PLANTELE MEDICINALE DIN FLORA SPONTANĂ A REPUBLICII MOLDOVA ASPECTE MODERNE DE CERCETARE

Duca M.[1], Port A.[1], Muller-Uri FR.[3], Levițchi A.[1], Budeanu O.[1], Mârza M.[2], Munteanu V.[1], Țapu L.[1]

[1]*Universitatea Academiei de Ştiinţe a Moldovei, Chişinău*
[2]*Universitatea de Stat din Moldova, Chişinău*
[3]*Friederich-Alexander-Universitat Erlangen-Nurenberg*

Abstract. Medical plants represent an important resource of vegetal drugs and biological active compounds. Nowadays, it is recommended to integrate application of traditional medicine with modern one, especially regarding scientific research and assessment of natural drugs. Usage of local plants in medicine is a prospective and economically important direction. Flora of Republic of Moldova includes a vast diversity of species with opportunity to be applied in treatment of cardiovascular diseases, infections, oncology etc. But, for their exploitation it is necessary to apply modern technologies of research, which generates new knowledge for rational breeding of medical plants, extraction of pharmacologic substances and drug production. Articles present a synthesis of information on medicinal plants found in Moldova, biological aspects of their care. It evaluated the potential number of species and the posibility to store them in a database. One of the prospects for recovery of plant genetic fund may be provided by genotyping of medicinal plants by molecular biology techniques and bioinformatics analysis.

Diversitatea vegetală a Republicii Moldova este condiționată de poziția geografică, caracteristici topografice şi climă [17]. Conform celor mai recente surse, pe teritoriul țării se întîlnesc în jur de 200 specii de plante medicinale. Majoritatea cercetărilor în domeniu se bazează preponderent pe descrierea sistematică [9], ecologică [6], răspîndirea geografică [11], utilizarea în medicina tradițională [15] etc.

În Atlasul Plantelor medicinale [12] sunt descrise proprietățile farmacologice a 101 specii de plante întâlnite pe teritoriul Republicii Moldova, iar în monografia Plante medicinale - 153 specii de plante medicinale din flora indigenă spontană şi cea de cultură, a căror acțiune terapeutică a fost verificată şi confirmată ştiințific [15].

Investigațiile efectuate recent de oficiul local al Convenției cu privire la diversitatea biologică au pus în evidență posibilitatea valorificării a cca 150 specii de plante aromatice şi 200 specii de plante medicinale din flora spontană [16].

Numărul plantelor medicinale este în descreştere, datorită capacității reduse de înmulțire sau colectării necontrolate a acestora înainte de a atinge maturitatea deplină pentru a-şi încheia ciclul de viață. Mai mult ca atît, agricultura şi intensiva recoltare nerațională a condus la diminuarea numerică a speciilor, astfel încît unele plante medicinale sînt pe cale de dispariție, fiind declarate monumente ale naturii [4, 19]. Preparatele fitoterapeutice, mai puțin costisitoare şi fără efecte secundare asupra organismului sînt solicitate din ce în ce mai mult.

Reieşind din cele menţionate, considerăm că utilizarea eficientă a speciilor de plante medicinale în biotehnologiile moderne solicită studii ample referitor la polimorfismul genetic şi biochimic, ceea ce ar permite obţinerea direcţionată a compuşilor valoroşi pentru sistemele vii, descrierea efectelor farmacologice şi altor proprietăţi şi în rezultat, obţinerea substanţelor cu efect curativ şi a preparatelor medicamentoase.

Scopul lucrării constă în punerea în evidenţă a rezultatelor de ultimă oră, privind:

- genotiparea genofondului cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară (**A**),
- analiză bioinformaţională (**B**),
- catalogarea în baza de date a însuşirilor acestor plante şi a potenţialului curativ pentru valorificarea optimală a resurselor naturale de plante medicinale (**C**).

MATERIAL ŞI METODE

102 specii de plante medicinale din flora indigenă spontană şi cea de cultură au fost analizate bioinformatic prin intermediul a 34 baze de date internaţionale, utilizând portalul NCBI [20] (tab.1). Parametrii de investigare au inclus: taxonomia plantelor, numărul de referinţe bibliografice, numărul de secvenţe nucleotidice identificate, numărul de secvenţe aminoacidice cunoscute, aspecte de expresie a genelor de interes, proiecte genomice implicate în studiul acestor plante, metaboliţi secundari şi compuşi biochimici din componenţa acestor plante, valorificaţi în farmaceutică etc.

Tabelul 1

Bazele de date analizate

	Baze de date	Numărul de accesări
1.	**PubMed**: biomedical literature citations and abstracts	32707
2.	**PubMed Central:** free, full text journal articles	13443
3.	**Site Search:** NCBI web and FTP sites	214
4.	**Books:** online books	2572
5.	**Nucleotide:** Core subset of nucleotide sequence records	3343211
6.	**EST:** Expressed Sequence Tag records	2408094
7.	**GSS:** Genome Survey Sequence records	2098666
8.	**Protein:** sequence database	102368
9.	**Genome:** whole genome sequences	93
10.	**Genome:** whole genome sequences	194
11.	**Taxonomy:** organisms in GenBank	93
12.	**SNP:** single nucleotide polymorphism	0
13.	**Gene:** gene-centered information	21427
14.	**SRA:** Short Read Archive	5

15.	**BioSystems:** Pathways and systems of interacting molecules	2
16.	**HomoloGene:** eukaryotic homology groups	76
17.	**Probe:** sequence-specific reagents	24912
18.	**Genome Project:** genome project information	19
19.	**dbGaP:** genotype and phenotype	14
20.	**UniGene:** gene-oriented clusters of transcript sequences	98040
21.	**CDD:** conserved protein domain database	12
22.	**3D Domains:** domains from Entrez Structure	955
23.	**UniSTS:** markers and mapping data	7647
24.	**PopSet:** population study data sets	1498
25.	**GEO Profiles:** expression and molecular abundance profiles	32448
26.	**GEO DataSets:** experimental sets of GEO data	252
27.	**PubChem BioAssay:** bioactivity screens of chemical substances	368
28.	**PubChem Compound:** unique small molecule chemical structures	955
29.	**PubChem Substance:** deposited chemical substance records	382
30.	**Protein Clusters:** a collection of related protein sequences	245
31.	**Peptidome:** MS/MS proteomic experiments	0
32.	**Journals:** detailed information about the journals indexed in PubMed and other Entrez databases	39
33.	**NLM Catalog:** catalog of books, journals, and audiovisuals in the NLM collection	626
34.	**MeSH:** detailed information about NLM's controlled vocabulary	385

REZULTATE ŞI DISCUŢII

A. Informaţia genetică este realizată în ontogeneză prin interdependenţa a trei genomuri: nuclear organizat în cromozomi, cloroplastic şi mitocondrial. Conţinutul de ADN nuclear (valoarea - C) variază în funcţie de specie (de exemplu la *Osteorococcus tauri* este doar de 10 Mbp [5], iar la *Fritillaria assyriaca* – 124852 Mbp [3]). La angiosperme, genomul cloroplastic poate avea valori de 120 şi 220 kb [8], iar cel mitocondrial - de la 200 kb la *Brassica* pînă la 2,5 Mb la *Citrullus lanatus* şi este mai mare faţă de genomul mitocondrial la animale (de aproximativ 15 – 18 kb [10]).

Autentificarea plantelor medicinale, se efectuează în contextul aspectului filogenetic şi a barcodajului plantelor [13, 14] printr-un şir de tehnici moleculare în baza a două principii generale:

1. Identificarea secvenţei nucleotidice a unui sau mai multor loci genetici în plantele de interes prin tehnici: PCR alelă-specific, ARMS (amplified refractory mutation system), MARMS (multiplex amplification refractory mutation system), ADN microarray şi secvenţierea ADN-ului.

2. Studiul polimorfismului genetic caracteristic speciei sub formă de fingerprint-inguri realizate prin: AFLP (amplified fragmented length polymorphism), AP-PCR (arbitrarily primed PCR), DALP (direct amplification of length polzmorphism), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), RFLP (restriction length polymorphism), SSR (simple sequence repeat polymorphism).

Locii genetici comuni utilizaţi pentru identificarea plantelor medicinale includ regiunile ITS (internal transcribed spacers), care separă regiunile codificatoare a genelor nucleare 5.8S, 18S şi 26S [2, 1] şi spaţiile intergenice ce separă multiplele copii repetate a genei nucleare 5S ARNr [7]. În acelaşi timp unii loci genetici utilizaţi în studiile filogenetice includ gene cloroplastice [13], ca de exemplu atpF, matK, rbcL, rpoB şi rpoC1, la fel intronul genei trnL şi spaţiile intergenice dintre genele trnC-trnD, trnL-trnF, trnH-psbA şi psbK-psbKI (tab. 2).

Tabelul 2

Genele nucleare şi cloroplastice utilizate pentru autentificare la plantele medicinale

Gena	Genom	Funcţie şi utilizare
ARNr 18S	Nuclear	Secvenţa genei care codifică pentru ARNr se foloseşte pe larg pentru studiile filogenetice la plante (Kuzoff RK et al., 1998).
Secvenţele ITS dintre 18S, 5.8S şi 26S	Nuclear	La plante, genele care codifică pentru ARNr 18S, 5.8S şi 26S formează un cistron, în care regiunile codificatoare sunt separate de regiuni ITS (internal transcribed spaces), ITS1 între genele 18S şi ITS2 între genele 5.8S şi 26S (Wendel JF et al., 2003). Regiunile ITS se utilizează în numeroase studii filogenetice.
Spacerii intergenici la ARNr 5S	Nuclear	La plante, genele care codifică pentru ARNr 5S sunt aranjate în repetiţii în tandem şi separate de spaceri pe unul sau mai mulţi cromozomi (Small RL et al., 2004). Secvenţa ARNr 5S a fost utilizată pentru construcţia arborilor filogenetici majorităţii organismelor (Hori H et al., 1987).
ARNr 26S	Nuclear	Secvenţa de ARNr 26S conţine regiuni miez foarte conservative şi în acelaşi timp secvenţe înalt variabile (Kuzoff RK et al., 1998).
atpA, atpB, atpF, atpH	Cloroplastic	Genele genomului cloroplastic care codifică pentru subunităţile ATP sintetazei (Sugiura M, 1992).

matK	Cloroplastic	Gena *matK*, care este localiyată în interiorul intronului la *trnK* şi cuprinde ≈ 1.6 kbp (Heubl G et al., 2006).
psbA, psbK, psbI	Cloroplastic	Genele *pbs* codifică proteine pentru fotosistemul II.
rbcL	Cloroplastic	Subunitatea mare a enzimei ribulozo-1.5-bifosfat carboxilaza (*rbcL*) este una dintre cele mai mari gene din genomul cloroplastic (≈ 1.4 kbp).
rp14, rpl16	Cloroplastic	Sunt gene cloroplastice care codifică pentru proteinele ribozomale L14 şi L16, constituienții subunității largi (50S) a ribozomilor cloroplastici.
rps16	Cloroplastic	Genă cloroplastică care codifică pentru proteina ribozomală S16, constituientă a subunității mici a ribozomilor cloroplastici.
trnC, trnD, trnF, trnK, trnL	Cloroplastic	Gene care codifică pentru ARN de transport (ARNt) pentru cisteină, acidul aspartic, fenilalanina, lizina şi leucină (Sugiura M, 1992).

B. Din cele 102 specii de plante, 94 specii posedă o taxonomie bine stabilită, bazată pe caractere morfofiziologice şi genetico-moleculare. Nouă specii de plante (*Gnaphalium uliginosum, Aronia melancarpa, Astragalus dasyanthus, Xanthium spinosum, Verbascum thapsiforme, Rumex comfertus, Centaurium umbellatum, Asperula odorata*) nu au prezentat înregistrare exactă la poziția ***taxonomie***, ceea ce denotă un nivelul foarte scăzut de studiu sau anumite divergențe a textelor taxonomice.

Numărul total de ***referințe*** pentru speciile studiate, variază în limite foarte largi, de la câteva până la 7 mln (exemplu *Zea mays*) (fig. 1). Se observă că nivelul de date este înalt, în special pentru speciile cultivate cu interes şi importanță economică, cum ar fi: *Zea mays*, *Capsicum annuus*, *Fragaria vesca*, *Humulus lupulus*, *Mentha piperita* etc.

Explorarea colecțiilor de ***secvențe*** din câteva surse (GenBank, RefSeq şi PDB) a permis să stabilim că numărul total de secvențe din aceste baze de date nu este stabil şi creşte exponențial. Conform datelor obținute speciile de plante studiate au fost clasificate convențional în patru grupe.

Primul grup (A) include plantele ce nu posedă nici o secvență nucleotidică secvențiată, grupul doi (B) cuprinde plante ce posedă pînă la 100 de secvențe nucleotidice, grupul trei (C) cuprinde plantele cu secvențe cunoscute în număr dintre 100 şi 1000 şi ultimul grup (D) – plantele cu secvențe nucleotidice cunoscute în număr mai mare de 1000 de secvențe (fig. 2).

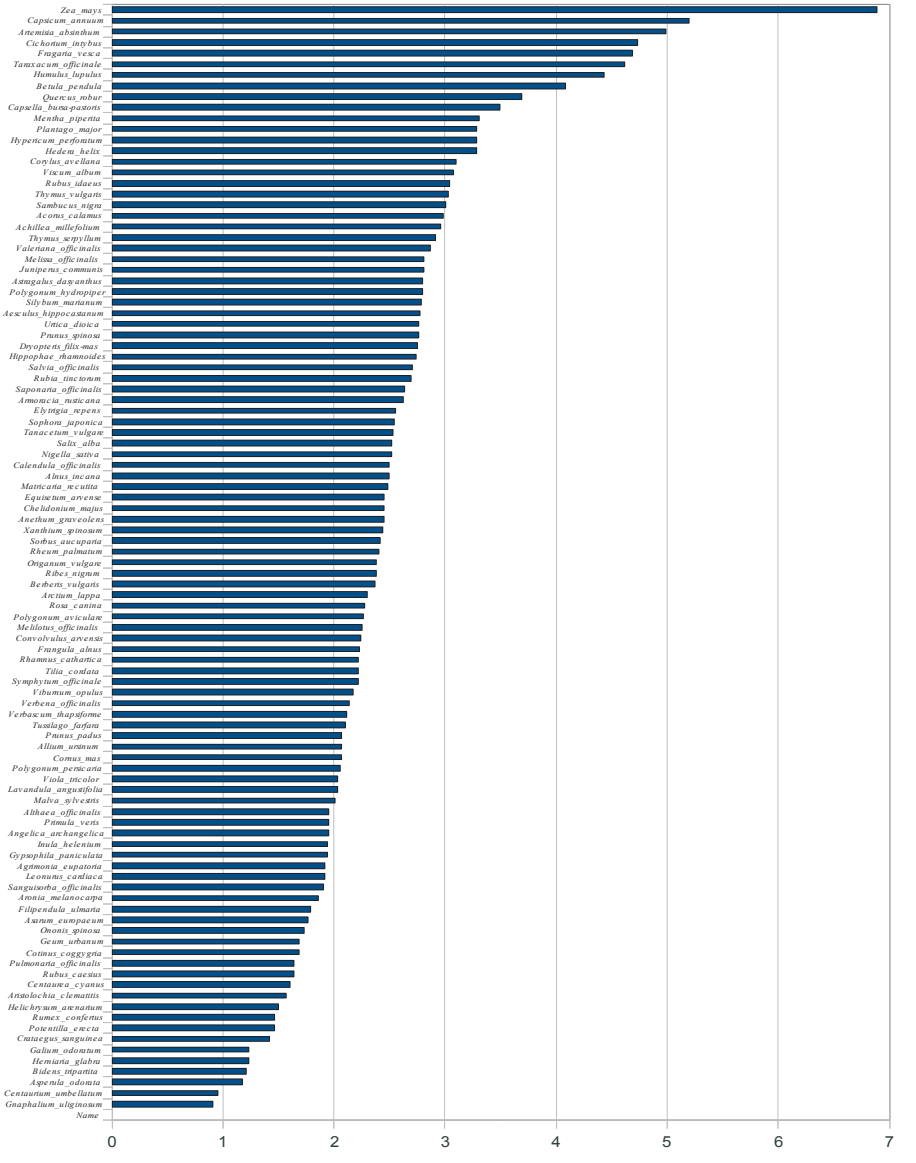


Fig. 1. Numărul de referinţe identificate în bazele de date a portalului NCBI pentru cele 102 specii de plante medicinale. Datele sunt prezentate în forma logaritmică (log10)

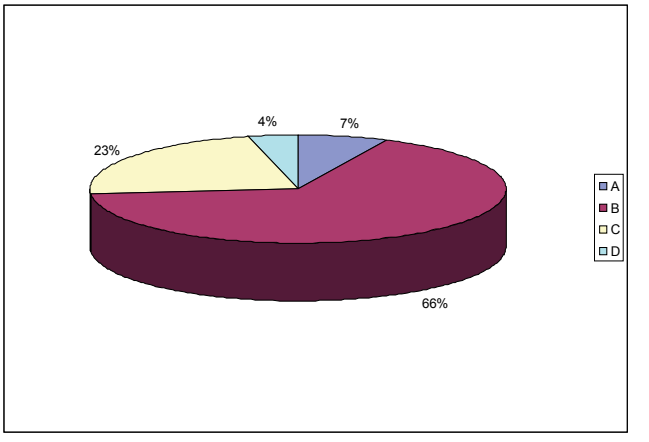


Fig. 2. Grupele de specii cu numărul diferit de secvenţe din baze de date

Cinci specii de plante (*Corylus avellana, Capsicum annuum*, *Zea mays*, *Quercus robur*, *Rubus idaeus)* reprezintă interes pentru proiectele genomice internaţionale. Pentru aceste plante există colecţii complete sau incomplete (în progres de cercetare) de secvenţe pe scară largă, asamblări, adnotări şi cartografieri ale genelor studiate. Numărul datelor pentru aceste specii creşte continuu, ceea ce este foarte important din punctul de vedere al utilizării acestor plante drept organisme model pentru analiza plantelor înrudite. Grupul de plante care nu posedă nici o secvenţă nucleotidică secvenţiată coincide cu grupul de plante care nu au o taxonomie moleculară stabilită, ceea ce pune în evidenţă importanţa investigaţiilor genetice şi a biologiei moleculare în stabilirea taxonomiei acestora.

C. În Republica Moldova nu există o bază de date unică a plantelor medicinale, accesibilă *on-line*. La momentul de faţă informaţii legate de plantele medicinale ale florei Republicii Moldova pot fi găsite fragmentar pe pagina http://www.salvaeco.org/plmed [18], care oferă informaţii despre speciile cel mai des utilizate în medicină şi o scurtă descriere a proprietăţilor biologice, perioada de vegetaţie, ce boli pot fi tratate şi ce organ este utilizat în acest scop. Pornind de la aceste considerente, ne-am propus să elaborăm un registru electronic al plantelor medicinale, avînd următoarea adresă: www.plante.asm.md.

Interfaţa sitului include o descriere succintă a proiectului „Evaluarea potenţialului farmaceutic al plantelor medicinale din flora spontană a RM" din cadrul centrului de cercetare şi formare profesională „Biologie moleculară" a Universităţii Academiei de Ştiinţe a Moldovei.

Obţiunea „***search***"ne oferă posibilitatea de a identifica pentru fiecare specie de plantă căutată informaţii ce ţin de: denumirea în limba latină şi cea întîlnită în popor, taxonomie, arialul de răspîndire, ecologie, acţiunea terapeutică, substanţele

biologic active; centrele, institutele şi laboratoarele care cercetează plante medicinale, caracteristica genetică, referinţe şi nu în ultimul rînd, putem vizualiza harta, care indică locurile de colectare a speciei pe teritoriul Republicii Moldova.

Fiecare vizitator care se înregistrează *on-line*, are posibilitatea: să analizeze informaţia dorită mai amănunţit, să formeze un grup de lucru între utilizatori, să descarce imagini, articole de interes şi să le evalueze, să adauge o noutate ştiinţifică, să publice o ştire chiar şi pe pagina principală a sitului.

Prin realizarea obiectivelor încercăm să dezvoltăm o strategie modernă de cercetare în scopul eficientizării procesului de valorificare a resurselor naturale, inclusiv a plantelor medicinale din Republica Moldova.

BIBLIOGRAFIE

1. *Álvarez I, Wendel JF.* Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference.Mol Phylogenet Evol 2003; 29: 417–34.

2. *Baldwin BG, Sanderson MJ, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Mo Bot Gard 1995; 82: 247–77.

3. *Bennett M. D., Leitch I. J., Price H. J., and J. Johnston S.,* "Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be 157Mb and thus 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of 125Mb," *Annals of Botany*, 2003, vol. 91, no. 5: 547–557.

4. Buletin Ecologic Nr. 3 RAPORT ANUAL 2003 Starea mediului în Republica Moldova: BIODIVERSITATEA, http://www.iatp.md/arii/text/ro/minarii/biodiv1.htm.

5. *Derelle E, Ferraz C, Cooke R, van de Peer Y, Rombauts S, Delseny M, Picard A,Demaille J, Moreau H.* In 'Plant and Animal Genomes XII Conference',January 10–14, 2004, San Diego

6. *Florea V.* Cultura plantelor medicinale. Chişinău: Universul, 2006, 312 p.

7. *Hori H, Osawa S.* Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. Mol. Biol. Evol. 1987; 4: 445–72.

8. *Lilly JW, HaveyMJ, Jackson SA, Jiang J.* Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. Plant Cell 2001; 13: 245–54.

9. *Mârza M.* Flora şi vegetaţia sinantropă necultivată a Republicii Moldova. Autoreferatul tezei de doctor habilitat în biologie. Chişinău 2010, 43 p.

10. *McClean Phillip,* Plant Genome Organization and Structure: Mitochondrial Genome Organization (1998), http://www.ndsu.edu/instruct/ mcclean/plsc731/genome/genome8.htm.

11. *Negru A., Sabanov G., Cantemir V., Ganju Gh., BaclanovV*. Plantele rare din flora spontană a Republicii Moldova. Chişinău: CEUSM, 2002, 198 p.

12. *Nistreanu A.* Plante medicinale din flora Republicii Moldova (Atlas), Chişinău, 2006, 234 p.

13. *Olmstead RG, Palmer JD.* Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. Am. J. Bot. 1994; 81: 1205–24.

14. *Small RL, Cronn RC, Wendel JF*. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. Aust. Syst. Bot. 2004; 17: 145–70.

15. *Teleuţă A., Colţun M., Mihailescu C., Ciocârlan N.* Plante medicinale. Editura „Litera Internaţional", 2008, 336 p.

16. http://bsapm.moldnet.md/Text/Pagina%20web%20Strategia/Roman/Cap1total.html

17. http://www.moldova.md/md/geografie

18. http://www.salvaeco.org/plmed.

19. www.mediu.gov.md/file/rapoarte/raport%202002/Cap_1.5.1.doc

20. www.ncbi.nlm.nih.gov