

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a
Banatului “*Regele Mihai I al României*” din Timișoara



Facultatea de Horticultură și Silvicultură

Ing. LUCU (POPOVICI) E. EMILIA

Rezumat

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător Științific

Prof. univ. dr. CAMEN DORIN – DUMITRU

Timișoara

2022

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a
Banatului “*Regele Mihai I al României*” din Timișoara



Facultatea de Horticultură și Silvicultură

Ing. LUCU (POPOVICI) E. EMILIA

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII PRIVIND INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE
CULTIVARE ASUPRA PRINCIPALELOR PROCESE
FIZIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE LA SPECII DE PLANTE
AROMATICE**

Conducător Științific

Prof. univ. dr. CAMEN DORIN – DUMITRU

Timișoara

2022

INTRODUCERE

Motivația alegerii temei de cercetare

Plantele aromatice și medicinale au calități culinare și terapeutice dovedite din cele mai vechi timpuri, fiind folosite pentru diferite tipuri de boli. Călugării au cultivat aceste plante în jurul mănăstirilor; pe lângă efectul terapeutic și alimentar, aceste plante au început să aibă și rol ornamental. Speciile de plante medicinale și aromatice au devenit indispensabile datorită posibilităților de utilizare atât pe piața internă cât și pe cea externă, existând modalități deosebite de cultivare și valorificare. Aceste plante fac parte dintr-un grup mare și divers de specii cu caracteristici biologice proprii, un potențial diferit de adaptare la condițiile climatice sau agrochimice.

Industria farmaceutică și cosmetică este orientată tot mai mult spre compușii naturali, fără toxicitate, cu un potențial bioprodusiv evident. Valorificarea speciilor ornamentale, aromatice și medicinale, înmulțirea acestora folosind tehnici moderne de cultivare "in vitro" sunt nenumărate: industria cosmetică, industria farmaceutică sau micropropagare. Științific, pot fi clasificate ca o categorie de specii cu o capacitate mare de sinteză a produselor metabolic active, substanțe de interes terapeutic direct, ingrediente active sau medicamente, ca precursori semisintetici sau substanțe și amestecuri ale acestora pentru preparate farmaceutice.

Aplecarea spre această tematică de studiu, s-a datorat nevoii existente de realizare a unor analize biochimice a extractelor de compuși bioactivi existenți în plantele aromatice și medicinale, obținerea unor plante noi, a compușilor cu aplicabilitate industrială, prin folosirea condițiilor de cultură adecvate și a unei balanțe hormonale echilibrate.

Importanța și actualitatea temei

O mare parte a cercetărilor efectuate timp îndelungat în domeniul culturilor de celule și țesuturi vegetale, au contribuit la rezolvarea mai multor aspecte privind posibilitățile de regenerare, obținerea de organe vegetative direct în condiții de cultură "in vitro" sau obținerea de embrioni din celulele somatice, a unor structuri de țesuturi sau a unor tipuri de celule, influențate fiind de compoziția mediului de cultură, a condițiilor ecofiziologice din vasele de cultură sau a camerei de creștere.

Cultura "in vitro" a evoluat rapid, prin îmbunătățirea a numeroase soiuri de culturi, propagarea genotipurilor valoroase, răspândirea populațiilor lipsite de viroze și conservarea resurselor genetice. Variația genetică prezentată de plantele regenerare prin cultura „in vitro” sau dobândită prin mutagenza indusă, poate fi combinată pentru obținerea genotipurilor valoroase. Regenerarea și procesul de formare a organelor în cursul dezvoltării individuale a organismelor "in vitro" a unor specii de plante, este necesară pentru reproducerea cu succes a acestora prin mijloace asexuate. Etapele de morfogeneză și organogeneză se desfășoară sub influența factorilor endogeni și exogeni. Conținutul endogen, tipul și aparatul enzimatic al hormonilor, sunt factori care au ca rezultat reglarea regenerării. Tipul hormonilor vegetali utilizați și concentrațiile acestora precum și diferențele de echilibru hormonal, joacă un rol important în procesul de organogeneză.

Calendula officinalis L.(Gălbenelele) este o plantă medicinală, folosită în medicina tradițională din întreaga lume, fiind obiectul multor studii chimice și farmacologice. Aceste cercetări au descoperit diverse clase de compuși în organele speciei: carotenoide, uleiuri volatile, flavonoide, terpenoide, carbohidrați, lipide, aminoacizi, precum și constituenți minori. Ingredientele active ale gălbenelelor sunt indicate pentru tratamentul topic al rănilor cu diverse origini.

Thymus vulgaris L. este o plantă erbacee, manifestând prin substanțele de natură fenolică și conținutul în flavonoide, acțiune antiseptică, coleretică, colagogă, antifungică, antihelmintică, antitusivă. Uleiurile, extractele sub formă de infuzie și concentratele sub formă de siropuri din plante, sunt folosite pentru tratamentul gastritelor, astmului, indigestiei, laringitei, amigdalitei, bronsitei sau tusei respiratorii.

Melissa officinalis L. (Roișița) este o plantă perenă aparținând familiei Lamiaceae, meliferă, aromată, cu proprietăți terapeutice. Este o plantă medicinală cunoscută pentru efectele sale terapeutice asupra tulburărilor de stomac, stimulează apetitul și tratează hipertirodismul, ameliorează tensiunea, crește secreția biliară, echilibrează digestia. Ceaiurile preparate din frunze de roșiță, precum și ceaiurile cu flori de roșiță, pot ajuta la ameliorarea durerilor de cap, la tratarea amețelilor.

Prezentarea pe scurt a conținutului

Teza de doctorat este constituită din două părți.

Partea de început a lucrării prezintă studiul literaturii în domeniu privind stadiul actual al cercetărilor privind speciile aromatice și medicinale studiate și anume *Calendula officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L.

În partea a doua sunt prezentate realizările proprii privind materialul biologic, obiectivele și metodele de cercetare utilizate, contribuțiile și concluziile privind determinarea capacității germinative a semințelor de *Calendula officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L. atât în cutii Petri cât și pe medii de cultură, determinarea creșterii plantulelor, a capacității de calusare, folosind explanți nodali și frunze, cu obținerea calusului și a embrionilor somatici, multiplicarea (regenerarea plantulelor folosind vârfuri de creștere și frunze), obținerea polifenolilor totali, a flavonoizilor totali, capacitatea antioxidantă totală, activitatea antimicrobiană a extractelor.

Cercetările au fost efectuate în Timișoara, în Laboratoarele de Fiziologie vegetală, Culturi de celule și țesuturi vegetale, din cadrul Facultății de Horticultură și Silvicultură Timișoara, precum și în Complexul de Laboratoare de Cercetare "Horia Cernescu" din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului "Regele Mihai I al României" din Timișoara, în perioada 2018 - 2021.

Principalele activități desfășurate în cadrul cercetărilor au fost:

1. Inocularea semințelor pe medii de cultură diferite;
2. Determinarea energiei și facultății germinative a semințelor;
3. Caracterizarea fiziologică a plantelor obținute prin cultura "in vitro";
4. Determinarea capacității de calusare a celor trei specii medicinale și aromatice studiate, folosind explanți nodali și frunze, cu obținerea calusului și a embrionilor somatici;
5. Multiplicarea (regenerarea plantulelor folosind vârfuri de creștere și frunze);
6. Analizele de laborator pentru obținerea polifenolilor și flavonoizilor totali ai speciilor studiate, capacitatea antioxidantă totală, evaluarea spectrelor UV-VIS, activitatea antimicrobiană a extractelor de *Calendula officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L.

Gradul de încadrare a temei în preocupările internaționale, naționale, regionale, ale colectivului de cercetare

Percepția generală negativă vizavi de medicamentele tradiționale (sintetice), corelată cu dorința de a adopta un stil de viață sănătos, a dus la creșterea cererii de suplimente pe bază de plante și dietetice. Aceste afirmații sunt sprijinite de un număr tot mai mare de cercetări privind modul de obținere a compușilor activi biologic și constituenții lor chimici.

Obiectivele științifice indicate pentru soluționare în cadrul cercetării științifice

Obiectivul major al cercetărilor efectuate în cadrul acestui studiu îl reprezintă valorificarea potențialului bioproductiv al celor trei specii medicinale și aromatice studiate (*Calendula officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L.), prin tehnologia de cultivare "in vitro", cu reducerea considerabilă a timpului de obținere a plantelor.

Obiectivul principal devine optimizarea procesului "in vitro" prin: Realizarea unei metode eficiente cu ajutorul îmbunătățirii mediului de cultură, a hormonilor vegetali-citochinina și auxina, precum și a nivelului de pH din mediu, finalizând procesul prin oferirea stabilității plantelor regenerate; Multiplicarea prin semințe pentru stabilirea ratei de germinare "in vitro" și "ex vitro"; Determinarea influenței modului de conservare a semințelor și cota de aclimatizare la condițiile climatice actuale; Individualizarea mediilor pentru fiecare selecție urmărindu-se în principal proliferarea axilară; Testarea capacitații de regenerare din frunzele obținute "in vitro"; Selecția și multiplicarea unor genotipuri valoroase de plante ornamentale, aromatice și medicinale.

Obiectivele punctuale din cadrul studiului sunt:

- Obținerea de noi plante și a compușilor cu aplicabilitate industrială, prin utilizarea condițiilor de cultură adecvate; Testarea energiei și capacității germinative pe medii diferite de cultură, a celor trei specii ornamentale, aromatice și medicinale studiate; Obținerea unei colecții de calus cu potențial bioproductiv pentru

fiecare specie studiată; Testarea capacității de micropropagare a celor trei specii aromatice și medicinale studiate, prin folosirea unei balanțe hormonale echilibrate; Testarea capacității antimicrobiene a speciilor studiate.

Consemnării sintetice privind noutatea/gradul de inovare a metodei/metodologiei de cercetare

Prezenta temă de cercetare presupune o abordare nouă cu privire la modul de studiere al unor specii de plante aromatice cu potențial ornamental. Au fost propuse metode moderne de cultivare prin tehnologia „in vitro”, prin tatonarea unor medii de cultură cu diferite balanțe hormonale, urmărindu-se reacția acestora din punct de vedere al potențialului de regenerare. De asemenea au fost studiate comparativ, în funcție de modul de obținere, posibilitățile de utilizare ale speciilor studiate ținând cont de potențialul microbial al acestora. Totodată a fost determinat și potențialul antioxidant, al conținutului total de polifenoli și substanțe flavonoide.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL PLANTELOR STUDIATE

Capitolul 1.1. Originea, răspândirea și importanța speciilor *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L.

Florile de gălbenele sunt deosebit de populare ca medicament natural datorită numeroaselor substanțe active conținute, reprezentative fiind uleiurile volatile, substanțele amare, triterpenoidele, carotenoidele, flavonoidele, saponinele, taninurile, răsinile și mucilagiile. Cele mai multe dintre efectele avantajoase depistate în medicina tradițională fiind validate de medicina științifică. Produsele fitoterapeutice din flori de gălbenele au efecte în dureri menstruale, antispastice, coleretice, antiseptice, cicatrizante, antiinflamatoare și de activare a circulației periferice. Uleiul de gălbenele are proprietăți antiparazitare. *Calendula* are un număr de 25 de specii, *C. officinalis* L. fiind cea mai utilizată în practica terapeutică.

Thymus Vulgaris L., Fam. Labiatae, este un adevărat antibiotic natural cu efect distructiv asupra mării majorității a bacteriilor și microorganismelor dăunătoare, exercitând o stimulare a capacităților de autoapărare ale corpului uman. Din partea proaspătă a plantelor de thymus se pot utiliza extracte vegetale, în mod tradițional pentru homeopatie, aceste plante fiind descrise în lucrări importante de specialitate.

Forme de utilizare: Uleiuri volatile, Extractul alcoolic (tinctura), pulbere sau macerat la rece. Ingredientele active din cimbru - uleiuri volatile, rășini, taninuri, acid cafeic, acid ursolic, flavonoide și triterpenoide, serpilina, bitter, săruri minerale, conservanți de plante - îi conferă importante proprietăți antiinfecțioase și sunt un bun antibiotic, un potențiator al sintezei acțiunii antibiotice și sporește autoapărarea organismului. Cimbrul este cultivat atât ca plantă de legume aromate, cât și ca plantă medicinală. Frunzele și părțile inferioare ale lăstarilor sunt folosite pentru a aroma diferite feluri de mâncare, murături, marinate și conserve. Părțile aeriene ale plantelor conțin și taninuri, flavonoide, luteină și glicozide. Ca plantă medicinală, cimbrisorul se administrează intern în astm bronșic, tuse convulsivă, dispepsii ușoare, enterocolite, etc. Se folosește, de asemenea în cosmetică și industria parfumurilor. Cimbrisorul prezintă și interes decorativ, se poate amplasa sub formă de borduri sau grupuri, în diferite grădini, mai ales în cele de tip “stâncării”.

Roișița (*Melissa officinalis* L.) este o specie medicinală, meliferă și aromatică cunoscută pentru efectele ei terapeutice asupra afecțiunilor stomacului, calmează stările nervoase, mărește secreția biliară, echilibrează digestia, activează pofta de mâncare și tratează hipertiroidia. Planta conține uleiuri eterice, hidrocarburi terpenice, taninuri, mucilagii, glucide, substanțe amare, săruri minerale de fier, aluminiu și potasiu, care determină întrebuințarea ei în alimentație, industria farmaceutică, parfumerie, cosmetică. Extractul hidroalcoolic liofilizat din frunze exercită un efect sedativ în doze relativ mici. S-a descoperit că are proprietăți analgezice. Este utilizat pe scară largă ca sedativ și tranchilizant pentru insomnia neurogenă și disfuncția gastrointestinală. Are și efecte stimulatoare, carminative, antispastice. Este potrivit pentru toate durerile de stomac neurogenice.

1.2. Studii privind caracterizarea botanică, cerințele față de factorii de vegetație și compoziția chimică a speciilor *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L.. Particularitățile biologice și cerințele față de factorii de vegetație ale speciilor studiate

Macro-inspecția este prima etapă de investigare a unui produs nou sau cunoscut și are ca scop determinarea trăsăturilor morfologice observate cu ochiul liber sau cu lupa și a trăsăturilor senzoriale percepute prin miros și gust. Prin urmare, se analizează produsele vegetale, ale căror caracteristici depind de natura

organelor care le compun, de poziția taxonomică a plantelor și de forma în care sunt prezentate: produse întregi, fragmentate sau pulverizate. Examinarea macro include determinarea aspectului, mărimii, culorii, mirosului și gustului.

1.3. Studii privind compoziția chimică a speciilor *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L.

Proprietățile curative ale *gălbenelelor* depind de complexul de substanțe bioactive pe care le conțin: Izoprenoide și derivate - Uleiuri volatile, Saponine, Alcoolii triterpenici, Compușii fenolici - Flavonoide, Acizi fenolici (acidul calendulic este un acid gras polinesaturat netoxic, care are proprietăți antiinflamatorii în organism).

Cimbrul este reprezentat de două grupe majore de compuși minori: uleiuri esențiale și polifenoli nevolatili. Pot fi observate până la 25 de flavonoide diferite, în principal sub formă de agliconi. Flavonoidele apigeninei și luteolinice sunt cele mai importante flavonoide, prezente atât sub formă de agliconi, cât și sub formă de ortoglicozide. Alte ingrediente: derivați de flavonoide (luteolină și glicozide luteolinice și Apigenină, flavonoizi di-, tri- și tetrametoxilați); acizi carboxilici polifenolici (acid clorogenic, acid rosmarinic, acid ferulic, acid cafeic), ceară și triterpene, taninuri. Acestea sunt în principal depozite de acid rosmarinic (~0,15-2,6%), acizi cafeic și dehidrocafeic și acizi fenolici liberi: cafeic, p-cumaric, siringic și ferulic.

Frunzele de *roiniță* conțin aproximativ 4% acizi rosmarinic și alți acizi polifenolici, inclusiv acizi cafeic și clorogenic, triterpene și flavonoide. Mai recent, în frunzele de melisa au fost găsite glicozide monoterpene și alte glicozide. Conținutul de ulei esențial este de 0,05-0,30% și este format din citronelal, citral a și b, metilcitronelal, basilen, citronelol, nerol și geraniol. Sunt prezente și diverse alte sesquiterpene, beta-cariofilene și bacterii. Principalii constituenți chimici identificați în organele aeriene sunt: uleiul volatil (până la 0,15% material proaspăt), compoziția uleiului volatil depinzând de locația de unde sunt recoltate plantele.

1.4. Stadiul cercetărilor privind culturile de celule și țesuturi vegetale. Culturile “in vitro”. Definiție, caracterizare și aplicabilitate

Sfârșitul celui de-al doilea mileniu se caracterizează prin participarea mare a biotehnologiei în toate domeniile de activitate ale vieții umane. Datorită biotehnologiei vegetale și industriale s-au făcut progrese remarcabile în obținerea de noi genotipuri ale soiurilor de plante cu proprietăți favorabile și randamente mai mari în comparație cu materialul original. În 1962, Murashige și Skoog au reușit să dezvolte ceea ce este considerat un mediu de bază care, cu modificări minore, poate fi folosit pentru aproape toate tipurile de cultură de țesuturi. Succesul experimentelor lui Coking cu izolarea enzimatică a protoplastelor mezofile de frunze din 1960 a făcut posibilă obținerea unui număr mare de protoplaste și apoi generarea de hibrizi somatici. 1966 este considerat a fi începutul fazei moderne de cercetare a culturii de explant de plante „in vitro”. Caracteristica principală a acestei etape este dezvoltarea unor tehnici eficiente în generarea, cultura și fuziunea protoplastelor vegetale.

Spre deosebire de multiplicarea tradițională, care operează folosind semințe sau părți mari de plantă (marcote, butași, altoi), micropropagarea „in vitro” folosește explante mici de ordinul milimetrilor sau chiar microscopice (celule, protoplaste). Explantele, în condiții normale de cultură, nu pot crește rezistând agenților patogeni și sintetizând nutrienții necesari pe cont propriu. Prin urmare, succesul culturii celulare și tisulare trebuie să respecte următoarele condiții:

- Pregătirea un mediu de creștere ideal, ca explantele să aibă o nutriție heterotrofică bună și acestea să poată obține cu ușurință surse de carbon organic;
- asigurarea și controlul factorilor de mediu (temperatură, lumină, umiditate) în intervalul optim pentru fiecare specie, soi și stadiu de creștere, în funcție de cerințele acestora și de scopul urmărit;
- stimularea creșterii și diferențierii sau dediferențierii organelor prin utilizarea adecvată a stimulatoarelor de creștere;
- asigurarea sterilității complete a întregului proces de producție a plantelor „in vitro” prin sterilizarea materialului vegetal, sterilizarea mediului și a vaselor de cultură, efectuarea tuturor operațiilor într-o hotă sterilă cu flux de aer laminar, folosind instrumente sterilizate la flacără.

Avantajele tehnologiei de cultivare „in vitro”:

- Asigurarea multiplicării rapide a soiurilor, hibrizilor sau clonelor valoroase dintr-o cantitate mică de material vegetal; Teoretic, indicele de garanție este dublat, iar în aproximativ 6 luni se pot obține 1 milion de plante;
- Producerea de material săditor fără virusi și micoplasme, material mai viguros, prematur și cu un randament ridicat;

- Necesită mai puțin spațiu pentru cultivare și folosește pe deplin posibilitățile existente într-un laborator cu 3-5 straturi de cultivare verticală suprapuse;
- Obținerea de plante haploide prin cultivarea polenului, a anterelor sau a altor explante de țesut reproducător (cu cromozomi „n”);
- Hibridii interspecifici pot fi obținuți prin fertilizare *in vitro*, fiind imposibil de obținut în condiții normale;
- Pot fi selectate plante rezistente la stres, dăunători și boli;
- Pot fi evitate efectele sezoniere ale pepinierelor; Poate permite obținerea semințelor artificiale;
- Plantele se pot obține pe rădăcini proprii, evitându-se astfel costurile de altoire;
- Asigură multiplicarea clonală a portaltoilor care înrădăcinează extrem de greu în condiții normale de cultură;
- Poate asigura conservarea materialului vegetal de la faza de plantulă până la primirea unor comenzi ferme de regenerare.

Micropropagarea utilizată ca metodă de înmulțire și multiplicarea “in vitro”

Micromultiplicarea constă într-un ansamblu de tehnici de înmulțire vegetativă considerate a fi tehnologii ale viitorului deoarece conduce la posibilitatea de obținere a unui număr mare de plante sănătoase într-un spațiu redus. Etapele esențiale ale micropropagării sunt:

Inițierea culturii “in vitro”, fază în care semințe sau fragmente de plante sunt sterilizate și introduse in vitro; Regenerarea, Acclimatizarea. Principalele aplicații ale micropropagării sunt multiplicarea vegetativă clonală rapidă a unor forme de interes agronomic, devirozarea și menținerea în stare fitosanitară optimă a acestora pentru obținerea de material săditor utilizat pentru înființarea plantațiilor comerciale în cazul în care costurile de producție se dovedesc concurențiale, sau în situația în care nu dispunem de material suficient pentru producerea plantelor prin metode tradiționale. În cazul inoculării unor explante “in vitro”, celulele țesuturilor inoculate pe medii aseptice suferă un proces de dediferențiere și generează meristeme. Din aceste meristeme, prin rediferențiere, vor lua naștere organe. Organogeneza constituie momentul de bază în asigurarea multiplicării vegetative. Prin micropropagarea “in vitro” a meristemelor, rezultă regenerarea plantelor identice genetic cu planta mamă-donatoare, care asigură multiplicarea clonală.

II. CERCETĂRI PROPRII

Capitolul 2.1. Materialul biologic, obiectivele și metodele de cercetare utilizate

Materialul vegetal folosit pentru studiu este constituit din semințele speciilor *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L. În prima fază am experimentat condiții de cultură diverse folosind semințele, continuând cu părți ale aceluiași specii, prin tehnologia de cultivare “in vitro”.

Cercetările au fost efectuate în Timișoara, în Laboratoarele de Fiziologie vegetală, Culturi de celule și țesuturi vegetale din cadrul Facultății de Horticultură și Silvicultură Timișoara, precum și în Complexul de Laboratoare de Cercetare “Horia Cernescu” din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului “Regele Mihai I al României” din Timișoara, în perioada 2018 - 2021.

OBIECTIVE

Obiectivul principal a fost optimizarea procesului “in vitro” prin:

Realizarea unei metode eficiente cu ajutorul îmbunătățirii mediului de cultură, a hormonilor vegetali - citochinina și auxina, precum și a nivelului de pH din mediu, finalizând procesul prin oferirea stabilității plantelor regenerare; Înmulțirea prin semințe pentru determinarea ratei de germinare *in vitro* și *ex vitro*; Determinarea influenței manierei de conservare a semințelor și rata de naturalizare la condițiile climatice actuale; Individualizarea mediilor pentru fiecare selecție urmărindu-se în principal proliferarea axilară; Testarea capacității de regenerare din frunzele obținute “in vitro”; Selecția și multiplicarea unor genotipuri valoroase de plante ornamentale, aromatice și medicinale.

Obiectivele punctuale din cadrul studiului sunt:

- Obținerea de noi plante și/sau compuși cu aplicabilitate industrială, prin utilizarea condițiilor de cultură adecvate;
- Testarea energiei și capacității germinative pe medii diferite de cultură, a celor trei specii ornamentale, aromatice și medicinale studiate;

- Obținerea unei colecții de calus cu potențial bioproductiv pentru fiecare specie studiată;
- Testarea capacității de micropropagare a celor trei specii aromatice și medicinale studiate, prin folosirea unei balanțe hormonale echilibrate.

MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Într-o primă fază, s-a urmărit inocularea semințelor pe medii de cultură și determinarea capacității germinative a semințelor. La specia *Calendula Officinalis* L., s-au folosit trei genotipuri diferite (*Calendula Officinalis* Double Balls mixed, *Calendula Officinalis* Fiesta Gitana Mix, *Calendula Officinalis* Mix). La specia *Thymus vulgaris* L., am folosit semințe: *Thymus vulgaris* (Cimbru, FloraSelf), *Thymus vulgaris* (Cimbrișor-soi Timo, Sem-Luca) și *Thymus vulgaris* (Nova Sem). *Melissa officinalis* L. a fost achiziționată de la Flora Self, Amia și Agrosel. Rezultatele studiului au fost evaluate la 3, 7, 14, 21 și 28 zile, urmărindu-se energia și facultatea germinativă prin repetiții și metode diferite de inițiere a germinării, atât în cutii Petri, cât și pe mediu de cultură.

Obținerea de calus cu protocoale aferente fiecărei specii

Explantate de *Calendula Officinalis* L. obținute, au fost inoculate în mediu MS suplimentat cu BAP (1 sau 2 mg / L) singur sau combinat cu 0,1mg / L de NAA. Toate mediile au fost suplimentate cu 30 g/L zaharoză. După 4 săptămâni, rezultatele au fost analizate ținând cont de mai mulți parametri precum numărul și lungimea lăstarilor, inducerea și dezvoltarea calusului. Calusul obținut a fost transferat în cultura MS unde am adăugat 3 mg/L 2,4-D, pentru dezvoltare organogenă. Scopul acestui studiu a fost determinarea activității antibacteriene a calusului de *Calendula officinalis* derivată din explantele de cotiledon.

Pentru generarea de calus din explanți nodali ai *Thymus vulgaris* L., am folosit următorul protocol care generează calus după două săptămâni: MS (Murashige & Skoog Medium) + 1,8μM (microMoli) 2,4 D + 0,5μM KIN. Pentru generare de calus din explanți frunze am folosit protocolul: MS (Murashige & Skoog Medium) + 1,8μM KIN, rezultate notabile având în trei săptămâni de la inocularea explantilor. Pentru producere de embrioni somatici, am folosit: MS + 4,44 μM BAP + 0,54 μM NAA + 4,65 μM KIN, având rezultate după 5 săptămâni de cultură în întuneric.

Protocolul de regenerare a explantelor urmat pentru cel mai bun răspuns al inducerii calusului la *Melissa officinalis* L. a fost următorul: MS (Murashige & Skoog Medium) + 1,5mg/l IAA+ 1,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l KIN. Pentru calus cu cel mai mare număr de celule viabile am folosit următorul protocol: MS + 1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l BAP

Obținerea extractului alcoolic

În scopul realizării extractului alcoolic au fost întreprinse următoarele etape:

- uscarea materialului vegetal conform indicațiilor furnizate de standardului *ISO 1573:1980*;
- măcinarea produsului vegetal pentru obținerea unei pulberi fine;
- cântărirea a $0,200 \pm 0,001$ g din pulberea obținută în câte două recipiente diferite, lucrându-se în paralel;
- prepararea unei soluții de metanol 70%, urmată de parcurgerea etapelor descrise în standardul *ISO 14502-1:2005* (adăugarea a 5 ml de metanol 70% la o temperatură de 70°C peste materialul vegetal, vortexarea preparatului plantă-metanol, incubarea acestuia la 70°C pentru 10', centrifugarea lui la 3500 rpm urmată de colectarea supernatantului și aducerea la un volum final de 10 ml cu metanol 70% a acestuia).

Determinarea conținutului de polifenoli totali prin metoda Folin- Ciocâlțeu:

S-a realizat conform procedurii descrise de *Tamas-Krumpe Octavia și colaboratorii* în 2010 (Tamas-Krumpe, O. Maria., et al., 2010, *The Analysis of the Biologically Active Compounds Content and the Antioxidant Potential of Some Romanian Polyfloral Honey Samples*, Filodiritto Editore – Proceedings, 2010), procedură ce constă în utilizarea reactivului Folin-Ciocâlțeu 0,2 N și a carbonatului de sodiu (Na_2CO_3) și folosirea acidului galic în concentrații diferite drept standard.

În vederea realizării curbei etalon, s-a optat pentru folosirea acidului galic drept standard cu un număr de opt concentrații diferite, respectiv: 0 μg/ml, 3,9 μg/ml, 7,8 μg/ml, 15,62 μg/ml, 31,25 μg/ml, 62,50 μg/ml, 125 μg/ml și 250 μg/ml, fiind pipetate în aceleași condiții precum probele. Rezultatele au fost raportate la concentrațiile de pe curba etalon (Fig. nr. 3.11).

Determinarea conținutului de flavonoizi totali prin metoda cu azotit de sodiu

Determinarea conținutului de flavonoizi totali din extractele alcoolice s-a desfășurat după următoarea succesiune de etape și are ca referință metoda descrisă de S. Al-Matani și colaboratorii, în 2015. (*Al-Matani, Sheikha Khamis, Ruqaiya Nasser Said Al-Wahaibi, Mohammed Amzad Hossain, 2015, Total Flavonoids Content and Antimicrobial Activity of Crude Extract from Leaves of Ficus Sycomorus Native to Sultanate of Oman, Karbala International Journal of Modern Science 1 (3): 166–71*):

- extractele au fost diluate cu apă distilată într-un raport de 1:5;
- 500 μ l din fiecare probă au fost pipetați în baloane volumetrice de 5 ml;
- s-au adăugat 150 μ l NaNO₂ (5%) proaspăt preparat, iar amestecul format a fost păstrat timp de 5' la temperatura camerei;
- după cele 5', s-au pipetat 250 μ l AlCl₃ (2%), timpul de reacție fiind de 6', la temperatura camerei;
- peste complexul nou format s-au adăugat 250 μ l NaOH, timpul de reacție fiind de 10';
- înaintea expirării celor 10', probele au fost aduse la un volum final de 5 ml cu apă distilată;
- absorbbanțele extractelor au fost citite spectrofotometric la 510 nm, cu un spectrofotometru de tip Perkin Elmer Lambda 25.

Standardul utilizat în vederea trasării curbei etalon a fost reprezentat de rutina (1 mg/ml), din care s-au preparat șase soluții cu următoarele concentrații: 0 μ g/ml, 62,5 μ g/ml, 125 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml și 1000 μ g/ml.

Determinarea capacității antioxidante totale prin metoda cu DPPH

Metoda se bazează pe măsurarea absorbbanței la lungimea de undă a maximumului specific pentru DPPH, 515 nm. În prezența unui antioxidant, absorbbanța înregistrată pentru DPPH scade, scăderea valorii fiind proporțională cu activitatea antiradicalică, iar culoarea soluției trece de la violet către galben/gălbui. Testarea s-a realizat în conformitate cu Protocolul de screening al eficienței antiradicalice a fito-compușilor utilizând DPPH (<http://fitoplat.incdsb.ro/wp-content/uploads/2017/09/Protocol-1.3.pdf>).

Efectuarea spectrelor UV-VIS

Extractele obținute au fost diluate 1:10 cu solventul utilizat la extractive. Citirile s-au efectuat utilizând o placă NanoQuant (Fig. nr.3.15) pe spectrofotometrul TECAN M1000 Pro pe domeniul 190-400 nm cu pași de 1 nm.

Evaluarea activității antimicrobiene - determinarea procentului de inhibiție a creșterii bacteriene prin metoda microdiluțiilor în bulion

Metoda constă în testarea activității agentului antibacterian într-un mediu de creștere lichid (inocul bacterian) distribuit în plăci de microtitrare. Raportarea valorilor obținute în urma citirii spectrofotometrice a densităților optice pentru complexul format se efectuează față de anumiți martori: câte unul pentru fiecare dintre agenții antibacterieni și pentru culturile asupra cărora se realizează determinările.

Capitolul 2.2. Rezultate și discuții

Prelucrarea matematică a datelor experimentale:

Datele experimentale au fost prelucrate prin:

1.1 analiza varianței: monofactorială, bifactorială, trifactorială

- s-a calculat: testul F, testul STUDENT, testul DUNCAN, aportul factorilor luați în studiu

1.2. analiza regresiei și corelațiilor - parametrii formulelor empirice au fost determinați prin metoda celor mai mici pătrate,

- s-a calculat: corelații liniare simple, coeficienții de regresie, coeficientul de corelație [r], coeficientul de determinare parțială [$d=r^2*100$], testul F și testul t

Programele utilizate: - pentru analiza varianței – STATISTICA [ANOVA], MSTATC

- pentru corelații și regresii – STATISTICA – Regresii și Graphs

- procedurile cu formule privind aportul factorilor și DL-uri - în EXCEL

Contribuții privind determinarea capacității germinative a semințelor de *Calendula officinalis*L., *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L. în cutii Petri și pe medii de cultură

Obiectivul acestui capitol a fost acela de reducere a timpului de germinare a semințelor speciilor amintite, prin inițierea mai multor tipuri de culturi, folosirea mai multor genotipuri din cadrul aceleiași specii,

repetiții multiple pentru fiecare genotip în parte, procurarea semințelor de la mai mulți distribuitori - toate acestea pentru un randament sporit precum și pentru obținerea unor plante sănătoase, care vor fi folosite în cercetările viitoare. Materialul vegetal a constat din semințe ale speciilor *Calendula officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L.

Contribuții privind determinarea capacității germinative a semințelor de *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L. în cutii Petri

Corelații privind capacitatea germinativă în cutii Petri, la cele trei genotipuri ale speciei *Calendula officinalis*.

La specia *Calendula officinalis*, s-au folosit trei genotipuri diferite (*Calendula officinalis* Double Balls mixed, *Calendula officinalis* Fiesta Gitana Mix, *Calendula officinalis* Mix).

Analizând ecuațiile de regresie din Tabelul nr.4.8 se constată că între numărul de zile și procentul de germinare, indiferent de genotipul luat în studiu, există o corelație pozitivă (coeficientul de regresie este pozitiv). Prin creșterea cu o zi a timpului de germinare, procentul crește cu 2,2% la *Calendula officinalis* Double Balls Mixed, 2,5 % la *Calendula officinalis* Fiesta Gitana Mixed și 2,1% la *Calendula officinalis* Mix.

Conform coeficientului de corelație [r] se constată o corelație pozitivă foarte pronunțată. La cele trei genotipuri, coeficientul de corelație a luat valori peste 0,94. Coeficienții de corelație sunt asigurați statistic pentru probabilitatea de transgresiune $\alpha = 0.1\%$.

Conform coeficientului de determinatie [d] putem spune că numărul de zile a influențat capacitatea germinativă în cutii Petri, în proporție de 88% la *Calendula officinalis* Double Balls Mixed, 90% la *Calendula officinalis* Fiesta Gitana Mixed și 96% la *Calendula officinalis* Mix (Tabelul nr. 4.8).

Corelații privind capacitatea germinativă în cutii Petri, la cele trei genotipuri ale speciei *Thymus vulgaris* L.

Analizând ecuațiile de regresie din Tabelul nr.4.12 se constată că între numărul de zile și procentul de germinare, indiferent de genotipul luat în studiu, există o corelație pozitivă (coeficientul de regresie este pozitiv). Prin creșterea cu o zi a timpului de germinare, procentul crește cu 2,2% la *Thymus vulgaris* L. FloraSelf, cu 2% la *Thymus vulgaris* L. Timo (Sem-Luca) și cu 1,98% la *Thymus vulgaris* L. Nova Sem. Se constată o corelație pozitivă foarte pronunțată. La cele trei genotipuri coeficientul de corelație a luat valori peste 0.89. Coeficienții de corelație sunt asigurați statistic pentru probabilitatea de transgresiune $\alpha = 0.1\%$.

Conform coeficientului de determinatie [d] putem spune că numărul de zile a influențat procentul de germinare în cutii Petri, în proporție de 90% la *Thymus vulgaris* L. FloraSelf, 85% la *Thymus vulgaris* L. Timo (Sem-Luca) și 79% la *Thymus vulgaris* L. Nova Sem.

Sinteza corelațiilor privind procentul de germinare în cutii Petri, la cele trei genotipuri ale speciei *Melissa officinalis* L.

Din tabelul nr.4.14 se constată că există o corelație pozitivă între procentul de germinare și numărul de zile, indiferent de genotip (coeficientul de regresie este pozitiv). Prin creșterea cu o zi a timpului, germinarea crește cu 2,08% *Melissa officinalis* L. FloraSelf, 2,27% la *Melissa officinalis* L. Amia și 2,43% (*Melissa officinalis* L. Agrosel).

Conform coeficientului de corelație [r] se constată o corelație pozitivă foarte pronunțată. La cele trei genotipuri coeficientul de corelație a luat valori peste 0.91. Coeficienții de corelație sunt asigurați statistic pentru probabilitatea de transgresiune $\alpha = 0.1\%$.

Conform coeficientului de determinatie [d], numărul zilelor de germinare în cutii Petri, a influențat capacitatea germinativă în proporție de 83% la *Melissa officinalis* L. FloraSelf, 84% la *Melissa officinalis* L. Amia și 93% *Melissa officinalis* L. Agrosel (Tabelul nr. 4.14).

Sinteza corelațiilor privind procentul de germinare la cele trei specii, în cutii Petri

Indiferent de specie, corelația dintre numărul de zile și procentul de germinare este una liniară pozitivă și foarte puternică (Tabelul nr. 4.15).

Contribuții privind determinarea capacității germinative a semințelor de *Calendula officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L., pe medii de cultură

La specia *Calendula officinalis*, s-au folosit trei genotipuri diferite (*Calendula officinalis* Double Balls mixed, *Calendula officinalis* Fiesta Gitana Mix, *Calendula officinalis* Mix). Rezultatele studiului au fost evaluate

la 7; 14 și 21 zile, urmărindu-se capacitatea germinativă prin repetiții și metode diferite de inițiere a germinării, pe trei medii de cultură: varianta V_0 - MS (Murashige & Skoog Medium) fără hormoni, V_1 - MS + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA_3 și V_2 - MS + 1 mg/l BAP+0.5 mg/l GA_3 .

La specia *Thymus vulgaris* L., am folosit semințe: *Thymus vulgaris* (Cimbru, FloraSelf), *Thymus vulgaris* (Cimbrisor-soi Timo, Sem-Luca) și *Thymus vulgaris* (Nova Sem), iar la *Melissa officinalis* L. am folosit un singur genotip, de la FloraSelf. Cercetările experimentale au fost realizate la 7; 14 și 21 de zile de la inducerea germinării, pe două medii de cultură MS0 și MS + GA_3 .

Genotipul a contribuit la realizarea capacității germinative în proporție de 7,81%, mediul de cultură cu 34,06%, numărul de zile cu 39,69%, iar interacțiunile dintre genotip și mediul de cultură cu 1,55%, genotip x timp (nr.de zile) cu 2,97%, mediul de cultură x timp cu 6,74% și genotip x mediul de cultură x timpul cu 2,56%. Aportul cel mai mare asupra germinării, l-a avut numărul de zile cu 39,69% (Fig. nr. 4.12).

Rezultate experimentale privind procentul de germinare la *Thymus vulgaris* L., în funcție de mediul de cultură (test Student)

În ceea ce privește procentul de germinare la specia *Thymus vulgaris* L., în funcție de mediul de cultură, varianta MS + GA_3 , a dat un surplus de 6% față de varianta MS0 (martor), fiind distinct semnificativ (Tabelul nr. 4.26).

Rezultate experimentale privind procentul de germinare la *Melissa officinalis* L., în funcție de mediul de cultură (test Student)

Rezultatele experimentale privind procentul de germinare la *Melissa officinalis* ne indică faptul că varianta MS + GA_3 , a dat un surplus de 12% față de martor MS0, surplus distinct semnificativ (Tabelul nr. 4.28).

Contribuții privind determinarea creșterii (înălțimea plantulei) pe medii de cultură, la speciile *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L.

În cazul speciei *Calendula officinalis* am folosit variantele MS0+0.5MG/L 2.4D+0.5MG/L GA_3 și MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA_3 , iar la *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L. - MS0+0.8 MG/L KIN+1.5 MG/L BAP și MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA_3 .

Cercetări privind înălțimea plantulelor la cele trei genotipuri ale speciei *Calendula officinalis*, pe medii de cultură (cm)

În ceea ce privește înălțimea plantei la cele trei genotipuri luate în studiu pe medii de cultură, se observă că valori mai ridicate s-au obținut la *Calendula officinalis* Mix cu 3,06 cm pe varianta MS0+0.5MG/L 2.4D+0.5 MG/L GA_3 , iar cea mai scăzută s-a înregistrat la varianta MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA_3 , la toate genotipurile (Tabelul nr. 5.2).

Cercetări privind înălțimea plantulei la cele trei genotipuri ale speciei *Thymus vulgaris* L., pe medii de cultură (cm)

În ceea ce privește înălțimea plantei la cele trei genotipuri luate în studiu pe medii de cultură, se observă că valori mai ridicate s-au obținut la *Thymus vulgaris* L. (Nova sem) cu 3,34 cm pe varianta MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA_3 , iar cea mai scăzută s-a înregistrat la varianta MS0+0.8 MG/L Kin+1.5 mg/l BAP, la toate genotipurile (Tabelul nr. 5.5).

Rezultate experimentale privind înălțimea plantulelor (cm) la *Melissa officinalis* L., în funcție de mediul de cultură

La specia *Melissa officinalis* L., superioritatea variantei MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA_3 față de cealaltă variantă (MS0+0.8 MG/L KIN+1.5 mg/l BAP) este distinct semnificativă, sporul fiind de 40,3%, în ceea ce privește înălțimea plantei (Tabelul nr. 5.9).

Contribuții privind determinarea capacității de calusare a celor trei specii medicinale și aromatice studiate, folosind explanți nodali și frunze, cu obținerea calusului și a embrionilor somatici

Obiectivul cercetării a fost acela de optimizare a variantelor de obținere a calusului, prin realizarea unei metode eficiente de îmbunătățire a mediului de cultură cu hormoni vegetali-citochinină și auxină, precum și a nivelului pH-ului din mediu, finalizând procesul prin stabilitatea plantelor regenerare și obținerea unei colecții de calus cu potențial bioproductiv pentru fiecare specie studiată.

Obținerea de calus la specia *Calendula officinalis* L. Cele mai bune rezultate pentru obținerea calusului la *Calendula officinalis*, au fost obținute prin suplimentarea MS-ului cu concentrații diferite de

hormoni ca BAP – benzilaminopurină (2 mg/l) singur sau combinat cu 0,1 mg/l de NAA (Naphthalene Acetic Acid). Substanțele termolabile (vitaminele, NAA, BAP) s-au sterilizat prin filtrare. Au rezultat două variante a câte cinci repetiții. Observațiile efectuate la 15, 30 și 60 de zile de cultură au evidențiat faptul că pe mediul de cultură suplimentat cu ANA ca sursă de auxină, s-a format calus. S-a evidențiat faptul că procesele de organogeneză la gălbenele, se diferențiază în funcție de sursa de explant, mediile de cultură și combinația regulatorilor de creștere.

La specia *Calendula officinalis*, am folosit aceleași genotipuri (*Calendula officinalis* Double Balls mixed, *Calendula officinalis* Fiesta Gitana Mix și *Calendula officinalis* Mix), urmărind procentul de calusare pe diferite medii de cultură și anume: MS0+1MG/L BAP, MS0+2MG/L BAP, MS0+0.5MG/L ANA+2MG/L BAP, MS0+1MG/L ANA+3MG/L BAP.

Rezultate privind procentul de calusare la specia *Calendula officinalis* în funcție de genotip și mediile de cultură

În ceea ce privește procentul de calusare la *Calendula officinalis*, se observă că dintre cele patru variante, MS0+1MG/L ANA+3MG/L BAP a dat cele mai bune rezultate, pe toate genotipurile. Dintre acestea s-a evidențiat *Calendula officinalis* Double Balls Mixed cu 60%, urmat de *Calendula officinalis* Mix (56%) și *Calendula officinalis* Fiesta Gitana Mixed cu 51%. Cel mai scăzut procent de calusare s-a înregistrat la *Calendula officinalis* Fiesta Gitana Mixed, pe MS0+1MG/L BAP (20%) (Tabelul nr. 6.2).

Obținerea de calus la specia *Thymus vulgaris* L.

Pentru inducerea calusului, cea mai eficientă variantă a fost prin folosirea explanților nodali pe un mediu de cultură (Murashige & Skoog Medium) suplimentat cu 1,8 μ M 2,4-D și 0,5 μ M KIN. Acesta a fost generat după două săptămâni. Calusul obținut cu combinația 1,8 μ M 2,4-D și 0,5 μ M KIN a fost alb, friabil și globular.

Pentru producerea de embrioni somatici, după cinci săptămâni de cultură în întuneric și obținerea a 27 de embrioni somatici/45 mg de calus, s-a suplimentat mediul de cultură cu 4,44 μ M BAP + 0,54 μ M NAA + 4,65 μ M KIN. Pentru germinare și regenerarea plantelor, embrionii somatici au fost transferați în mediul MS fără regulatori de creștere ai plantelor, iar conversia plantulelor de la embrioni somatici dezvoltați a fost de 90%.

În cazul folosirii ca explanți-frunze, acestea au generat calus după trei săptămâni de la inițierea culturii, utilizând următoarea formulă: MS (Murashige-Skoog medium) + 1,8 μ M KIN. Procentul de obținere a calusului de la explanți-frunze, a fost de 67%. Alegerea mediului de cultură Murashige-Skoog asociat cu diferite formule de vitamine și diverse concentrații de hormoni, precum și alegerea tipului de explant corespunzător, au contribuit la determinarea ratei de inducere a calusului.

La specia *Thymus vulgaris* L., am folosit semințele obținute de la: FloraSelf, soiul Timo, (Sem-Luca) și Nova Sem, pe trei medii de cultură: MS0+0.8 mg/l KIN+1.5 mg/l BAP, MS + 0.5 mg/l KIN + 2.0 mg/l BAP, MS + 1 mg/l KIN + 2.0 mg l⁻¹ 2.4 D.

În ceea ce privește capacitatea de calusare la *Thymus vulgaris* L., se observă că dintre cele trei variante, MS + 1mg/l KIN + 2.0 mg l⁻¹ 2.4 D, a dat cele mai bune rezultate, pe toate genotipurile. Dintre acestea s-a evidențiat *Thymus vulgaris* L. (FloraSelf) cu 77%, urmat de soi Timo, de la Sem-Luca (72%) și *Thymus vulgaris* L. (Nova sem) cu 61%. Cel mai scăzut procent de calusare s-a înregistrat la *Thymus vulgaris* L. (Nova sem) pe MS0+0.8 mg/l KIN+1.5 mg/l BAP (29%) (Tabelul nr. 6.6).

Obținerea de calus la specia *Melissa officinalis* L.

Pentru inducerea calusului la *Melissa officinalis* L. explantele au fost excizate doar din hipocotilele (porțiunea din tulpina unei plantule cuprinsă între cotiledoane și baza rădăcinii) răsadurilor vechi de 20 de zile și cultivate pe MS suplimentate cu diferite concentrații de 2,4-D (0,0 – 3 mg/l), NAA (0,0-2 mg/l), BAP (1 - 2 mg/l) și KIN (0,5 mg/l) pentru a evalua răspunsurile comparative ale acestor variante la creșterea calusului.

PH-ul tuturor mediilor s-a ajustat la 5,8 cu 0,1 N de NaOH înaintea autoclavării la 121°C. Fiecare tratament a fost replicat de cinci ori și fiecare replică a constat în 20 de explante.

Au fost evaluate procentul de inducție a calusului, volumul de calus și numărul zilelor de inducere a calusului. Calusul obținut din hipocotile a fost transferat într-un mediu proaspăt cu aceeași compoziție ca a celui folosit anterior pentru inducerea calusului. A fost subcultivat la fiecare două săptămâni. Analizele statistice au fost efectuate utilizând compararea variantelor.

Inducerea calusului a fost obținută prin utilizarea IAA = 1,5 mg/l, NAA = 1,5 mg/l și KIN = 0,5 mg/l. Calusul obținut avea culoarea de un galben pal, friabil, cu sau fără mici globule verzi. După 25 de zile de incubație pe Kinetin de 1 mg/l, explanții hipocotili au prezentat calus cu lăstari accidentali.

Explanțele de hipocotile au produs în mod semnificativ mai mult calus decât cele de la baza frunzelor cotiledonare și a vârfurilor de lăstari. Inducerea remarcabilă a calusului a fost obținută în mediu MS conținând 2,4-D cu 1 mg/l, NAA cu 1 mg/l și KIN cu 0,5 mg/l. Prezența exclusivă a auxinelor în mediu, indiferent de concentrația lor, nu a fost suficientă pentru formarea calusului. Combinația de auxine și citochinine nu a indus doar calus mai friabil, numărul de zile necesare inducerii calusului a fost, de asemenea, mai scurt decât ale altor tratamente. Rezultatele au arătat că două tipuri de auxine cu citochinine au mai mult efect decât o auxină cu o citochinină. Efectul NAA și al BAP sau calii moi și albi induși de 2,4-D și KIN nu au fost adecvați pentru cultura celulelor în suspensie. De asemenea, hiperhidricitatea a fost mare în aceste cercetări. Mediul conținând 2,4-D, mai degrabă decât NAA, a fost în general mai eficient pentru inducerea calusului.

Analiza procentului de calusare la *Melissa officinalis* L., realizat pe cele trei variante evidențiază faptul că, acesta se situează între 33% – 58%. Procentul cel mai mare de 58% s-a obținut pe mediul MS + 0.5MG/L 2.4D + 2.0 MG/L BAP, iar cel mai mic pe MS0+0.5MG/L KIN+1.5 MG/L ANA+1.5MG/L BAP (Fig.nr. 6.10).

Contribuții privind multiplicarea (regenerarea plantulelor folosind vârfuri de creștere și frunze) la cele trei specii medicinale și aromatice studiate

Pentru etapa de multiplicare s-au testat două tipuri de explante: microbutași ai lăstarilor regenerați "in vitro" și frunze secționare de pe aceștia, întrebuintate în scopul regenerării adventive. Pentru multiplicarea prin microbutași s-au utilizat concentrații mai reduse de hormoni (0,15-2 mg/l BAP, ZEAT, KIN, IBA, AIA), singure sau în diverse combinații. S-a analizat atât rata de multiplicare cât și cea de proliferare. S-a testat regenerarea directă sau indirectă din frunzele obținute "in vitro", ca metodă de eficientizare a ratei de multiplicare.

Capacitatea de multiplicare în cazul speciei *Calendula officinalis*

La specia *Calendula officinalis* am folosit cele trei genotipuri Double Balls Mixed, Fiesta Gitana Mixed și *Calendula officinalis* Mix, pe două medii de cultură: MS0+0.5MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃ și MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃.

La *Calendula officinalis*, genotipul, varianta și interacțiunea dintre genotip și mediul de cultură au o acțiune ne semnificativă asupra procentului de multiplicare. Atât între variante cât și între genotipuri nu există diferențe semnificative, asigurate statistic (Tabelul nr. 7.1).

În ceea ce privește interacțiunea genotipului cu mediul de cultură la *Calendula officinalis*, se observă că rata de multiplicare este mai mare în cazul variantei MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃, la toate genotipurile luate în studiu, diferența mai mare între variante, înregistrându-se la *Calendula officinalis* Double Balls Mixed (58,14% respective 37,06%) (Tabelul nr. 7.2).

Varianta MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃ este superioară față de MS0+0.5MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃, indiferent de genotip, procentul de multiplicare obținut la aceasta variaza între 58,14 - 60,75%. Cele mai mici procente de multiplicare s-au obținut pe mediul MS0+0.5MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃, procente ce au variat între 37,06% - 60,12%.

Capacitatea de multiplicare în cazul speciei *Thymus vulgaris* L.

La specia *Thymus vulgaris* L. am folosit cele trei genotipuri de la FloraSelf, Sem - Luca și Nova Sem, cultivate pe două medii de cultură: MS0+0.8 MG/L KIN+1.5 MG/L BAP și MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃.

În ceea ce privește interacțiunea genotipului cu mediul de cultură la *Thymus vulgaris* L., se observă că rata de multiplicare este mai mare în cazul variantei MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃, la toate genotipurile luate în studiu, diferența mai mare între variante, înregistrându-se la *Thymus vulgaris* L. (FloraSelf) (51,83% respective 66,08%) (Tabelul nr. 7.6).

Capacitatea de multiplicare în cazul speciei *Melissa officinalis* L.

În ceea ce privește capacitatea de multiplicare în cazul speciei *Melissa officinalis* L., am folosit un singur genotip, de la FloraSelf, iar cercetările experimentale au fost realizate pe două medii și anume: MS0+0.8 MG/L KIN+1.5 MG/L BAP și MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃.

Din tabelul 7.10, se observă că surplusul de 5% dat de varianta MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃ față de MS0+0.8 MG/L KIN+1.5 MG/L BAP este ne semnificativ. Cele două medii de cultură sunt omogene în ceea ce privește capacitatea de multiplicare (Tabelul nr. 7.10).

Procentul de multiplicare în cazul speciei *Melissa officinalis* L. obținut la cele două variante, a variat între 68 – 73%, cel mai ridicat înregistrându-se pe mediul MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃ (Fig. nr. 7.9).

Contribuții privind evaluarea spectrelor UV-VIS NanoQuant Tecan M1000 Pro, evaluarea conținutului total de polifenoli, a flavonoizilor totali, a capacității antioxidante și activitatea antibacteriană a extractelor de *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L. și *Melissa officinalis* L.

Contribuții privind evaluarea spectrelor UV-VIS NanoQuant TECAN M1000 Pro

Spectroscopia UV-VIS este o metodă care poate fi efectuată pentru analiza calitativă și pentru identificarea anumitor clase de compuși atât în amestecuri pure cât și biologice. Preferențial, spectroscopia în UV-VIS poate fi folosită pentru analiza cantitativă deoarece moleculele aromatice sunt cromofori puternici. Principiul de bază al spectroscopiei este trecerea radiației electromagnetice printr-un moleculă organică care absoarbe o parte din radiație, dar nu toate. Prin măsurarea cantității de absorbție de radiație electromagnetică, se poate produce un spectru. Spectrele sunt specifice anumitor legături într-o moleculă. În funcție de aceste spectre, se poate identifica structura moleculei organice.

Compușii naturali pot fi determinați utilizând spectroscopie UV-vizibil. Compușii fenolici inclusiv antociani, taninuri, coloranți polimerici și fenoli formează complecși cu fierul care au fost detectați prin spectroscopie UV-Vis. Mai mult, spectroscopic tehnicile UV-Vis oferă informații despre compoziția conținutului total de polifenoli. Spectroscopia UV-Vis a fost utilizată în cazul extractelor de *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris* și *Calendula officinalis* pentru a evalua calitativ, comparativ, conținutul de acizi fenolici liberi sau derivați ai acestora cu o absorbție maximă în intervalul 230 -290 nm, compuși flavonoidici care sunt prezenți în formă liberă sau sub formă de derivați glicozilați care absorb în domeniul 280 - 330 nm și nu în ultimul rând compuși flavonoidici cu structură mare precum și chinone derivate prin oxidarea polifenolilor (380 – 420 nm).

Dintre compuşii fenolici (cu domeniul UV caracteristic cuprins între 230-290 nm), în cazul roiniței (*Melissa officinalis*), conform datelor din literatura de specialitate, majoritar este acidul rosmarinic, un ester al acidului cafeic. Plantele din familia Lamiaceae au capacitatea de a sintetiza acidul rosmarinic din cei doi aminoacizi: L-fenilalanina și tirozina, acesta putând îndeplini funcții precum cea antivirală și antibacteriană, dar mai ales cea antioxidantă. Se observă ca în cazul variantei in vitro, absorbanta pe acest domeniu este mult mai ridicată. Pe domeniul UV superior pragului de 280 nm, domină compușii flavonoidici, care, în acest context sunt reprezentați de luteolină, un antihistaminic natural, care, pe lângă această proprietate îndeplinește și funcția de antioxidant și agent anti-tumoral. Din punct de vedere structural, compusul este clasificat în subclasa flavonelor și este alcătuit din patru grupări hidroxi poziționate în pozițiile 5-, 7-, 3'- și 4'- (Fig.nr.8.1 a și b).

Pentru *Thymus vulgaris*, domeniul UV cuprins între 230-290 nm caracterizează compuși fenolici precum timolul. Acest monoterpenoid fenolic, pe de altă parte, reprezintă un compus majoritar, caracteristic cimbrului. Un important compus flavonodic, caracteristic domeniului UV de peste 280 nm este acid cinamic (Fig.nr.8.2). Datorită legăturii duble C = C, molecula de acid cinamic are doi izomeri: *cis*, respectiv *trans*. Caracteristic regnului vegetal este izomerul *trans*, care are la bază un aminoacid, adică fanilalanina. Din punct de vedere farmacologic, acest acid a fost utilizat pentru importanța sa funcție antiproliferativă, studiile actuale din literatura de specialitate demonstrând capacitatea sa de contracarare a unor procese neoplazice precum osteosarcoamele. Pe lângă acestea, acidul cinamic este un bun hepatoprotector și antioxidant.

În cazul gălbenelelor (*Calendula officinalis*), pe domeniul UV 230-290 nm se remarcă acidul cafeic, un compus polifenolic (acid hidroxicinamic) intermediar important în procesul de biosinteză a ligninei. Principala funcție a acestui compus este cea antioxidantă, fiind un mediator remarcabil în procesul de neutralizare a formării de radicali liberi. Pe domeniul superior celui precizat, respectiv peste 280 nm (Fig.nr.8.3), în câmpul UV, în acest caz domină flavonoizi precum rutina, quercetina sau isoquercetina. Cea din urmă reprezintă unul din compușii majoritari în cazul *Calendula officinalis*. Aceasta este 3-O-glucozida quercetinei, fiind cunoscută și sub denumirea de hirsutrina. Izoquercetina poate îndeplini funcții precum cea cardio și neuroprotectivă, prin capacitatea sa antioxidantă care, în momentul actual este încă în curs de analiză.

Contribuții privind evaluarea conținutului total de polifenoli

Polifenolii, metaboliți secundari ai plantelor, sunt derivați din L-fenilalanina pe calea fenilpropanoidului și se caracterizează prin prezența în compoziția lor a cel puțin două grupări fenolice asociate în structuri mai mult sau mai puțin complexe, în general cu greutate moleculară mare; totuși, această clasă include și acizii

fenolici, considerați precursori de polifenoli. Prin urmare, polifenolii totali includ, dar nu se limitează numai la, acizi fenolici, cumarine, flavonoide și lignani. De asemenea, din categoria polifenolilor fac parte și alte forme polimerizate, precum taninurile și ligninele (Hano C, Tungmunnithum D.).

Rezultatele prezentate în tabelul nr. 8.1 vizează conținutul polifenolic total pentru cele trei specii de plante luate în studiu, respectiv *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* și *Melissa officinalis*. Dintre acestea, conținutul cel mai ridicat de polifenoli totali (mg GAE/g SU) s-a obținut în cazul extractelor de *Melissa officinalis*, cu valori cuprinse între $90,61 \pm 3,80$ (în condiții normale de creștere, respectiv "ghiveci") și $96,50 \pm 2,00$ (obținute din culturi *in vitro*). Diferența dintre aceste valori, cauza a condițiilor preanalitice (condițiilor de mediu), aproximativ 6 mg GAE/g SU, reprezintă o valoare considerabilă din punct de vedere al capacității de exercitare a unor funcții antioxidante datorate conținutului polifenolic.

Această tentă de diferențiere a valorilor pentru cele două condiții de creștere, respectiv condiții normale de mediu (ghiveci) și în mediu controlat (*in vitro*) s-a menținut și în cazul extractelor obținute din *Thymus vulgaris* și *Calendula officinalis*. În cazul cimbrului, pentru extractele obținute din culturi *in vitro*, rezultatele au atins valoarea de $95,28 \pm 1,00$ mg GAE/g SU, în timp ce, pentru extractele provenite din plante crescute în condiții normale, "în ghiveci", valoarea obținută a fost cu aproximativ 5 mg GAE/g SU mai mică, respectiv $90,57 \pm 2,18$ mg GAE/g.

Pentru extractele de *Calendula officinalis in vitro*, conținutul polifenolic total a atins valoarea de $35,41 \pm 1,70$ mg GAE/g SU, valoare considerabil mai mică decât în cazul celorlalte specii de plante din studiu. Pentru gălbenelele obținute în condiții de ghiveci, conținutul polifenolic total nu a depășit valoarea de $21,23 \pm 0,74$ mg GAE/g SU, aceasta fiind cu cel puțin 10 mg GAE/g SU sub valoarea obținută în condițiile *in vitro*.

Contribuții privind evaluarea conținutului total de flavonoizi

Flavonoizii reprezintă un grup complex de metaboliți secundari fenolici, larg răspândiți în lumea vegetală [Jaakola, L., & Hohtola, A. 2010]. Aceștia sunt compuși cu structură polifenolică a căror biosinteză pornește de la doi aminoacizi, respectiv fenilalanină și tirozină, având ca structură standard nucleul de tip flavan, format din 15 atomi de carbon, dispuși sub forma a trei inele (Pietta, P.G., 2000). Flavonoizii se acumulează de obicei în vacuolele plantei sub formă de glicozide.

Pentru extractele alcoolice de *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* și *Melissa officinalis*, conținutul de flavonoizi total obținut prin metoda cu azotit de sodiu este reprezentat în tabelul nr. 8.2. Precum în cazul polifenolilor, conținutul cel mai reprezentativ, cu o valoare mult peste limita celorlalte extracte, a fost obținut pentru *Melissa officinalis*. Totuși, valoarea de $178,62 \pm 6,34$ mg RUE/g SU din cazul plantei cultivate în condiții normale (în ghiveci), a fost cu aproximativ 20 mg RUE/g SU ($155,73 \pm 6,66$ mg RUE/g SU) mai mare decât în cazul culturilor *in vitro*, fapt ce ar putea indica avantajul cultivării roiniței în condiții cât mai apropiate de cele ale mediului natural. În cazul celorlalte extracte, respectiv *Calendula officinalis* și *Thymus vulgaris*, cele mai mari valori obținute au fost pentru extractele provenite din plante cultivate *in vitro*. Conținutul în flavonoizi totali pentru gălbenelele *in vitro* a indicat o valoare de $27,86 \pm 1,78$ mg RUE/g SU, iar în condiții normale de creștere (ghiveci), $24,59 \pm 1,78$ mg RUE/g SU. Aceeași tentă descendentă s-a înregistrat și pentru *Thymus vulgaris*, respectiv $38,44 \pm 1,30$ mg RUE/g SU pentru culturile *in vitro* și $20,00 \pm 1,48$ mg RUE/g SU pentru plantele obținute în condiții normale de creștere și dezvoltare.

Contribuții privind evaluarea capacității antioxidante

Parametrul IC_{50} (half maximal inhibitory concentration), determinat din surse vegetale, are ca scop oferirea unei imagini mai exacte a activității antioxidante exercitate de către compușii biologici activi din structura plantelor. Această concentrație este direct proporțională cu cantitatea și calitatea compușilor antioxidanți. Astfel, IC_{50} vizează efectul sinergic dat de grupurile antioxidante majore ale plantelor, respectiv polifenoli și vitamine (A, C și E). De asemenea, compușii fenolici sunt derivați hidroxilați ai acidului benzoic și ai acizilor cinamici, care posedă importante efecte antioxidante. Aceștia includ fenolii, flavonoidele, cumarinele, taninurile și antocianidinele. Pe lângă această funcție, compușii fitochimici sunt importanți și în contextul mecanismelor de apărare împotriva stresului biotic și abiotic (Muthoni Guchu B, Machocho AKO, Mwihiya SK, Ngugi MP, 2020).

Pentru cele trei extracte alcoolice, *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* și *Melissa officinalis*, valorile IC_{50} sunt prezentate în Tabelul nr. 8.3a și 8.3b, respectiv Tabelul nr. 8.4a și 8.4b și Tabelul nr. 8.5a și 8.5b. Fiind în strânsă corelație cu activitatea antioxidantă, valoarea IC_{50} (concentrația inhibitorie maximă 1/2) este concentrația probei capabilă să elimine 50% din radicalii liberi în cadrul metodei DPPH (2,2-difenil-1-

picrilhidrazil) de evaluare a acestora. Valoarea IC_{50} este invers proporțională cu activitatea de captare a radicalilor liberi, deci cu proprietatea antioxidantă a extractului. Aceasta înseamnă că, pentru neutralizarea radicalilor liberi, în cazul în care valoarea IC_{50} este una mică, proba exercită o activitate antioxidantă remarcabilă, fiind nevoie numai de o cantitate mică din aceasta pentru realizarea procesului de contracarare a radicalilor liberi. Practic, cu cât valoarea IC_{50} este mai mică, cu atât activitatea antioxidantă a extractului este mai însemnată și vice-versa.

În acest context, pentru plantele luate în discuție, activitatea antioxidantă cea mai ridicată, deci valoarea IC_{50} cea mai mică, a fost înregistrată în cazul extractului provenit din culturi *in vitro* de *Thymus vulgaris*, $36,01 \pm 0,28 \mu\text{l/ml}$. Pentru același extract, dar obținut din plante crescute în condiții normale ("în ghiveci"), valoarea IC_{50} a fost de $71,75 \pm 0,11 \mu\text{l/ml}$.

Pentru *Calendula officinalis* din culturi *in vitro*, IC_{50} a fost egală cu $139,57 \pm 3,22 \mu\text{l/ml}$, iar pentru aceeași plantă, cultivată în condiții normale, concentrația a fost de $182,50 \pm 3,73 \mu\text{l/ml}$. Valori foarte bune ale IC_{50} s-au obținut și în cazul extractelor de *Melissa officinalis*, respectiv $51,55 \pm 1,14 \mu\text{l/ml}$ pentru culturile *in vitro* și $90,18 \pm 0,59 \mu\text{l/ml}$ pentru plantele "în ghiveci". Totuși, dinte cele trei extracte, în urma determinării concentrației inhibitorii maxime, cele mai bune rezultate, adică cea mai însemnată activitate antioxidantă, a fost obținută pentru culturile *in vitro* de *Thymus vulgaris*. Această activitate, pe lângă conținutului de polifenoli, flavonoizi, acizi fenolici (care s-a dovedit în cadrul studiului că a atins valoarea cea mai mare în cazul roiniței), s-ar putea datora, în cazul acestei plante, în special unor compuși volatili din structura sa, mai exact timolului și carvacrolului, ambilor fiindu-le recunoscute proprietățile antioxidante și antibacteriene.

Întrucât s-a demonstrat faptul că alcoolii, în concentrație ridicată pot avea efecte toxice asupra celulelor bacteriene (Dyrda, G., Boniewska-Bernacka, E., Man, D. *et al.*, 2019), cele două culturi au fost incubate în prezența unei concentrații de metanol echivalentă cu cea mai mare concentrație care s-a regăsit în extractele supuse analizei. Astfel, asupra *S. aureus*, solventul a avut un pronunțat efect inhibitor după 24 h de incubare, în timp ce producerea de biofilm nu a fost aproape deloc influențată. Asupra *E. coli*, efectul metanolului a fost mai slab la 24 h, acesta determinând o ușoară inhibare a creșterii, precum și o ușoară stimulare a formării de biofilm, la 48 h (Fig.nr. 8.5).

Pentru calcularea ratei de inhibiție (activitatea antimicrobiană și antibiofilm a extractelor), s-a folosit următoarea formulă:

$$RI\% = 100 - (OD_{\text{extract}} \times 100) / OD_{\text{control}}$$

OD_{extract} – densitatea optică a culturii bacteriene incubată în prezența extractului

OD_{control} – densitatea optică a culturii bacteriene incubată în prezența metanolului

Pentru *Thymus vulgaris*, rata de inhibare a formării biofilmului a fost superioară în cazul extractului provenit de la plantele cultivate "în ghiveci", cu 45,013% față de control, în cazul *E. coli* și cu 20,38%, în cazul *S. aureus*. Extractul provenit de la plantele cultivate *in vitro* a avut o rată de inhibare de doar 13,93% față de *S. aureus* (Fig.nr.8.6). Per total, extractele de cimbru nu au prezentat activitate antimicrobiană (Fig.nr.8.7), ci numai împotriva formării biofilmelor bacteriene.

Extractul de gălbenele obținut din plantele cultivate *in vitro* a prezentat o activitate antibacteriană foarte bună, cu o rată de inhibare a *S. aureus* de 73,41% și a *E. coli*, de 96,33%. În schimb, extractul obținut din plantele cultivate în ghiveci, a potențat creșterea bacteriană, precum și formarea biofilmului, în cazul ambelor tulpini (Fig.nr. 8.8 și 8.9). Plantele cultivate *in vitro* au inhibat formarea biofilmului cu 88,89% față de control, în cazul tulpinii de *E. coli*, respectiv cu 78,01%, în cazul *S. aureus* (Fig.nr. 8.8).

În cazul roiniței (*Melissa officinalis*) ambele extracte au fost ineficiente împotriva tulpinilor testate, atât în ceea ce privește activitatea antibacteriană, cât și inhibarea formării biofilmului. Extractul obținut din plantele cultivate *in vitro* a redus totuși formarea biofilmului de *S. aureus* cu 11,31% față de control (Fig. nr. 8.10 și 8.11).

Concluzii privind capacitatea germinativă a speciilor studiate

Cu semințele speciei *Calendula officinalis*, în prima fază, s-au obținut rezultate foarte bune privind energia germinativă și facultatea germinativă a semințelor prin metoda inoculării semințelor în cutii Petri, precum și pe medii de cultură.

Atât în cazul semințelor de *Thymus vulgaris* L. cât și în cazul semințelor de *Melissa officinalis* L., în recipientele cu MS₀ plantulele sunt mai viguroase, tulpinile sunt mai scurte, frunzele au o culoare mai puternică (verde închis) și au un diametru mai mare, pe când în recipientele unde am folosit MS cu adaus de GA₃, semințele au germinat mai repede, dar plantulele sunt mai înalte, ramificate, mai firave, culoarea frunzelor este mai palidă (verde deschis). Contează foarte mult calitatea semințelor, tocmai de aceea am folosit semințe ale speciilor studiate de la distribuitori diferiți pentru a putea face comparație și a alege varianta mai profitabilă. Sterilizarea semințelor și pregătirea pentru inoculare au fost aceleași, dar calitatea semințelor a avut un rol foarte important în rezultatele obținute în cadrul acestui studiu.

Cele mai mari valori ale germinării în cutii Petri, s-au obținut la 28 de zile și anume 96% la *Calendula officinalis* Fiesta Gitana mix, 92 % *Melissa officinalis* Amia și 88 % la *Thymus vulgaris* (Cimbrisor- soi Timo).

Pe medii de cultură s-au evidențiat *Calendula officinalis* Fiesta Gitana mix pe mediul MS + 1 mg/l BAP +0,5 mg/l GA₃ cu 84% și *Thymus vulgaris* (Cimbru, FloraSelf) pe MS + GA₃ cu 71%, la 21 de zile de la inducerea germinării. În cadrul speciei *Melissa officinalis* L., semințele de la FloraSelf, au dat cele mai bune rezultate prin inițierea culturilor "in vitro", pe MS + GA₃ (59%).

Concluzii privind determinarea creșterii la speciile *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L., pe diferite medii de cultură

La speciile luate în studiu se observă că există diferențe semnificative între genotipuri și variante (mediile de cultură), în ceea ce privește înălțimea plantulelor.

În cazul speciei *Calendula officinalis*, interacțiunea dintre genotip și variantă este semnificativă, ceea ce înseamnă că variantele urmarite în experiență au influențat diferit înălțimea plantei, de la un genotip la altul, astfel s-a evidențiat genotipul *Calendula officinalis* Mix pe mediul MS₀+0.5MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃.

La specia *Thymus vulgaris* L., interacțiunea dintre genotip și variantă este nesemnificativă, deci mediile de cultură nu au influențat diferit de la un genotip la altul, astfel se poate urmări separat genotipul și separat variantele, fără a mai fi necesară interacțiunea dintre cei doi factori. Genotipul *Thymus vulgaris* L. (Nova sem) a înregistrat o creștere mai mare a plantulelor pe mediul MS₀+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃.

Cu privire la specia *Melissa officinalis* L., mediul de cultură a avut o acțiune distinct semnificativă asupra înălțimii plantulelor, remarcându-se varianta MS₀+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA₃.

Concluzii privind inducerea calusului la speciile *Calendula officinalis*, *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L., pe diferite medii de cultură

Cele mai bune rezultate pentru obținerea calusului la *Calendula officinalis*, au fost obținute prin suplimentarea MS-ului cu concentrații diferite de hormoni ca BAP – benzilaminopurină (2 mg/l) singur sau combinat cu 0,1 mg/l de NAA (Naphthalene Acetic Acid).

În cultura frunzelor, cel mai mare CI% a fost de 93,33% cu calus friabil, de culoare bej, în mediu MS suplimentat cu 2,0 mg/L-1 de 2,4 D. Observațiile efectuate la 15, 30 și 60 de zile de cultură au evidențiat faptul că pe mediul de cultură suplimentat cu ANA, ca sursă de auxină, s-a format calus. S-a evidențiat faptul că procesele de organogeneză la gălbenele, se diferențiază în funcție de sursa de explant, mediile de cultură și combinația regulatorilor de creștere.

Pentru genotipul *Calendula officinalis* Double Balls Mixed, s-a obținut cel mai mare procent de calusare, comparativ cu celelalte două genotipuri, iar mediul de cultură MS₀+1Mg/L ANA+3MG/L BAP este net superior față de celelalte variante, indiferent de genotip.

Pentru inducerea calusului la specia *Thymus vulgaris* L., cea mai eficientă variantă a fost prin folosirea explanților nodali pe un mediu de cultură (Murashige & Skoog Medium) suplimentat cu 1,8 μM 2,4-D și 0,5 μM KIN. Acesta a fost generat după două săptămâni. Calusul obținut cu combinația 1,8 μM 2,4-D și 0,5 μM KIN a fost alb, friabil și globular. În cazul folosirii ca explanți-frunze, acestea au generat calus după trei săptămâni de la inițierea culturii, utilizând următoarea formulă: MS (Murashige-Skoog medium) + 1,8 μM KIN. Procentul de obținere a calusului de la explanți-frunze, a fost de 67%.

În ceea ce privește capacitatea de calusare la *Thymus vulgaris* L., se observă că dintre cele trei variante, MS + 1mg/l KIN + 2.0 mg/l-1 2.4 D, a dat cele mai bune rezultate, pe toate genotipurile. Dintre acestea s-a evidențiat *Thymus vulgaris* L. (FloraSelf) cu 77%, urmat de soi Timo, de la Sem-Luca (72%) și *Thymus vulgaris* L. (Nova sem) cu 61%.

În cazul speciei *Melissa officinalis* L., un rezultat bun s-a obținut cu formula: MS + 1 MG/L 2,4 D + 1 MG/L ANA + 0,5 MG/L KIN. Procesul de formare a calusului a fost mai intens atunci când 2,4-D a fost asociat cu BAP. Calusul a fost compact și verde, în cazul frunzelor și internodurilor. Calusul furnizat de internoduri și frunze pe MS suplimentat cu BAP sau cu BAP și GA3 a menținut caracteristicile sale, i-au asigurat proliferarea și formarea radiculară indusă sporadic pe suprafața sa. Acest studiu a arătat că *Melissa officinalis* L., este o specie a cărei micropropagare a plantulelor poate fi realizată prin diferite metode, incluzând regenerarea directă din vârfurile lăstarilor, împușcăturile accidentale prin organogeneza calusului și formarea indirectă a lăstarilor din explanții hipocotili.

Concluzii privind capacitatea de multiplicare la cele trei specii luate în studiu

În cazul speciei *Calendula officinalis* Mix, varianta MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA3 este superioară față de MS0+0.5MG/L2.4D+0.5MG/L GA3, indiferent de genotip, procentul de multiplicare obținut la aceasta, variază între 58,14 - 60,75%. Comparând genotipurile, observăm că indiferent de variantă, *Calendula officinalis* Mix, are valori mai mari față de celelalte genotipuri. De remarcat faptul că pe mediul de cultură MS0+1MG/L2.4D+0.5MG/LGA3, valorile procentului de multiplicare obținute la cele trei genotipuri sunt apropiate.

Comparând genotipurile de la specia *Thymus vulgaris* L., observăm că cel provenit de la Nova sem, indiferent de variantă, are valori mai mari față de celelalte genotipuri. Mediul de cultură MS0+1MG/L2.4D+0.5MG/LGA3 este superior față de MS0+0.8MG/L KIN+1.5MG/L BAP, indiferent de genotip, procentul de multiplicare obținut la această variantă variază între 66,08 – 81,08%.

Procentul de multiplicare în cazul speciei *Melissa officinalis* L. obținut la cele două variante, a variat între 68 – 73%, cel mai ridicat înregistrându-se pe mediul MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA3.

Din analizele efectuate la cele trei specii luate în studiu, putem concluziona că rata de multiplicare mai mare s-a înregistrat pe mediul de cultură MS0+1MG/L 2.4D+0.5MG/L GA3.

Concluzii cu privire la activitatea antioxidantă și antimicrobiană a speciilor studiate

Pentru *Calendula officinalis* din culturi in vitro, IC50 a fost egală cu $139,57 \pm 3,22$ μl/ml, iar pentru aceeași plantă, cultivată în condiții normale, concentrația a fost de $182,50 \pm 3,73$ μl/ml. Valori foarte bune ale IC50 s-au obținut și în cazul extractelor de *Melissa officinalis*, respectiv $51,55 \pm 1,14$ μl/ml pentru culturile in vitro și $90,18 \pm 0,59$ μl/ml pentru plantele "în ghiveci". Totuși, dintre cele trei extracte, în urma determinării concentrației inhibitorii maxime, cele mai bune rezultate, adică cea mai însemnată activitate antioxidantă, a fost obținută pentru culturile in vitro de *Thymus vulgaris*. Această activitate, pe lângă conținutului de polifenoli, flavonoizi, acizi fenolici (care s-a dovedit în cadrul studiului că a atins valoarea cea mai mare în cazul roiniței), s-ar putea datora, în cazul acestei plante, în special unor compuși volatili din structura sa, mai exact timolului și carvacrolului, ambilor fiindu-le recunoscute proprietățile antioxidante și antibacteriene.

III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Măsura în care au fost atinse obiectivele cercetării

În cadrul prezentului studiu s-a urmărit ca obiectiv general potențialul de valorificare al unor specii medicinale, inclusiv prin metode biotehnologice moderne. În acest sens au fost stabilite următoarele obiective specifice:

- Obținerea de noi plante și/sau compuși cu aplicabilitate industrială, prin utilizarea condițiilor de cultură adecvate;
- Testarea energiei și capacității germinative pe medii diferite de cultură, a celor trei specii ornamentale, aromatice și medicinale studiate;
- Obținerea unei colecții de calus cu potențial bioproductiv pentru fiecare specie studiată;
- Testarea capacității de micropropagare a celor trei specii aromatice și medicinale studiate, prin folosirea unei balanțe hormonale echilibrate.
- Analizele de laborator pentru obținerea polifenolilor și flavonoizilor totali ai speciilor studiate, capacitatea antioxidantă totală, evaluarea spectrelor UV-VIS, activitatea antimicrobiană.;

Putem concludiona faptul că, rezultatele obținute cu ajutorul metodelor și tehnicilor de cercetare aplicate asigură integral atingerea obiectivelor specifice urmărite, iar rezultatele obținute sunt deosebit de valoroase și pot sta la baza unor viitoare studii importante pentru diversificarea potențialului de valorificare a speciilor de plante cercetate.

Direcțiile în care trebuie continuată cercetarea

Pe baza rezultatelor obținute și analizate considerăm că temele de cercetare abordate în prezenta teză de doctorat pot fi extinse și aprofundate prin studii ulterioare.

Contribuțiile proprii ale autorului

Prezentul studiu propune o abordare integrată prin care speciile studiate au fost analizate. Pentru fiecare direcție de studiu, autorul a realizat următoarele contribuții proprii:

- cu privire la **Obținerea de noi plante și/sau compuși cu aplicabilitate industrială, prin utilizarea condițiilor de cultură adecvate** – autorul a inițiat studii de indentificatre a unor medii de cultură adecvate fiind totodată studiate și tatonate diferite balanțe hormonale adiționate în mediul de cultură;
- cu privire la **Testarea energiei și capacității germinative pe medii diferite de cultură, a celor trei specii ornamentale, aromatice și medicinale studiate** – autorul a realizat studii comparative în ceea ce privește capacitatea de germinare in vivo și in vitro;
- cu privire la **Obținerea unei colecții de calus cu potențial bioproductiv pentru fiecare specie studiată** – autorul a reușit să identifice varianta adecvată a mediului de cultură utilizat pentru obținerea calusului, fiind realizată totodată și o analiză a potențialului de calusare în cazul celor trei specii studiate;
- cu privire la **Analizele de laborator pentru obținerea polifenolilor și flavonoizilor totali ai speciilor studiate, capacitatea antioxidantă totală, evaluarea spectrelor UV-VIS, activitatea antimicrobiană** – autorul a realizat o abordare complexă, comparativă a potențialului de valorificare a speciilor studiate în funcție de modul de obținere a acestora.

IV ELEMENTE DE ORIGINALITATE

În cercetarea abordată în cadrul acestei teze de doctorat pot fi identificate următoarele elemente de originalitate:

- Determinarea capacității de reacție a speciilor luate în studiu în diferite condiții de cultivare in vitro;
- Identificarea unor variante de cultivare adiționate cu o balanță hormonală adecvată care să determine o capacitate de calusare superioară, acest fapt prezentând un interes deosebit mai ales în cazul unor valorificări prin tehnici de biotehnologii industriale;
- Datorită modului de abordare integrat, în cazul testelor de laboaror care au vizat studierea capacității antioxidante și antimicrobiene a speciilor studiate, s-a putut concludiona eficiența unor moduri diferite de obținere a plantelor, respectiv - in vivo sau in vitro;
- prin studierea proceselor fiziologice care urmăresc acumularea de biomasă în condiții de in vivo și in vitro, studiul poate permite determinarea unor randamente de obținere a compușilor de interes cu aplicabilitate industrială.