

REZUMAT

al tezei de doctorat

“Contribuții la crearea unor linii de armurariu (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) prin folosirea unor agenți mutageni”

Importanța cercetării acestei specii, derivă din calitățile fitoterapeutice a principiilor active prezente în achenele de armurariu (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.), cunoscute sub denumirea de silimarină, evidențiate prin numeroase studii medicale și farmaceutice, ceea ce face din armurariu una dintre cele mai importante specii de plante medicinale. Răspândirea ariei de cultură și obținerea unor forme biologice noi constituie o necesitate deoarece pe piața internă sunt foarte căutate preparatele farmaceutice cu efect hepatoprotector care au la bază silimarina extrasă din semințele acestei plante.

Pentru elaborarea lucrării și pentru interpretarea rezultatelor obținute s-a consultat bibliografia referitoare la problematica abordată, apelându-se la utimele noutăți în domeniu.

Lucrarea este prezentată pe 240 pagini, având atașată o bibliografie ce cuprinde un număr de 224 titluri. Teza propriu-zisă este structurată în 9 capitole plus concluzii și recomandări, cuprinde 54 de tabele și 84 figuri, iar la sfârșit are atașat un număr de 10 anexe și 2 planșe.

Lucrarea are două părți distincte, prima parte este o sinteză a datelor bibliografice cu privire la tema tezei de doctorat, a cercetărilor efectuate la specia *Silybum marianum*, la cadrul natural, condițiile climatice din anii de experimentare, materialul și metodele de cercetare. Această parte cuprinde 69 de pagini. În cea de a doua parte sunt prezentate rezultatele cercetărilor proprii, cu privire la tema de cercetare, această parte are, 48 de tabele, 10 anexe și 79 de figuri și fotografii.

Capitolul I cuprinde informații cu privire la importanța plantelor medicinale, pe plan mondial și pe plan național, tradiții privind utilizarea plantelor medicinale pe teritoriul României, potențialul terapeutic al plantelor medicinale.

Capitolul II se referă la sistematica speciei luată în studiu, originea, răspândirea, importanța și întrebuințarea armurariului.

În capitolul III se face o prezentare a unor aspecte privind morfologia, biologia și tehnologia de cultivare a plantei cu referire la modul de recoltare și momentul optim de recoltare având în vedere maturarea eșalonată.

La întocmirea acestui capitol s-au sintetizat rezultatele cercetărilor efectuate în România, dar și pe plan mondial, cu privire la unele aspecte privind biologia speciei, a verigilor tehnologice dar și a unor indici de calitate a achenelor, pentru a fi păstrate o perioadă îndelungată fără a afecta conținutul

în principii active, precum și cercetări de dată foarte recentă cu privire la beneficiile medicinale ale preparatelor din această plantă.

În capitolul IV sunt sintetizate datele referitoare la stadiul actual al cercetărilor privind conținutul în principii active la planta *Silybum marianum* și implicațiile lor terapeutice, cu referire la substanțele bioactive prezente în fructele plantei, apartenența chimică a principiilor active, modul de acțiune a silimarinei în rolul său de protejare și regenerare a celulei hepatice. În acest capitol sunt prezentate studiile efectuate atât în România cât și în lume în vederea ameliorării armurariului.

În capitolul V sunt prezentate scopul, obiectivele, materialul și metodele de cercetare. Obiectivele cercetărilor cuprind: inducerea variabilității folosind agenți mutageni chimici în cadrul populației locale De Prahova, studiul efectului substanțelor chimice mutagene asupra caracterelor morfologice și fiziologice, selecția și reținerea elitelor valoroase din generația M₂, selecția și reținerea liniilor valoroase din generația M₃, analiza și caracterizarea liniilor M₃ reținute în câmpul de selecție, privind unele caractere morfologice, fiziologice și analize biochimice, stabilirea unor corelații între unele caractere ale liniilor M₃ promovate în câmpul de control. Scopul final al cercetărilor fiind obținerea prin selecție a unor linii noi de armurariu.

Sămânța folosită în experiențe aparținând populației locale De Prahova, provine de Stațiunea de Cercetare și Dezvoltare în Agricultură din Secuieni și a fost supusă, înainte de a fi semănată, timp de 6, 12 și 24 de ore, acțiunii a trei agenți mutageni chimici în trei concentrații diferite: colchicina (0,10%; 0,15%; 0,20%); esterul metilic al acidului metansulfonic (0,0125%; 0,025%; 0,05%); hidroxilamina (0,005%; 0,01%; 0,1%).

Lotul experimental a fost așezat după metoda blocurilor randomizate în trei repetiții alături de martorul netratat.

În generațiile M₁ și M₂, s-au făcut observații privind influența agenților mutageni chimici asupra următoarelor caractere: *caractere morfologice*: gradul de răsărire; gradul de supraviețuire a plantelor în câmp după 30 de zile de la răsărire; înălțimea plantelor; gradul de ramificare a plantelor; numărul de capitule pe plantă; numărul de achene pe capitul; greutatea achenelor pe plantă; *caractere fiziologice*: durata perioadei de vegetație; durata perioadei de înflorire; rezistența la scuturare; rezistența la boli și dăunători. Observațiile și măsurătorile biometrice s-au efectuat la plantele aflate în diverse fenofaze iar la maturitatea deplină, s-au prelevat probele de achene pentru analiza biochimică a acestora. Semnificațiile diferențelor dintre variantele tratate și martor au fost determinate prin metoda diferențelor limită (DL 5%, 1% și 0,1%). Rezultatele observațiilor s-au interpretat statistic cu ajutorul analizei varianței și al coeficientului de variabilitate. În generația M₃ s-au determinat valorile medii ale caracterelor cantitative ($\bar{x}$) și coeficienții de variabilitate ($s\%$), iar

semnificațiile diferențelor dintre variantele tratate și martor au fost determinate prin metoda diferențelor limită (DL).

În laborator s-a studiat efectul agenților mutageni privind: capacitatea germinativă a semințelor; lungimea rădăcinilor; ritmul de creștere a tulpinilor; indicele mitotic; frecvența aberațiilor cromozomice în mitoză.

Analizele biochimice s-au realizat pentru determinarea conținutului de: lipide brute; proteină brută; silimarină; calciu; fosfor; magneziu în laboratoare de specialitate.

Capitolul VI cuprinde caracterizarea cadrului natural și condițiile ecologice de experimentare, în raport cu cerințele plantelor medicinale și în special *Silybum marianum* (L.) Gaertn., condițiile climatice din anii de experimentare au fost prielnice creșterii și dezvoltării speciei

Experiențele s-au efectuat pe un teren situat în apropierea orașului Bacău, pe terasa I a râului Siret, pe un sol cernoziom cambic tipic, levigat moderat, lutos mediu. Acest tip de sol este evoluat normal, ușor acid, mediu aprovizionat cu principalele elemente nutritive: azot, fosfor și potasiu, având o bună solubilitate hidrică. Media temperaturilor în lunile martie - septembrie în intervalul desfășurării cercetărilor, 2004 – 2008, a fost de 18,18 grade C, ceea ce înseamnă favorabilitate bună pentru creșterea și dezvoltarea armurariului. Căldura este corelată pozitiv cu desfășurarea în condiții bune a înfloririi, fructificării și maturării semințelor.

În intervalul desfășurării cercetărilor, cel mai ploios an a fost anul 2005 când s-a înregistrat o sumă a precipitațiilor de 840,9 mm (cu max. 24 h de 86,4 mm în iulie).

Capitolul VII cuprinde rezultatele cercetărilor privind crearea unor linii de armurariu, *Silybum marianum* (L.) Gaertn. prin folosirea unor agenți mutageni chimici.

În prima etapă a cercetărilor s-a efectuat o evaluare a materialului biologic inițial, populația locală, De Prahova, privind unele caractere și corelațiile între aceste caractere. În urma evaluării s-a constatat că populația ce se găsește în prezent în cultură prezintă slabă rezistență la scuturare, iar capacitatea de producție este sub potențialul speciei. Obținerea unor linii noi și practicarea unor tehnologii adecvate ar putea duce la realizarea unor producții stabile și calitativ superioare.

Pentru a testa rezistența formelor biologice luate în studiu și, pentru a provoca o variabilitate cât mai mare în cadrul acestora, semințele au fost tratate cu trei substanțe chimice mutagene, fiecare substanță având câte trei doze diferite și trei timpi de acțiune asupra semințelor: 6, 12, 24 de ore. Agenții mutageni folosiți au sporit frecvența restructurărilor cromozomice, și au determinat diminuarea valorilor caracterelor morfologice analizate.

În cercetările noastre ne-am propus selecția și evidențierea celor mai bune linii mutante, din punct de vedere cantitativ și calitativ.

S-au studiat modificările rezultate în urma tratamentelor cu substanțele chimice cu efect mutagen asupra următoarelor caractere: capacitatea germinativă a semințelor, lungimea rădăcinilor, ritmul de creștere a tulpinilor, indicele mitotic. Valorile acestor caractere au fost diminuate de acțiunea substanțelor chimice utilizate, diminuarea fiind mai accentuată odată cu creșterea concentrației și a timpului de expunere. Frecvența aberațiilor cromozomice în mitoză a înregistrat o creștere. S-au identificat și fotografiat aberații cromozomice în metafază, anafază, telofază. În generațiile M_1 și M_2 s-au studiat efectele substanțelor chimice mutagene asupra unor caractere morfologice (gradul de răsărire a plantelor, gradul de supraviețuire a plantelor în câmp, variabilitatea înălțimii plantelor, variabilitatea gradului de ramificare a plantelor, variabilitatea numărului de achene în capitul, variabilitatea greutateii achenelor pe plantă), asupra unor caractere fiziologice (durata perioadei de vegetație, durata perioadei de înflorire, rezistența la scuturare, rezistența la boli și dăunători). S-a urmărit selecția acelor indivizi care manifestă superioritate față de martor pentru caracterele urmărite. Datele obținute în urma observațiilor și determinărilor efectuate au fost prelucrate statistic conform modelelor, menționate în literatura de specialitate.

În urma selecției, în M_2 au fost reținute un număr de 103 elite, procentul cel mai mare de elite s-a obținut în urma tratamentelor cu hidroxilamină, de 2,31%, față de procentul total de elite reținute de 5,89%.

Capitolul VIII cuprinde caracterizarea morfologică, fiziologică, și a unor însușiri calitative a descendențelor M_3 . În această generație, au fost studiate 81 de linii rezultate în urma tratamentelor cu cele trei substanțe chimice la care s-a verificat stabilitatea caracterelor urmărite, variabilitatea acestora, pentru a identifica și reține liniile M_3 valoroase. Pentru aceasta s-a urmărit variabilitatea caracterelor morfologice: înălțimea plantelor, numărul total de ramificații pe plantă, numărul de achene pe capitul și pe plantă, greutatea achenelor; variabilitatea caracterelor fiziologice: durata perioadei de vegetație, durata înfloritului, rezistența la scuturare, rezistența la boli și dăunători, și variabilitatea unor însușiri calitative: conținutul în silimarină, conținutul în silibină, conținutul în grăsimi. S-au efectuat măsurători biometrice și analize biochimice pentru indivizii fiecărei variante de lucru, au fost analizate valorile coeficientului de variabilitate (s%) comparativ cu martorul netratat pentru toate caracterele luate în studiu. Din cele 81 linii M_3 analizate, numai 9 linii au cumulat valori inferioare ale coeficienților de variabilitate față de martorul netratat, manifestându-se astfel ca stabile în ceea ce privește micromutațiile utile induse de tratamentul cu agenți chimici mutageni.

Aceste linii sunt: P-c-3-9.3-07 și P-c-3-5.2-07, rezultate în urma tratamentelor cu substanța colchicină; P-h-2-1.6-07, P-h-2-1.9-07, P-h-3-5.6-07 și P-h-3-8.7-07, reținute în urma tratamentelor

cu hidroxilamină și trei linii în urma tratamentelor cu esterul metilic al acidului metansulfonic (EMAM): P-e-2-7.4-07, P-e-3-9.5-07, P-e-3-6.2-07.

Investigațiile morfologice, fiziologice, biochimice realizate în experimentele noastre ne-au ajutat în selecția celor mai bune linii în vederea obținerii unui soi nou.

Rezultatele obținute susțin ideea că utilizarea substanțelor chimice în doze scăzute, și pentru un timp de expunere de 8 ore sau 12 ore, urmată de o selecție riguroasă în generațiile mutante, poate constitui o metodă eficientă de obținere a unor genotipuri noi, superioare matorului netratat.

Din analiza rezultatelor obținute în urma cercetărilor, în intervalul 2004-2008, care au avut ca scop principal crearea de genotipuri valoroase prin mutageneza indusă, s-a constatat că aplicarea diferitelor doze, ale substanțelor mutagene utilizate, au determinat manifestarea fenotipică a unor modificări importante a caracterelor studiate la plantele de *Silybum marianum* L.Gaertn., populația locală De Prahova, și a confirmat pentru cele 9 linii reținute, o reală superioritate față de matorul netratat, exprimată prin diferențe distinct semnificative sau foarte semnificative.

Capitolul IX are ca scop să releve corelațiile între unele caractere morfologice și calitative la descendențele generației M_3 rezultate în urma tratamentelor cu cele trei substanțe chimice menționate, și corelațiile între 78 perechi de caractere la liniile M_3 promovate în câmpul de control. Scopul efectuării acestor calcule a fost reliefaarea efectelor substanțelor mutagene asupra conținutului de silimarină și a principalelor elemente minerale ce se găsesc în achene și pentru a evidenția legăturile existente între caracterele morfologice și calitative, ceea ce ne va ajuta în orientarea procesului de selecție a formelor utile conform obiectivelor propuse.

Urmare a tratamentelor aplicate la sămânță, plantele de armurariu aparținând liniilor promovate în câmpul de control, au înregistrat la caracterele analizate valori ale coeficienților de corelație modificate de doza și timpul de aplicarea a substanței mutagene.

Așadar, rezultatele obținute ne îndreptățesc să afirmăm că la această specie tratamentul cu substanțe chimice mutagene este o metodă eficace de sporire a variabilității genetice, de obținere a unor noi forme biologice.

Pe baza rezultatelor obținute în perioada de experimentare, în ultima parte a lucrării sunt prezentate o serie de concluzii generale și propuneri pentru extinderea ariei de cultură a speciei *Silybum marianum* (L.) Gaertn., continuarea cercetărilor și asupra altor compuși biochimici prezenți în achene dar și în materialul vegetal al plantei.