

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



Facultatea de Horticultură și Silvicultură

Ing. DUMITRAȘCU (ȚĂRAN) MĂDĂLINA ELENA

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. DUMITRAȘCU (ȚĂRAN) MĂDĂLINA ELENA

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND POTENȚIALUL DE UTILIZARE AL
UNOR SPECII MEDICINALE PRIN TEHNOLOGII MODERNE
DE CULTIVARE**

Conducător Științific

Prof. univ. dr. CAMEN DORIN – DUMITRU

Timișoara

2022

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Titlul teză: Cercetări privind potențialul de utilizare al unor specii medicinale prin tehnologii moderne de cultivare

Structura propriu-zisă a tezei:

Rezumatul (română și egleză)

Introducere

Partea de stadiu actual al cunoașterii:

Partea de cercetări proprii:

Concluzii generale și recomandări

Elemente de originalitate

Părți adiționale:

Lista de abrevieri

Lista lucrărilor publicate ca rezultat al cercetărilor

Bibliografia

Elemente tabelare și grafice

Tabele: 62

Grafice: 86

Surse bibliografice 164

Raport antiplagiat / coeficient de similitudine:

INTRODUCERE

Obiectiv principal evaluarea posibilităților de cultivare "*in vitro*" a speciilor *Salvia Officinalis*, *Echinacea Purpurea* și *Cynara Scolymus*, influența mediului de cultură asupra reacției „*in vitro*” a speciilor de plante medicinale luate în studiu;

Obiective specifice: -studierea influența hormonilor de creștere asupra organogenezei prin culturi de țesut vegetal la speciile *Salvia Officinalis*, *Echinacea Purpurea* și *Cynara S.*

- analiza antimicrobiană a extraselor din frunzele speciilor alese atât în condiții "*in vitro*", cât și "*in vivo*" pe tulpinile de *S.aureus* și *E.coli*;

-compararea conținutului total de polifenoli, flavonoizi, cât și spectrul UV-VIS a speciilor *Salvia Officinalis*, *Echinacea Purpurea* și *Cynara S.* în ceea ce privește cultivarea "*in vitro*" și "*in vivo*";

-analiza principalelor procese și indici fiziologici luați în studiu a speciilor luate în studiu prin determinări privind fotosinteza și conținutul de clorofilă;

Importanța și actualitatea temei

Prin lucrarea de doctorat ne-am dorit astfel, să aducem în atenție un subiect de actualitate, altul decât cele abordate până în prezent, care tratează potențialul de utilizare a speciilor medicinale *E. purpurea*, *S. Officinalis* și *Cynara S.* în condiții de cultură *in vitro* și *in vivo*

Actualitatea temei alese se justifică prin informațiile și datele recente obținute, cu privire la indicii fiziologici, testele de germinare și analizele antimicrobiene asupra speciilor de plante medicinale luate în studiu.

Tematica abordată evidențiază faptul că lucrarea se adresează atât cercetătorilor cât și specialiștilor în industria genetică, farmaceutică alimentară, și în domeniul medicinei.

Motivația alegerii temei

Prezenta temă de doctorat a fost aleasă în concordanță cu cerințele noi în domeniul sănătății și genetică cât și importanța plantelor medicinale. O motivație principală a fost micropropagarea speciilor de *E. Purpurea*, *Salvia Officinalis* și *Cynara Scolymus*, care ocupă un loc predominant în biotehnologii.

Partea I : STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul 1. CERCETĂRI PRIVIND ECOLOGIA ȘI BIOLOGIA SPECIILOR MEDICINALE

În capitolul acesta am prezentat studii și cercetări privind tematica prezentei teze de doctorat, aspecte generale privind originea și răspândirea speciilor medicinale și zonele de cultură din țara noastră. *Cynara s.* se poate cultiva cel mai bine în România, în zona de deal sau de câmpie, în special în sudul sau

sud-vestul țării. Culturile de *S. Officinalis* și *E. Purpurea* sunt culturi cu risc în țara noastră, nespecifice florei, acestea sunt restricționate pe perioada iernii.

CERCETĂRI PRIVIND POTENȚIALUL DE CULTIVARE ȘI VALORIFICARE

Această parte evidențiază caracterele macroscopice ale speciilor, compoziția chimică, tehnologia de cultivare, acțiunea farmacologică și genetica și ameliorarea speciilor medicinale luate în studiu.

Echinacea purpurea are în rădăcini și în părțile aeriene polizaharide, uleiuri eterice, acizi esteri, acid cafeic. Cercetătorii consideră polizaharidele ca fiind principalele fracții răspunzătoare de modularea activității sistemului imunitar.

Frunzele specie *Cynara scolymus* conțin polifenoli, flavonoizi, compuși sterolici, provitamina A, săruri de potasiu și enzime.

Salvia Officinalis are în compoziția frunzelor vitaminele B1 și C, ulei volatile, reprezentat prin tuiol, salven, săruri de potasiu, principii amare, polifenoli și glicozide.

În medicină se cunosc efectele miraculoase ale speciilor studiate. Specia *E. purpurea* este cunoscută pentru beneficiile sale asupra sistemului imunității, ajută împotriva cancerului și tumorilor la creier, se utilizează drept calmant pentru anumite dureri intestinale, de stomac, de cap, amigdalită. Pe de altă parte se cunosc beneficiile asupra tractului gastrointestinal, asupra problemelor pielii, ameliorează problemele de respirație, răceli, tuse, sinuzită, gripă, datorită efectelor imunostimulatoare și anti-inflamatorii.

Salvia Officinalis este recunoscută pentru beneficiile sale asupra afecțiunilor hepatobiliare, circulația sanguină, hipertensiune, depresii psihice, hepatite, balonări abdominale, afecțiuni vasculare, previne infarctul, tulburări ale ciclului menstrual, disfuncțiuni ovariene, diabet zaharat.

Anghinarea este un complex de vitamine, fitonutrienți și minerale, cu efecte benefice asupra organismului. Complexul de flavonoide care se întâlnește în componența acesteia, silimarina, este un cunoscut protector hepatic. Preparatele din *Cynara scolymus* se folosesc datorită efectului spasmolitic și carminativ. Acestea se recomandă în tratamentul afecțiunilor cauzate de secreția biliară redusă.

Partea a II-a : CERCETĂRI PROPRII

Partea de cercetări proprii este structurată pe capitole de caracterizare a cercetărilor, materiale și metode de cercetare și rezultate proprii.

Capitolul 2. Material și metode de cercetare utilizate

În acest capitol sunt detaliate aspecte privind metodologia *in vitro* și *in vivo*, determinările indicilor fiziologici, testele de germinare și analiza antimicrobiană a speciilor.

Cercetările propriu-zise s-au desfășurat pe o perioadă de 3 ani (2018 – 2021) și au fost realizate în cadrul Laboratoarelor de Fiziologie vegetală și Inginerie genetic aparținând Facultății de Horticultură și Silvicultură precum și în cadrul Complexului de Laboratoare de Cercetare “Horia Cernescu” din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului din Timișoara.

Materialul vegetal pentru multiplicarea “*in vitro*” și *in vivo*” a fost reprezentat de semințele următoarelor specii de plante medicinale: *SALVIA OFFICINALIS*, *ECHINACEA PURPUREA* ȘI *CYNARA S.*

În ceea ce privește determinările indicilor fiziologici, am efectuat determinări privind conținutul de clorofilă al speciilor medicinale și rata fotosintetică, atât a speciilor cultivate *in vitro* cât și *in vivo*. *Cantitatea de clorofilă totală (SPAD) din frunze* s-a determinat cu ajutorul clorofilmetrului portabil SPAD-502.

Capacitatea fotosintetică s-a determinat cu aparatul EARS Plant Photosynthesis Meter (PPM) care măsoară utilizarea luminii fotosintetice a plantelor. Măsurarea se bazează pe fluorescența clorofilei, un semnal optic foarte slab emis de plantă, dar care poate fi detectat de aparat.

Germinarea semințelor constituie un ansamblu de modificări biochimice, morfologice și fiziologice care sunt reprezentate de sterilizarea semințelor, inocularea semințelor în mediul de cultură și incubarea, care s-a realizat în camera de creștere, în condiții controlate de temperatură (25°C ziua și 22°C noaptea) și lumină (fotoperioada de 16 ore lumina și 8 ore întuneric).

O altă etapă privind cultivarea „*in vitro*” o constituie regenerarea plantelor. S-a procedat la inocularea de calus pe mediu solid. Variantele experimentale pentru inducerea calusului au fost următoarele: V0- 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA; V1- 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA și V2-3 mg/L BAP + 1 mg/L NAA. S-au efectuat determinări în ceea ce privește rata de multiplicare a materialului biologic vegetal, răspunsul pe care l-au obținut la condițiile de cultură solidă a calusului care provine de la speciile studiate.

În ceea ce privește analiza antimicrobiană a speciilor medicinale luate în studiu, am determinat proprietățile antioxidante ale extractelor prin determinarea conținutului polifenolic (metoda Folin-Ciocalteu), determinarea flavonozilor totali (metoda cu azotit e sodiu), determinarea activității superoxidismutazei (metoda de oxidare a hidroxilamnei) și determinarea capacității antioxidante totale (metoda cu DPPH).

Capitolul. Rezultate și discuții

Rezultate experimentale privind specia *Echinacea Purpurea*

În ceea ce privește indicii fiziologici, cele mai mari valori ale conținutului de clorofilă s-au obținut în modul de cultură *in vitro*, indiferent de gradările perioadei de determinare. Modul de cultură contribuie la realizarea conținutului de clorofilă în proporție de 14.1%, numărul de zile în procent de 81.6%, iar interacțiunea factorilor cu 0.98%.

Rezultatele în ceea ce privește rata fotosintezei, ne indică atât modul de cultură *in vivo* sau *in vitro* cât și perioada de timp reprezentată de numărul de zile la care s-au efectuat determinările au o acțiune foarte semnificativă asupra ratei fotosintezei

Rezultate experimentale privind germinarea speciei Echinacea purpurea. Testarea capacității germinative la specia Echinacea Purpurea in vivo (pe hârtie de filtru) și in vitro pe mediul MS și MS cu adaos de GA3

Analiza procentului de germinare realizat la cele 3 variante evidențiază faptul că, acesta se situează între 39 – 58%. Cel mai mare procent de germinare s-a obținut la varianta pe hârtie de filtru. Cele 3 variante au prezentat următoarele evoluții ale gemenității: la interacțiunea cu factorul experimental timp, la gradările 7, 14, 21 și 28 de zile, varianta pe hârtie de filtru, este net superioară celorlalte variante urmărite în experiență indiferent de gradarea timpului, iar cel mai mic procent de germinare se obține la MS cu GA3.

Testarea capacității germinative la specia Echinacea Purpurea „in vitro”, pe mediul MS, MS cu adaos de GA₃ și „in vivo”, pe hârtie de filtru și amestec pământ cu perlit

Cele 4 variante au prezentat evoluții ale gemenării la interacțiunea cu factorul experimental timp. Varianta pe hârtie de filtru, este net superioară celorlalte variante urmărite în experiență indiferent de gradarea timpului. Cel mai mic procent de gemenare rezultă la variant amestec de pământ și perlit. Timpul la care s-au efectuat determinările contribuie la realizarea gemenării în proporție de 60%, variant experimental luată în studiu cu 34%, iar interacțiunea acestora cu 3 %.

Testarea capacității de callusare la specia Echinacea Purpurea pe mediul de cultură cu concentrații diferite ale hormonilor de creștere

În comparație cu variant martor (MS+1mg/l BAP +1mg/l NAA) s-au obținut sporuri cu semnificație mare. Putem spune că variant martoreste net superioară variantei (MS+ 2mg/l BAP+ 1 mg/l NAA), cu un procent de 7% și este inferioară variantei (MS+ 3mg/l BAP+ 1 mg/l NAA). Comparativ cu celelalte gradări ale factorului timp, pentru perioada de 42 de zile, s-a obținut cel mai mare procent de calusare.

Rezultate experimentale privind analiza antimicrobiană a speciei Echinacea Purpurea

Pe tulpinile E.coli atât pentru activitatea antibacteriană, cât și pentru antibiofilm, a avut o influență mai bună *Echinacea purpurea in vitro*, cu o valoare de 64,65, în comparație cu in vivo -103.42, respectiv 42,52 , iar rezultatele pentru antibiofilm in vivo au fost de -54.27.

Pe tulpina de *S. aureus* pentru activitatea antibacteriană, a avut un impact mai mare planta *in vitro*, cu o valoare de 33.51, în comparație cu -53.55 în vivo, iar pentru activitatea de antibiofilm este reprezentată de E. purpurea in vivo.

Rezultate experimentale privind conținutul total de flavonoizi

Potrivit analizelor de laborator efectuate, se observă faptul că *Echinacea purpurea cultivată in vitro* are un conținut mai ridicat de flavonoizi, o valoare medie de 5.80, în comparație cu planta in vivo, 2.92.

Rezultate experimentale privind conținutul total de polifenoli

În urma analizelor, conținutul total de polifenoli, determinat prin metoda de lucru Folin-Ciocalteu, este mai mare pentru specia *E. purpurea* cultivate *in vitro* față de aceeași specie cultivate in vivo.

Rezultate experimentale privind specia *Salvia Officinalis*

*Rezultate experimentale privind determinarea conținutului de clorofilă „in vivo” și „in vitro” la specia *Salvia Officinalis**

Conform rezultatelor obținute in tabelul 2.29 se poate observa că modul de cultură *in vitro* are o influență semnificativă asupra conținutului de clorofilă la *Salvie* La această specie s-a obținut o cantitate de clorofilă de 25.5 SPAD la plantele cultivate in vivo și 26.9 SPAD la plantele cultivate *in vitro*. Factorul reprezentată de modul in vivo sau *in vitro*, contribuie la realizarea clorofilei în proporție de 1.5%, factorul timp în proporție de 94.8%, iar interacțiunea modului cu timpul cu 0.001% .

*Rezultate experimentale privind rata fotosintezei la specia *Salvia Officinalis**

Indiferent de graduările timpului, cel mai mare procent al ratei fotosintezeis-a inregistrat la modul de cultură in vivo. La 49 de zile, valorile obținute pe cele două moduri de cultură in vivo și *in vitro* sunt asemănătoare, adică fac parte din aceeași clasă de omogenitate. Modul de cultură contribuie la realizarea ratei fotosintezei în proporție de 13.2%, factorul reprezentat de numărul de zile la care au fost efectuate determinările în proporție de 78.1%, iar interacțiunea acestora cu 2.0%

*Rezultate experimentale privind germinarea speciei *Salvia Officinalis*. Testarea capacității germinative la specia *Salvia Officinalis* in vivo (pe hârtie de filtru) și in vitro pe mediul MS și MS cu adaos de GA3*

Din analizele efectuate se deduce ușor superioritatea variantei pe hârtie de filtru, procentul germinării fiind cuprins între 50-90% pentru această variantă, este superior celui obținut la celelalte două

variante. Varianta MS cât și varianta MS+GA3 au procentul de germinare asemănător, indiferent de graduările factorului timp.

Testarea capacității germinative la specia Salvia Officinalis „in vitro,, pe mediul MS, MS cu adaos de GA₃ și „in vivo,, pe hârtie de filtru și amestec pământ cu perlit

În urma analizei celor 4 variante rezultă faptul că varianta hârtie de filtru, este net superioară celorlalte variante urmărite în experiment indiferent de graduarea factorului timp. La 7 zile variantele MS, MS + GA3 și amestec de pământ și perlit au procentul de germinare asemănător , cuprins între 26-29%.

Variantele MS + GA3 și amestec de pământ și perlit au procentul de germinare asemănător indiferent de graduarea factorului timp, având cel mai mic procent de germinare la graduările timpului.

Testarea capacității de callusare la specia Salvia Officinalis pe mediul de cultură cu concentrații diferite ale hormonilor de creștere.

Analiza procentului de callus realizat la cele 3 variante arată că, acesta se situează între 40– 56%. Cel mai mic procent s-a obținut la varianta -MS+ 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA, iar cel mai mare procent la V1-MS+1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA. Timpul contribuie la realizarea callusului în proporție de 87.6%, varianta experimentală cu 7.0%, iar interacțiunea acestora cu 0.34 %.

Rezultate experimentale privind analiza antimicrobiană a speciei Salvia Officinalis

Privind activitatea antibacteriană și activitatea antibiofilmse observă că atât pe tulpinile de *E.coli*, cât și pe tulpinile de *S.aureus* cele mai bune rezultate sunt date de *Salvia Officinalis in vitro*.

Rezultate experimentale privind conținutul total de flavonoizi la specia Salvia Officinalis

În ceea ce privește conținutul de flavonoizi, rezultate mai bune s-au obținut pentru modul de cultură *in vivo la Salvia officinalis*, cu o medie de 32,88775, comparative cu modul de cultură *in vitro* unde media a fost de 26,802.

Rezultate experimentale privind conținutul total de polifenolila specia Salvia Officinalis

Raportat la valoarea dată de polifenoli, *Salvia Officinalis in vitro* a dat cele mai bune rezultate, 94,57734 în comparație cu modul de cultură *in vivo*, 85,75561.

Rezultate experimentale privind specia Cynara scolymus

Rezultate experimentale privind determinarea continutului de clorofilă „in vivo” și „in vitro” la specia Cynara Scolymus

Valorile realizate privind conținutul clorofilei pentru cele două moduri de cultură-*in vivo* și *in vitro*, indiferent de graduarea factorului timp sunt asemănătoare, făcând parte din aceeași clasă de

omogenitate. Conținutul de clorofilă realizat în timp se situează între 19,66 – 35,65 SPAD. Valoarea cea mai mare am obținut-o la 90 zile. Factorul mod ajută la realizarea clorofilei în procent de 0,05%, factorul timp în proporție de 86,6%, iar interacțiunea modului cu timpul cu 2,5% .

Rezultate experimentale privind determinarea ratei fotosintezei la specia Cynara Scolymus

Analiza procentului ratei fotosintezei realizat în timp evidențiază faptul că, acesta se situează între 57,7– 80,2%. La 49 de zile și la 35 de zile a rezultat cel mai mare procent al ratei fotosintezei. Indiferent de graduările factorului timp, procentul ratei fotosintezei obținut atât *in vivo*, cât și *in vitro* este asemănător, 58,3–57%, 68,7–69,7%, respectiv, 79,7–80,7%. Factorul reprezentat de modul *in vivo* sau *in vitro*, contribuie la realizarea ratei fotosintezei în proporție de 0,01%, factorul timp în proporție de 89,04%, iar interacțiunea acestor factori cu 0,32%.

Rezultate experimentale privind germinarea speciei Cynara Scolymus. Testarea capacității germinative la specia Cynara Scolymus in vivo pe hârtie de filtru și in vitro pe mediul MS și MS cu adaos de GA3

Analiza procentului de germinare realizat în timp scoate în evidență faptul că, acesta se situează între 31 – 90%. Pentru 28 de zile, am avut cel mai mare procent de germinare, comparativ cu celelalte graduări ale factorului timp. Analiza procentului de germinare realizat la cele 3 variante evidențiază faptul că, acesta se situează între 51 – 72%. Cel mai mare procent de germinare s-a obținut la varianta pe hârtie de filtru, iar cel mai mic procent de germinare s-a realizat la varianta dată de MS cu GA3 .

Rezultate experimentale privind analiza antimicrobiană a speciei Cynara scolymus

În urma analizei de laborator, pentru tulpinile de *E.coli* și *S. aureus* se observă atât pentru activitatea antibacteriană, cât și pentru activitatea de biofilm un procent foarte mare pentru specia cultivată *in vitro* în comparație cu *in vivo*. Activitatea antibacteriană a avut procente cuprinse între 79,95%-97,04% pentru specia cultivată *in vitro*.

Rezultate experimentale privind conținutul total de flavonoizi la specia Cynara Scolymus

În ceea ce privește conținutul de flavonozizi, din analizele efectuate rezultă faptul că *Cynara Scolymus in vitro* are un conținut ridicat de flavonozizi în comparație cu aceeași specie *in vivo*.

Rezultate experimentale privind conținutul total de polifenoli la Cynara Scolymus

Conținutul de polifenoli determinat a evidențiat o diferență mare între specia *in vitro* și *in vivo*. Se observă faptul că specia cultivată *in vitro* are un conținut mai ridicat decât cea cultivată *in vivo*.

Rezultate experimentale privind I.C. la specia Cynara Scolymus

Din analizele de laborator, cu cele 3 repetiții pentru fiecare, rezultă faptul că media din cele 3 repetiții pentru fiecare, în ceea ce privește I.C. se observă o diferență mare între *in vivo* și *in vitro*. Specia *in vivo* are rezultate mai bune, o medie de 266,1921 UI/ml, în comparație cu 204,870 UI/ml *in vitro*.

PARTEA A-III-A. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

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

Cu privire la studierea influenței hormonilor de creștere asupra culturilor de țesut vegetal: am identificat și am propus variante hormonale cantitative și calitative în scopul observării modului în care explantele utilizate au răspuns în condițiile de cultivare *in vitro*; **cu privire la analiza antimicrobiană a extraselor din frunzele speciilor alese atât în condiții "in vitro", cât și "in vivo " pe tulpinile de S.aureus și E.coli:** prin modelul experimental propus s-a analizat din punct de vedere comparative capacitatea antimicrobiană a celor trei specii studiate în condiții de cultivare diferite, urmărindu-se astfel identificarea unor posibilități de valorificare a acestora prin tehnologia *in vitro*; **cu privire la compararea conținutului total de polifenoli, flavonoizi, cât și spectrul UV-VIS a speciilor *Salvia Officinalis*, *Echinacea Purpurea* și *Cynara S.*:** în acest sens am studiat diferențele existente din punct de vedere cantitativ și calitativ în ceea ce privește propunând o analiză comparativă a materialului vegetal utilizat în cele două sisteme de cultivare; **cu privire la analiza principalelor procese și indici fiziologici luați în studiu:** datorită faptului că cele trei specii luate în studiu prezintă importanță în special datorită conținutului în metaboliți secundari cu utilizare industrială, un capitol important a fost dedicat evaluării unor procese fiziologice implicate în biosinteza substanțelor organice, fiind astfel determinat rata fotosintetică și conținutul de pigmenți clorofilieni.

PARTEA A-IV-A. ELEMENTE DE ORIGINALITATE

În prezenta teză de doctorat se regăses următoarele elemente de originalitate:

- Studierea speciilor medicinale într-un sistem comparativ, *in vivo și in vitro*, prin utilizarea unor tehnici ale biotehnologiilor moderne cu posibilități ulterioare de aplicabilitate industrială;
- Realizarea unei analize asupra modului în care diferitele balanțe hormonale influențează reacția explantelor în cultura *in vitro* precum și evaluarea potențialului de calusare, cunoscut fiind faptul că în condiții de aplicabilitate industrială prin utilizarea bioreactorului, calusul reprezintă principala materie primă utilizată;
- Prin studiile care au vizat capacitatea antimicrobiană și conținutul în polifenoli și flavonoide se aduc elemente noi în ceea ce privește potențialul ulterior de valorificare, cu eficiență ridicată a celor trei specii studiate;

- Prin studiile fiziologice s-au determinat procese și indici fiziologici, astfel au fost obținute rezultate importante despre intensitatea principalelor procese și indici fiziologici (rata fotosintetică și conținutul de clorofilă), pe baza acestora putându-se stabili ulterior o corelație din punct de vedere al potențialului bioproductiv și alegerea celor mai bune și eficiente sisteme de cultivare.