074±0,026	0,118±0,029
Or5	1,748±0,579	-	0,591±0,174	3,850±0,370	0,103±0,025	1,818±0,299	0,473±0,117
Or6	1,168±0,112	0,014±0,004	0,737±0,188	3,623±1,201	0,053±0,005	1,527±0,389	1,566±0,550
Or7	1,053±0,381	0,018±0,003	0,292±0,097	1,943±0,319	0,014±0,003	0,415±0,102	0,050±0,012
Subpopulații de <i>O. vulgare</i>	FLORI						
	<i>Ovtps1</i>	<i>Ovtps2</i>	<i>Ovtps3</i>	<i>Ovtps4</i>	<i>Ovtps5</i>	<i>Ovtps6</i>	<i>Ovtps7</i>
Or1	2,764±0,265	0,008±0,002	0,024±0,008	1,341±0,444	0,006±0,001	0,899±0,229	0,617±0,152
Or2	1,465±0,515	0,006±0,001	1,433±0,475	0,823±0,242	0,101±0,019	0,209±0,053	0,332±0,062
Or3	1,943±0,319	0,183±0,047	1,951±0,641	1,075±0,353	0,090±0,022	0,787±0,201	0,916±0,086
Or4	2,370±0,390	0,003±0,001	0,473±0,117	1,049±0,259	0,044±0,007	1,465±0,515	0,768±0,126
Or5	0,807±0,284	0,007±0,002	0,381±0,126	0,860±0,212	0,123±0,023	1,222±0,201	0,897±0,167
Or6	0,719±0,118	0,023±0,004	0,081±0,013	0,530±0,176	0,097±0,034	0,553±0,152	0,862±0,303
Or7	0,017±0,005	0,001±0,000	0,005±0,002	0,018±0,005	0,088±0,023	0,033±0,008	0,007±0,002

Notă: valorile sunt prezentate sub forma $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (media±eroarea standard a mediei); Or1-Or7 – subpopulații prelevate din flora spontană (rezervația Orheiul Vechi); *Ovtps* – gene terpen-sintetaze la *O. vulgare*.

Anexa 8. Act de implementare a rezultatelor științifice în instruire

Ministerul Educației,
Culturii și Cercetării al Republicii Moldova
Universitatea de Stat "Dimitrie Cantemir"
str. Academiei 3/2, Chișinău, Republica Moldova, MD-2028
tel.: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md



Ministry of Education,
Culture and Research of the Republic of Moldova
"Dimitrie Cantemir" State University
3/2 Academiei str., Chisinau, MD-2028, Republic of Moldova
phone: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md

nr. 05/ev-80 din "10" iulie 2019

ACT DE IMPLEMENTARE

a rezultatelor tezei de doctor „Diversitatea structurală și funcțională la *Origanum vulgare* L.”

Prin prezenta se confirmă că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul tezei de doctor în biologie cu tema „Diversitatea structurală și funcțională la *Origanum vulgare* L.” realizată de dna Mutu Ana sunt implementate în curriculumul universitar pentru studii superioare de licență (ciclul I) la disciplinele *Biologie moleculară*, *Biostatistică*, *Fiziologia plantelor* și *Biochimie* la Departamentul Științe Biologice și Geonomice a Facultății Științe ale Naturii, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”.

Șef Departamentul
Științe Biologice și Geonomice
dr., conf. univ.

Ilie BOIAN

Rector USDC
dr. hab., conf. univ.



Aurelia HANGANU

Anexa 9. Act de implementare a rezultatelor științifice în cercetare

Ministerul Educației,
Culturii și Cercetării al Republicii Moldova
Universitatea de Stat "Dimitrie Cantemir"
str. Academiei 3/2, Chișinău, Republica Moldova, MD-2028
tel.: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md



Ministry of Education,
Culture and Research of the Republic of Moldova
"Dimitrie Cantemir" State University
3/2 Academiei str., Chisinau, MD-2028, Republic of Moldova
phone: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md

nr. 05/en-79 din "10" iulie 2019

ACT DE IMPLEMENTARE

a rezultatelor tezei de doctor „Diversitatea structurală și funcțională la *Origanum vulgare* L.”

Prin prezenta se confirmă că primerii specifici elaborați de dna Mutu Ana în cadrul tezei de doctor, pentru studiul expresiei genelor terpen-sintetaze: *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps5*, *Ovtps6* și *Ovtps7* la specia *Origanum vulgare* sunt utilizați în cadrul Laboratorului Genomică, Centrul de Genetică Funcțională, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir” și sunt recomandați pentru studii genetico-moleculare asociate metabolismului secundar și de testare a genotipurilor de *O. vulgare* de perspectivă.

Rector USDC
dr. hab., conf. univ.



Aurelia HANGANU

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

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

Mutu Ana

Semnătura



Data

20 decembrie 2019

CURRICULUM VITAE

MUTU ANA

Informații personale

📍 Str. Sucevița 34/2, MD-2051, or. Chișinău, Republica Moldova.

☎ + 373 69658486

✉ anisoaramutu@gmail.com

Data nașterii: 24 august 1986



Studii superioare:

– 2012-2016 – *studii de doctorat*, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, specialitatea 164.02. – Fiziologie vegetală.

– 2008-2010 – *studii de masterat*, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, specialitatea 421 – Biologie. Diplomă de Master în Științe ale Naturii.

– 2005-2008 – *studii de licență*, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie și Pedologie, specialitatea științifică 421.1 – Biologie. Diplomă de Licență în Științe ale Naturii.

Stagii:

2016

– 15-19 decembrie – Curs de formare continuă: „Practici de cercetare”, realizat în cadrul proiectului Consolidarea cadrului instituțional al Republicii Moldova în domeniul migrației și dezvoltării, UnAȘM. *Certificat de participare 3 credite SECTS*.

– 1 iulie – Training: „Implementarea instrumentelor TIC în cercetare”, UnAȘM. (*Certificat de participare*).

– 26-27 mai – Curs de formare continuă: „Accesarea și managementul financiar al proiectelor Horizont 2020”, Chișinău, Republica Moldova. *Certificat de participare*.

2015

– 2-3 iulie – Training: „Tehnici de cercetare în biologia moleculară”, UnAȘM în colaborare cu Institutul de Fitotehnie N.I. Vavilov, Federația Rusă. *Certificat de participare, 5 credite*.

– 22-23 aprilie – Training: „Scrierea proiectelor internaționale”. Universitatea AȘM în colaborare cu Centrul Proiecte Internaționale al AȘM, Chișinău, Republica Moldova.

2013

– 10-13 septembrie – Conferința republicană științifico-practică: „Selectarea și utilizarea rațională a preparatelor antibiotic – un imperative al timpului”. Expoziție Internațională specializată MoldMEDZIN & MoldDENT, ed. a XIX-a. *Certificat de participare, 15 credite EMC*.

2012

– 8 decembrie – Seminar privind principiul de căutare și utilizare a informațiilor din bazele de date Bioinformatică, organizat în cadrul proiectului pentru tineri cercetători „UDACOT – instrument de colectare a datelor biologice elaborate în cadrul UnAȘM”, Chișinău, Republica Moldova.

Domeniile de interes științific:

Biologie moleculară, farmacognozie, fiziologia plantelor, biochimie,

Activitatea profesională:

– ianuarie 2013/prezent – *cercetător științific*, Centrul universitar Biologie Moleculară, CBM (actualmente Centrul universitar Genetică Funcțională, CGF), USDC.

– 1.01.2011/31.12.12 – *cercetător științific stagiar*, Centrul universitar Biologie Moleculară, CBM (actualmente Centrul universitar Genetică Funcțională, CGF), USDC.

– 2016/2017 - *lector asistent*, Catedra Biologie, Facultatea Științe ale Naturii, UnAȘM (actualmente USDC).

– septembrie 2011/mai 2012 – profesor în învățământul liceal, Liceul Academiei de Științe (actualmente Liceul Teoretic Republican „Aristotel”).

– 2011 – *asistent universitar*, Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, Catedra Chimie Industrială și Ecologică, Universitatea de Stat din Moldova.

Participări în proiecte științifice naționale și internaționale:

– *Proiecte instituționale:*

15.817.05.03F „Rezistența florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.) la lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.): mecanisme genetico-moleculare și fiziologice”, 2015 – 2019.

11.817.04.19F „Aspecte funcționale și genetico-moleculare ale genomului la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”, 2011 – 2014.

– *Proiecte internaționale:*

13.820.18.06/RoA – „GECOMAP – Analiza polimorfismului genetic intraspecific pentru elaborarea markerilor moleculari ai unor chemotipuri de plante medicinale și aromate”, proiect bilateral moldo-român, 2013-2014

16.80013.5107.20/Ro – „Evaluarea unor hibrizi de floarea soarelui, privind rezistența la stresul hidric și termic, în România și Republica Moldova”, proiect bilateral moldo-român, 2015-2016.

– *Proiecte pentru tineri cercetători:*

13.819.14.12A – Expresia genelor implicate în răspunsul defensiv al florii-soarelui la mana (*Plasmopara halstedii* F. Berl et de Toni), 2013 – 2014.

19.80012.05.08F – Efectul imediat al fitoparazitului *Orobanche cumana* Wallr. asupra florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.), 2019.

– *Proiecte pentru procurarea echipamentului științific:*

11.220.10.05A „Investigarea potențialului de rezistență la stresul biotic a diferitor genotipuri de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”, 2011.

Participări la foruri științifice (naționale și internaționale):

2019

– 2nd International Conference „Agrophysics Trends: from actual challenges in arable farming and crop growing towards advanced technologies”, Saint Petersburg.

2018

– International Scientific Congress, Conference of Agriculture and Food engineering, Iasi, Romania, 18-19 october;

2015

– Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor, Chișinău, UnAȘM, 10 martie;

2014

– International Scientific Symposium, Conservation of plant diversity, 3rd edition, Chisinau, 22-24 may;

– Phytochemical Society of Europe Meeting - Phytochemicals in Medicine and Pharmacognosy, Piatra-Neamt, Romania, 27-30 april;

2013

– al III-lea Simpozion Național „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, Chișinău, 24-25 octombrie;

– 17-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 21-26 апреля;

– International Plant Breeding Congress, Antalya, Turkey, 10-14 November;

Lucrări științifice și științifico-metodice publicate:

27 lucrări științifice (inclusiv 5 publicații de monoautor): 11 articole în reviste naționale recenzate, 2 articol în culegeri științifice și 9 comunicări în cadrul unor manifestări științifice naționale și internaționale.

Premii, mențiuni, distincții, titluri onorifice etc.

2016 – Bursa de Cercetare „Mircea Ciuhrii”.

Cunoașterea limbilor:

limba română – limba maternă, limba rusă – mediu, limba engleză – mediu, limba franceză – mediu.

Date de contact de serviciu

Centrul universitar de Genetică Funcțională

Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”

str. Academiei, 3/2, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova

e-mail: personal.univer@asm.md

tel.: (+373 22) 737416