
REZUMAT

Cunoașterea profundă a plantelor medicinale, inclusiv a gălbenelelor, lărgirea sferei lor de folosire a luat o amploare destul de mare, îndeosebi în a doua jumătate a secolului trecut, de cultivarea lor fiind interesați tot mai mulți, datorită calităților terapeutice excepționale pe care le posedă și care au la bază complexul de substanțe biologic active.

Pentru prima dată specia *Calendula officinalis* L. este introdusă în ierarhia taxonomică de Carl Linné în lucrarea sa „*Species Plantarum*” publicată în anul 1753 (Brânzilă, 2005).

În momentul de față *Calendula officinalis* L. se află printre primele zece, dintre cele mai cultivate plante medicinale în Europa (Hoppe, 1997).

Proprietățile terapeutice deosebite ale gălbenelelor sunt determinate de complexul de substanțe biologic active, pe care le conține materia primă: carotenoide (provitamina A), sterine, triterpenoizi, flavonoizi, glicozizi flavonici, ulei volatil, cumarine, substanțe minerale și amare, gumirezine, mucilagii, vitamina C, esterii colesterolici, substanțe proteice (Britton, 1996). În țările în care se cultivă această specie, se urmărește obținerea prin lucrările de ameliorare a unor forme cu antodii mari, involte, de culoare portocalie (Crăciun, 1977).

Teza de doctorat cu titlul „**Cercetări privind efectul unor agenți mutageni asupra caracterelor morfo-fiziologice și biochimice la specia *Calendula officinalis* L.**” este extinsă pe 255 de pagini și este formată, în conformitate cu prevederile legale actuale, din două părți principale și cuprinde 8 capitole, la care se adaugă introducerea, rezumatul, bibliografia, tabele, figuri și grafice.

Prima parte reprezintă o sinteză a datelor bibliografice cu privire la tema tezei de doctorat, la cadrul natural, condițiile climatice din anii de experimentare, materialul și metodele de cercetare, iar cea de a doua parte prezintă rezultatele cercetărilor proprii, cu privire la subiectul tezei de doctorat.

În urma documentării, am constatat că literatura de specialitate străină este destul de bogată în ceea ce privește cercetările privind sistematica, tehnologia de cultivare și compoziția chimică a acestei plante.

În România, cercetările referitoare la ameliorarea speciei *Calendula officinalis* L. sunt însă modeste.

Experiențele desfășurate între anii 2005-2008, în condiții de câmp, la ferma Ezăreni a Stațiunii Didactice Iași, și în laborator, au avut ca principal scop obținerea unor linii îmbunătățite, la specia *Calendula officinalis* L., în ceea ce privește producția de inflorescențe, bogată în principii active, importante pentru industria farmaceutică

Acest lucru a implicat evaluarea particularităților genetice, biochimice și morfo-fiziologice ale diferitelor linii experimentale de *Calendula officinalis* L., în lipsa și prezența tratamentelor cu substanțe chimice mutagene.

Pe parcursul anilor 2005-2008, s-au efectuat cercetări și observații care au urmărit:

- creșterea variabilității speciei *Calendula officinalis* L. prin inducerea unor mutații cu ajutorul substanțelor chimice;
- comportarea unor mutante în vederea identificării de forme biologice valoroase, în ceea ce privește productivitatea și conținutul ridicat în principii active;
- determinarea fazelor de creștere și dezvoltare a plantelor în condițiile pedo-climatice din zona Moldovei.
- evaluarea efectului indus de substanțele chimice, asupra particularităților morfo-fiziologice și biochimice la speciei *Calendula officinalis* L.

În calitate de material biologic pentru cercetări au fost folosite semințe de *Calendula officinalis* L. soiul *Petrana*, creat în cadrul Universității de Științe Agricole și de Medicină Veterinară București, în anul 1990.

Substanțele utilizate în cercetările noastre au avut concentrații diferite și anume: 0,01%; 0,02%; 0,03% și respectiv 0,04%.

O parte din tratamente au fost aplicate la semințe, cu timp de acțiune de 3 și respectiv 6 ore, înainte ca acestea să fie semănate în câmp, iar o parte din tratamente au fost făcute în câmp după ce plantele provenite din semințe netratate, au ajuns în stadiul de vegetație, de 4-6 frunzulițe.

Chimiosensibilitatea s-a studiat în laborator, prin efectuarea câtorva teste referitoare la capacitatea de germinare a semințelor.

Investigațiile citogenetice au fost realizate pe meristeme radiculare obținute prin germinarea semințelor, iar preparatele microscopice au fost obținute prin metoda elaborată de Feulgen în anul 1924 (Țirdea, 2003).

Cu ajutorul metodelor citogenetice, pe parcursul experimentelor, am determinat frecvența și spectrul aberațiilor în ana-telofaza mitozei și am evidențiat intensitatea diviziunii celulare sub acțiunea substanțelor mutagene prin calcularea indicelui mitotic.

Studiul chimic calitativ și cantitativ al inflorescențelor, s-a realizat pe extracte metanolice și diclormetanice, prin cromatografie în strat subțire și HPLC, la cele 9 linii reținute în urma selecției în generația M_2 și M_3 în cadrul INCDSB/CCB „Stejarul” Piatra-Neamț.

Studiul chimic calitativ a apelat la cromatografia pe strat subțire pentru trei grupe de principii active importante din punct de vedere farmacologic:

- flavonoide
- acizi fenolici
- compuși triterpenici

Determinarea procesului de biosinteză a glucidelor din frunze a urmărit evidențierea capacității de adaptare la mediu și diferențele evidențiate între variantele de tratament în urma acțiunii substanțelor chimice mutagene.

Determinarea glucidelor din frunze, s-a făcut prin metoda Bertrand combinată cu metoda Borel, în cadrul laboratorului de biochimie al Facultății de Biologie aparținând Universității „Al. I. Cuza Iași”.

Determinarea conținutului de pigmenți în perioada de vegetație s-a făcut prin metoda spectrofotometrică în Laboratorul de cercetări oenologice al USAMV Iași.

În cazul cercetărilor enzimactice, determinarea activității catalazei în frunze și flori s-a realizat prin metoda gazometrică cu ajutorul unui dispozitiv îmbunătățit (modificat) în laboratorul de Fiziologie vegetală al USAMV Iași.

Analizele biochimice și citogenetice, au constituit un criteriu de selecție a celor mai bune linii care să poată fi propuse ulterior spre omologare și recomandare în producție.

Datele obținute în urma observațiilor și determinărilor efectuate au fost prelucrate statistic conform modelelor consacrate, menționate în literatura de specialitate.

În generațiile M_1 , sensibilitatea la agenții mutageni a speciei *Calendula officinalis* L. s-a determinat în trei repetiții, prin calcularea procentuală a energiei germinative, a ritmului de creștere a rădăcinițelor și tulpinițelor și calcularea coeficientului de corelație dintre intensitatea procesului de formare a bobocilor florali și concentrația substanțelor, respectiv a frecvenței și spectrul mutațiilor în mitoză.

Semnificațiile diferențelor dintre variantele tratate și martor au fost determinate prin metoda diferențelor limită (DL 5%, 1% și 0,1%). Caracterele cantitative s-au interpretat statistic cu ajutorul analizei varianței și al coeficientului de variabilitate.

Pentru interpretarea datelor experimentale privind efectul agenților mutageni asupra caracterelor morfo-fiziologice și biochimice din punct de vedere statistic s-au folosit funcțiile standard de statistică ale componentei Microsoft Excel a grupului de programe Microsoft Office 10 pentru sistemul de operare Windows XP, calculându-se coeficientul de corelație.

Realizarea selecției în câmpul experimental s-a efectuat după metoda jumătății de sămânță (Munteanu, 2000), tipică pentru plantele alogame așa cum este și *Calendula officinalis* L.

Pentru determinarea acțiunii mutagenilor chimici asupra plantelor de *Calendula officinalis* L., s-au folosit câteva teste recomandate de literatura de specialitate. Astfel, s-au determinat modificările rezultate ca urmare a tratamentelor cu substanțe chimice, asupra unor parametrii biometrici și anume: numărul de inflorescențe pe plantă, numărul de boboci pe plantă, numărul de frunze pe plantă, greutatea frunzelor pe plantă, numărul florilor spre fructificare, numărul florilor fructificate, numărul de ramificații pe plantă, greutate tulpină și ramificații.

S-a stabilit existența unei legături între concentrațiile substanțelor chimice folosite pentru tratament și capacitatea acestora de a stimula procesul de formare a inflorescențelor acest lucru având, bineînțeles, influență asupra producției.

Pentru anii experimentali 2007 și 2008 măsurătorile biometrice au fost făcute numai pentru formele reținute în urma selecției plantelor considerate a fi mutante. Selecția a fost făcută după criterii morfologice, biochimice, fiziologice și citogenetice, fiind astfel reținute formele care au întrunit caracteristici superioare față de martorul netratat.

Din cauza numărului deosebit de mare de linii rezultate în urma tratamentelor începând cu generația M₂, au fost reținute 9 linii, considerate valoroase pentru caracterele cantitative în ceea ce privește producția de inflorescențe de la fiecare variantă de tratament efectuat atât la nivel de semințe cât și pe vârful vegetativ de creștere.

Elementele de biometrie analizate au prezentat variabilitate sub influența tratamentelor aplicate față de martorul netratat cu diferențe mici nesemnificative din punct de vedere statistic.

Valorile catalazei la tratamentele efectuate pe vârful vegetativ toate variantele au o activitate crescută comparativ cu activitatea catalazei în cazul tratamentelor aplicate la nivel de semințe cu timp de acțiune 3 ore și 6 ore.

În ceea ce privește *efectul indus de tratamentul cu substanțe chimice asupra conținutului în glucide din frunze* la specia *Calendula officinalis* L. La toate concentrațiile celor trei substanțe folosite în experiență, **cantitatea de diglucide** înregistrează cele mai mari valori în cazul tratamentelor aplicate la nivel de semințe cu timp de acțiune 6 ore.

Timpul de acțiune și creșterea concentrației substanțelor contribuie la diminuarea procesului de acumulare a **poliglucidelor solubile** în cazul acidului 2,4 D și a bromurii de etidium.

Cantități apreciabile de **poliglucide insolubile** s-au înregistrat în cazul tratamentelor efectuate la nivel de semințe cu timp de acțiune 6 ore, urmate de cele aplicate pe vârful vegetativ și apoi de tratamentele efectuate la nivel de semințe cu timp de acțiune 3 ore.

Colchicina a influențat favorabil **fotosinteza** iar concentrațiile aplicate au avut un rol stimulator asupra procesului fotosintetic.

În cazul bromuri de etidium, (tratament efectuat pe vârful vegetativ de creștere) se constată o inversare a valorilor înregistrate în cazul tratamentelor cu colchicină manifestată printr-un conținut mai redus de pigmenți foliari, în special fotosintetici în toate fazele de vegetație.

La experiențele efectuate cu 2,4 D, se constată că în ambele benzi de absorbție în cazul tratamentelor efectuate pe vârful vegetativ de creștere, valorile absorbantei scad pe măsura creșterii concentrației substanței. Aceasta comportare poate fi considerată, ca o reacție de compensare în activitatea metabolică biochimică și fiziologică, care să asigure o fotosinteză optimă.

Concentrația clorofilelor este corelată negativ cu cea substanțelor în toate fazele de vegetație în care au fost făcute determinările. Acest lucru sugerează că la concentrații mici ale substanței efectele toxice sunt mai puțin specifice, în timp ce la concentrații mari depind de aceasta.

Valorile de producție înregistrate, în cazul celor 36 de linii, obținute la finele anului 2006, în urma tratamentelor cu substanțe chimice, au constituit încă un criteriu de selecție, pentru anii 2007 și 2008 a celor mai productive variante.

Pentru anul 2008, în cazul acidului 2.4 D, diferențele de producție au fost pozitive la varianta de tratament efectuat pe vârful vegetativ de creștere și negative la variatele de tratament aplicate la semințe timp de 3 ore și respectiv 6 ore față de varianta martor.

Analiza conținutului în polifenoli a materialului vegetal (inflorescențe), pentru anii 2007 și 2008, a evidențiat prezența principiilor active (acizi polifenolici și flavonoide), în conformitate cu etaloanele utilizate. Analiza cumulată a acizilor fenolici a evidențiat faptul că s-au înregistrat valori scăzute ale acestui parametru comparativ cu martorul netratat doar în cazul tratamentului cu colchicină 3 ore.

Media celor doi ani a pus în evidență în cazul tratamentelor cu colchicină 6 ore, acumularea celei mai mari cantități de flavone (117,31 mg/100 g material vegetal uscat).

Colchicina a stimulat sinteza acizilor fenolici la tratamentele aplicate pe vârful vegetativ de creștere precum și în cazul tratamentelor de 6 ore.

Bromura de etidium a stimulat acumularea în inflorescențe a acestor substanțe la tratamentele de 3 ore, după care s-a putut observa o diminuare a procesului de biosinteză pe măsură ce timpul de acțiune al substanței a fost crescut (6 ore).

In concluzie condițiile climatice ale zonei Iași satisfac deplin cerințele gălbenelelor față de căldură și se poate afirma că din acest punct de vedere specia își poate desfășura integral ciclul de vegetație, iar tratamentele aplicate nu au influențat fazele de vegetație, ele realizându-se la toate variantele în același timp.
