

## **GENETICA, BIOLOGIA MOLECULARĂ ȘI AMELIORAREA**

### **EXPRESIA UNOR TERPEN-SINTETAZE ÎN FLORI ȘI FRUNZE LA *ORIGANUM VULGARE* (SSP. *VULGARE*)**

**Port Angela, Duca Maria, Mutu Ana**

*Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”*

#### **Rezumat**

Terpenele sunt componentele principale ale uleiului volatil de *Origanum vulgare* L. ce determină valențe multiple de întrebuințare a acestei specii în calitate de plantă medicinală

și aromatică (PMA). Prin RT - qPCR în timp real a fost analizată activitatea de transcripție a 7 gene *TPS* (*EST*-uri), în flori și frunze, la fitoindivizii populației naturale de *O. vulgare* ssp. *vulgare* din rezervația Orheiul-Vechi (s. Butuceni). A fost pus în evidență un profil de co-expresie genică, diferențiat în frunze și în flori, cu diverse asocieri corelative, diferențiind subpopulațiile între ele. Datele obținute completează informațiile existente cu privire la controlul expresiei organ-specifice a genelor *TPS* în formarea chemotipului calitativ și cantitativ al uleiului volatil de *O. vulgare*.

*Cuvinte cheie:* *Origanum vulgare*, subpopulații, flora spontană, terpen-sintetaze, real-time PCR, transcripți, expresie organ-specifică.

*Depus la redacție* 26 aprilie 2019

---

*Adresa pentru corespondență:* Mutu Ana, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, str. Academiei, 3/2, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: anisoara.mutu@gmail.com

### Introducere

Plantele de *Origanum vulgare* sunt pe larg valorificate în scopuri fitoterapeutice și alimentare, ca plante medicinale și aromatice (PMA), datorită conținutului înalt în substanțe biologice active, în special carvacrol, timol și alte terpen din uleiul volatil [4].

Terpenele se caracterizează printr-o diversitate biochimică mare, fiind descriși până în prezent peste 60000 de reprezentanți [19]. Heterogenitatea structurală înaltă, a acestei clase de metaboliți, este vitală pentru asigurarea unor funcții specializate și reprezintă rezultatul variabilității genice [9], al condițiilor diferite de creștere și altor factori cu acțiune intrinsecă și extrinsecă de reglare [4]. Sinteza terpenelor și a derivaților este realizată de terpen-sintetaze (TPS) prin două căi metabolice: dependentă de mevalonat, localizată în citozol, prin care are loc formarea sesquiterpenelor (C15) și 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat, activă în plastide, rezultând hemi- (C5), mono- (C10) și diterpenele (C20) [2]. Există dovezi că între plastide și citozol există un schimb de produse terpenice intermediare, indicând faptul că cele două căi nu sunt complet independente. De asemenea, realizările recente au demonstrat existența și a altor căi intermediare de sinteză, precum și a unor enzime TPS active pe mai multe substraturi [17]. De exemplu, MtTPS5 din *Medicago truncatula* catalizează formarea unui complex de 27 de sesquiterpene [6]. Prin urmare, un profil divers de terpenoizi poate fi generat prin acțiunea unui număr mic de enzime multisubstrat. Deși enzimele TPS pot utiliza substraturi multiple, afinitatea pentru acestea variază prin ratele de reacție chimică [17].

Aceste particularități ale metabolismului secundar, care relevă nivele complexe de reglare genică și fiziologică, fac posibilă adaptarea PMA în diferite condiții ecologice. Variabilitatea înaltă de terpenoizi asigură interacțiunea cu mediul biotic și abiotic, oferindu-le un avantaj selectiv [5]. Rolul biologic al terpenelor este determinat de funcțiile specializate în rezistența plantelor la atacul microorganismelor, insectelor, animalelor erbivore sau în calitate de atracțanți pentru polenizatori, spre deosebire de compușii terpenici cu funcții primare în fotosinteză (carotenoizi, clorofile, plastochinone), respirație (ubichinona), creștere și dezvoltare (citochinine, steroli, brasinosteroidi, gibereline, acid abscizic). Deseori procesul de ameliorare a PMA, orientat pe anumite chemotipuri de valoare economică, determină restrângerea fondului

de gene, inclusiv a celor specifice metabolismul secundar, fapt ce afectează potențialul de adaptare a plantei. Din aceste considerente, multiple investigații au fost consacrate izolării și caracterizării genelor codificatoare de enzime TPS la diverse specii de plante gimnosperme și angiosperme [3, 13, 18]. A fost stabilit faptul că TPS reprezintă familii de gene, rezultate din duplicări, mutații și alte divergențe structurale.

De exemplu, 42 - 85 % din genele TPS formează rețele în tandem în genomul plantelor de arabidopsis, orez, plop, viță de vie, sorg și tomate [10, 14, 19]. Se presupune că această modalitate de aranjare a genelor câte două, trei sau mai multe gene omoloage este o consecință a duplicării în rezultatul *crossing-over*-ului inegal [1] și are un rol important în controlul genic al metabolismului terpenic în funcție de factorii de creștere și cei ecologici [7]. Realizările obținute prin clonarea unor gene TPS și studii transcriptomice la diverse specii de plante din familia Lamiaceae (*Thymus caespitosus* Brot., *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. etc), au permis cercetătorilor de a elucidă funcția și caracteristicile biochimice ale enzimelor codificate [2, 5, 13, 17].

Spre deosebire de alte plante medicinale la care genomul este cunoscut și disponibil în bazele de date (<http://medicinalplantgenomics.msu.edu/>) în cazul speciei *O. vulgare* este secvențiat doar genomul cloroplastic [12], fapt care pune în dificultate cercetările cu privire la structura și funcția genelor nucleare. Actualmente, în baza de date NCBI sunt accesibile mai multe secvențe genice transcrise (EST-uri) cu funcția ipotetică de terpen-sintetaze, identificate de Crocoll C. și echipa sa la două varietăți/ cultivare de *Origanum vulgare* L. (d06-01 și f02-04) [4, 15].

*O. vulgare* L. este o specie de PMA puțin studiată în aspect transcriptomic, iar în cazul plantelor din flora spontană, date privind expresia genelor asociate sintezei compușilor terpenici lipsesc în literatura de specialitate disponibilă. Astfel, în contextul celor expuse și al rolului fiziologic și ecologic important al terpenelor în adaptarea și răspândirea plantelor, obiectivul acestei lucrări a constituit analiza activității de transcripție a 7 TPS (EST-uri), în flori și frunze, la fitoindivizii populației naturale de *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* din rezervația Orheiul-Vechi (s. Butuceni).

### Material și metode

**Materialul de cercetare** a inclus șapte subpopulații de *Origanum vulgare* L., din flora spontană a raionului Orhei, s. Butuceni (numite Or1-Or7), care se deosebesc prin culoarea violet cu diferite nuanțe și caractere morfologice [16]. Eșantioanele de material biologic (probe individuale, n=3) au fost colectate separat, flori și frunze, de la plante în faza de înflorire, direct în câmp, congelate în azot lichid, iar ulterior păstrate la -80°C.

**Obținerea probelor de ARN și ADNc.** Probele de ARN total au fost extrase din țesut vegetal (3 repetiții biologice) cu reagentul kit TRIzol (*Thermo Scientific*), conform protocolului standard. Calitatea și concentrația probelor de ARN a fost determinată prin electroforeză în gel de agaroză de 1,2% și spectrofotometrie ( $\lambda$ 260,  $\lambda$ 280 nm). Pentru sinteza ADNc s-a utilizat 0,6  $\mu$ g ARN total și kit-ul RevertAid RT Reverse Transcription (*Thermo Scientific*) conform protocolului standard.

**Real-time qPCR.** qPCR în timp-real s-a realizat la amplificatorul DT-96 (*Federația Rusă*), conform programului: 95°C – 10 min.; 95°C – 15 sec., 62°C – 20 sec. (5 cicluri); 95°C – 20 sec., 58°C – 40 sec. (40 cicluri). Reacțiile de amplificare au fost realizate în 15  $\mu$ l de mediu de reacție care a inclus componentele stoc Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (*Thermo Scientific*), 2  $\mu$ l de ADNc; primeri specifici (0,3  $\mu$ M).

Secvența primerilor specifici (*Ovtps1- Ovtps7*) a fost elaborată în baza *EST*-urilor la *O. vulgare* prin programele Primer3Web v. 3.0.0. și OligoAnalyzer 3.1. Verificarea produselor de amplificare a fost efectuată prin electroforeză în gel de agaroză de 1,2%. Pentru identificarea nivelului de expresie relativă (u.c.) s-a utilizat metoda  $2^{-\Delta Ct}$  [11] și programul Real Time\_PCRv7.3. În calitate de genă de referință s-a utilizat *OvEF1alpha* [GU385981]. S-au determinat coeficienții de corelație *Pearson* ( $r$ ,  $p=0,05$ ) și s-a efectuat *Analiza Componentelor Principale* (ACP) prin utilizarea softului XLSTAT (<https://www.xlstat.com>). Analiza semnificației statistice a diferențelor conținutului de transcripti la cele 7 subpopulații a fost realizată prin testele ANOVA și *Bonferroni*, ( $p<0,05$ ;  $t_{95\%}$ ).

### Rezultate și discuții

**Identificarea genelor codificatoare de terpen-sintetaze la *O. vulgare*.** Analiza informației în bazele de date genomice NCBI. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) privind genele, care codifică proteinele cu rol funcțional în biosinteza metaboliților secundari în plante, a relevat în cazul *Origanum vulgare* doar secvențe genice transcrise (*EST-uri*) cu funcția ipotetică de terpen-sintetaze (*Ovtps*) (tab. 1).

Astfel, în baza gradului de omologie a terpen-sintetazelor, identificat prin programul BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) au fost puse în evidență *EST-urile* la *O. vulgare* cu cel mai mare grad de similaritate (50-99%, scor BLAST >100) a secvenței nucleotidice cu cea a altor gene codificatoare de terpen-sintetaze (tab. 1).

**Tabelul 1. EST-uri de interes și gradul de similaritate al acestora cu alte secvențe genice (*Blastx*).**

Secvențe similare cu <i>Ovtps</i>	Specia	Scor	Acoperire (%)	Similaritate (%)
<b><i>Ovtps1/ GU385980.1</i></b>				
terpene synthase 6	<i>Thymus vulgaris</i>	984	99	87
alpha-terpineol	<i>Thymus caespititius</i>	934	99	82
terpene synthase	<i>Salvia officinalis</i>	650	81	67
<b><i>Ovtps2/ GU385978.1</i></b>				
gamma-terpinene synthase	<i>Origanum syriacum</i>	1070	94	99
monoterpene synthase	<i>Origanum majorana</i>	1129	98	99
gamma-terpinene synthase	<i>Thymus caespititius</i>	1075	99	94
<b><i>Ovtps3/ GU385975.1</i></b>				
$\beta$ -caryophyllene synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	596	97	61
(-)-germacrene D synthase	<i>Salvia officinalis</i>	575	88	58
$\beta$ -caryophyllene synthase	<i>Ocimum kilimandscharicum</i>	618	97	58
<b><i>Ovtps4/ GU385974.1</i></b>				
germacrene-D synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	713	99	64
terpene synthase 4	<i>Origanum onites</i>	407	37	95
$\beta$ -caryophyllene synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	531	95	56
<b><i>Ovtps5/ GU385971</i></b>				
pinene synthase	<i>Salvia rosmarinus</i>	783	97	74

geraniol synthase	<i>Perilla setoyensis</i>	772	98	71
terpene synthase 7	<i>Thymus vulgaris</i>	731	96	69
<b>Ovtps6/ GU385970.1</b>				
(-)-germacrene D synthase	<i>Salvia officinalis</i>	689	91	73
$\beta$ -caryophyllene synthase	<i>Lavandula angustifolia</i>	699	98	67
$\beta$ -caryophyllene synthase	<i>Ocimum kilimandscharicum</i>	678	98	67
<b>Ovtps7/ GU385967.1</b>				
monoterpene synthase	<i>Thymus caespititius</i>	939	99	80
terpene synthase 5	<i>Thymus vulgaris</i>	939	99	79
linalool synthase	<i>Perilla setoyensis</i>	682	92	64

Transcripții (ADNc) *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps5* și *Ovtps7* prezintă omologie cu *alfa-terpineol* (*Ovtps1*- 82%), *gamma-terpinen-sintetaza* (*Ovtps2*- 94%) din *Thymus*, *terpen-sintetaza* (*Ovtps1*- 67%) din *Salvia officinalis*, *linalol-sintetaza* (*Ovtps7* - 64%), *geraniol synthase* (*Ovtps5* - 71%) din *Perilla setoyensis* etc.

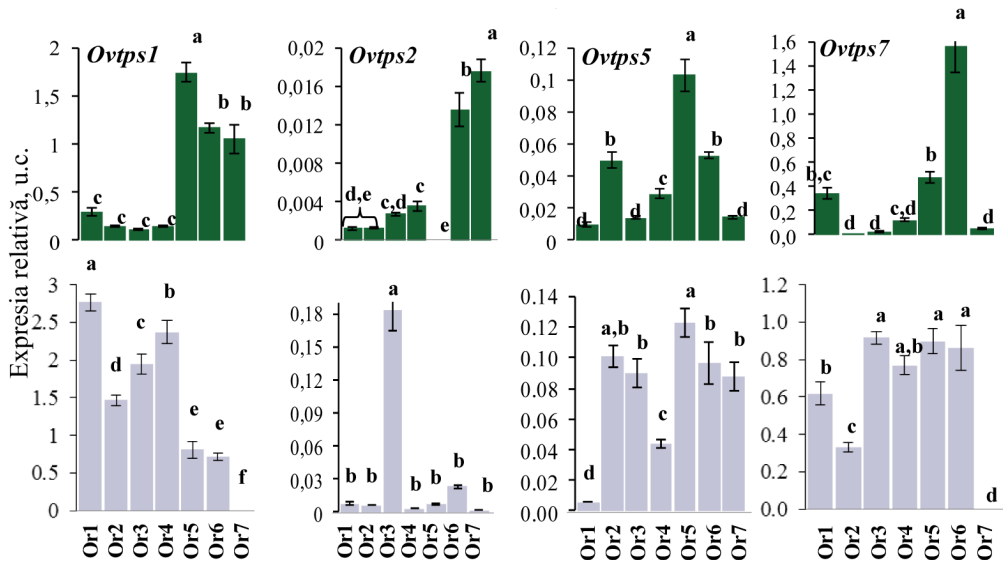
Secvențele genice *Ovtps3*, *Ovtps4* și *Ovtps6* au prezentat, de asemenea, similaritate față de sesquiterpen-sintetazele altor *Lamiaceae*, incluzând:  *$\beta$ -cariofilen-sintetaza* (*Ovtps3* - 61%), *germacren D-sintetaza* (*Ovtps4* - 64%) din *Lavandula angustifolia*,  *$\beta$ -cariofilen-sintetaza* (*Ovtps6* - 67%) din *Ocimum* etc.

În concluzie, din colecția de ARNm (*Ovtps*) disponibilă în NCBI, au fost selectate 7 *EST-uri* cu funcție candidat de terpen-sintetaze, pentru analiza activității de transcripție a genelor, în flori și frunze, la plantele de *O. vulgare* ssp. *vulgare*.

**Activitatea transcripțională a monoterpene-sintetazelor.** Analiza expresiei relative a monoterpene-sintetazelor s-a realizat prin cuantificarea transcripțiilor *Ovtps1* [GU385980], *Ovtps2* [GU385978.1], *Ovtps5* [GU385971], *Ovtps7* [GU385967]. Datele obținute au relevat un conținut mai mare de transcripți în flori comparativ cu cel din frunze în cazul a trei gene: *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps7* (de 1,5-8 ori). Această particularitate nu se constată, cu unele excepții, la monoterpene-sintetaza *Ovtps5*, care are un nivel de expresie relativ similar în flori și frunze (fig. 1).

Nivelul de expresie relativă a *Ovtps1* variază de la 0,110 (Or3) până la 1,748 u.c. (Or5) în frunze și de la 0,719 (Or6) până la 2,764 u.c. (Or1) în flori. În dependență de țesutul analizat se observă discriminarea subpopulațiilor Or1, Or2, Or3, Or4 față de Or5, Or6, Or7, primele au avut cantități mici în frunze și mari în flori, pe când ultimele trei subpopulații din contra, valori mari în frunze și mici în flori. Spre deosebire de *Ovtps1*, activitatea genei *Ovtps2* a prezentat valori mai mici în frunze de la 0,001 u.c. (Or1) până la 0,018 u.c. (Or7). Nu au fost depistați transcripți în frunzele plantelor din Or5. Cantități mai mari de ARNm *Ovtps2* au fost înregistrate în flori. Subpopulația Or3 se diferențiază prin conținutul de 0,183 u.c. față de celelalte 6 la care au fost constatate valori foarte mici (0,001-0,023 u.c.). *Ovtps5* nu se deosebește esențial după nivelul de expresie relativă în frunze și flori, fiind același rang de valori. Or5 cu cele mai înalte valori (0,123 u.c.) este urmat de Or2, Or3, Or6 și Or7 (0,088-0,101 u.c.) fără diferențe semnificative între ele. Subpopulațiile Or4 și Or1 au cele mai mici valori față de toate subpopulațiile. *Ovtps7* din frunze nu depășește valoarea de 0,6 u.c. a expresiei relative (excepție Or6). În flori, valorile medii sunt relativ omogene în cadrul populației, mai

mari de 0,6 u.c. la Or1, Or3, Or4, Or5 și Or6. Cele mai mici valori au fost înregistrate la Or7 (0,007 u.c.).



**Figura 1. Activitatea transcripțională a monoterpen-sintetazelor în frunze și flori.**

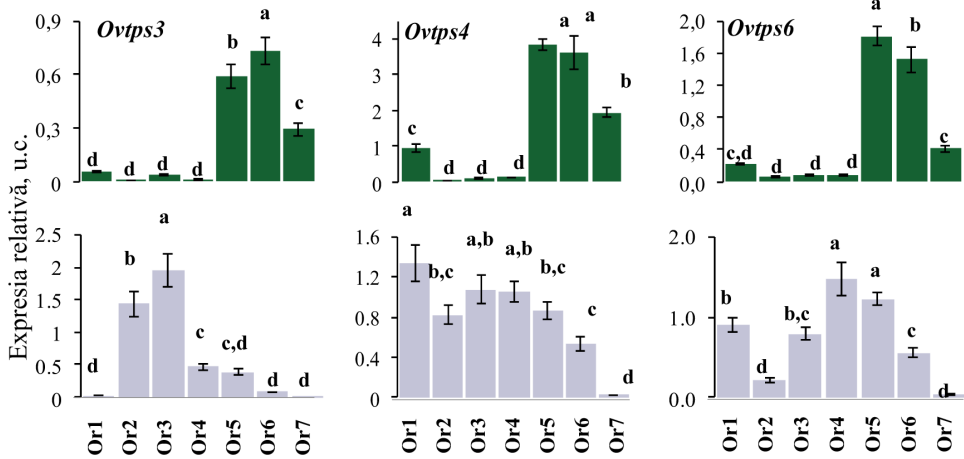
Sunt prezentate valorile medii și abaterea standard a mediei, analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, literele indică diferențele statistice semnificative ( $p < 0,05$ ;  $t_{95\%}$ ) dintre subpopulații.

**Activitatea transcripțională a sesquiterpen-sintetazelor.** Genele *Ovtps3* [GU385976], *Ovtps4* [GU385974] și *Ovtps6* [GU385970] codifică proteinele cu activitate enzimatică, numite sesquiterpen-sintetaze, datorită produselor finale de reacție și al similarității de secvență înaltă cu omologi de la alte specii de plante. Studiul expresiei relative a acestor *EST*-uri a evidențiat gena *Ovtps3* cu o activitate mai mare în flori comparativ cu cea din frunze (de 2-3 ori). Gena *Ovtps6* a prezentat un nivel de expresie relativ similar în flori și frunze iar în cazul *Ovtps4* au fost înregistrate valori mai mari în frunze (fig. 2).

Activitatea transcripțională a *Ovtps3* în frunze a prezentat cel mai mare nivel la Or6 (0,74 u.c.), Or5 (0,59 u.c.) și Or7 (0,29 u.c.). Subpopulațiile Or2 și Or3 sunt evidențiate cu cel mai mare nivel al transcripților în flori (1,43 și 1,95 u.c., respectiv). Conținutul *Ovtps4* în frunze variază de la 0,022 u.c. (Or2) până la 3,850 u.c. (Or5), iar în flori, este în medie mai mic, cuprins între valorile 0,018 u.c. (Or7) și 1,341 u.c. (Or1). În cazul *Ovtps6* valorile variază în frunze de la 0,062 u.c. (Or2) până la 1,818 u.c. (Or5), iar în flori, de la 0,033 u.c. (Or7) până la 1,465 u.c. (Or4).

Astfel, prin generalizarea datele obținute, s-a constatat conținutul mai mare de transcripți ai sesquiterpen-sintetazelor comparativ cu cel al monoterpen-sintetazelor atât în frunze (cca. de 3,3 ori), cât și în flori (de 1,7 ori). La nivel intrapopulațional, diferența între valorile minime și maxime ale conținutului de transcripți este mult mai mică (3-8 ori) în flori comparativ cu cea din frunze (de 10-30 ori). În cazul *Ovtps3*, nivelul de variabilitate intrapopulațională este înalt atât în frunze, cât și în flori (de 18-20 ori).





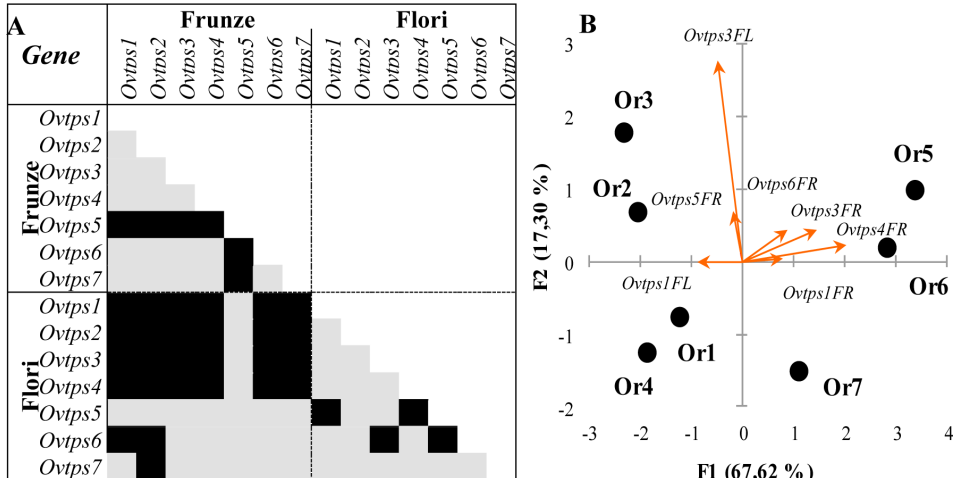
**Figura 2. Activitatea transcripțională a sesquiterpen-sintetazelor în frunze și flori.**

Sunt prezentate valorile medii și abaterea standard a mediei, analiza statistică este realizată prin ANOVA și testul *Bonferroni*, literele indică diferențele statistice semnificative ( $p < 0,05$ ;  $t_{95\%}$ ) dintre subpopulații.

**Profilul general de co-expresie a *Ovtps* în frunze și flori.** Pentru a pune în evidență profilul general de expresie a mono- și sesquiterpen-sintetazelor la nivelul întregii populații este necesar de indentificat asocierile corelative în conținutul de transcripti (u.c.) în flori și frunze, care s-a realizat prin analiza factorială (ACP). Astfel, au fost identificate două CP care explică 85% din variația datelor inițiale, indicând un grad înalt de corelație între variabile. În combinația liniară a variabilelor independente care formează CP1, relația de dependență caracteristică pentru întreaga populație este pusă în evidență prin corelații statistice *pozitive* pentru *Ovtps1* ( $r=0,98$ ) *Ovtps 3* ( $r=0,98$ ), *Ovtps4* ( $r=0,99$ ), *Ovtps6* ( $r=0,95$ ) în frunze și *negative* pentru *Ovtps1* din flori ( $r=-0,72$ ). În cazul variabilelor care definesc CP2, corelează *pozitiv* valorile pentru: *Ovtps2* ( $r=0,66$ ), *Ovtps3* ( $r=0,94$ ), *Ovtps5* ( $r=0,57$ ) în flori și *Ovtps5* în frunze ( $r=0,68$ ). Celelalte gene prezintă corelații *pozitive/ negative* de intensitate slabă cu ambele componente principale. Analiza contribuției procentuale a 14 variabile în variația conținutului de transcripti a relevat doar 7 variabile, care caracterizează profilul general de expresie a terpen-sintetazelor. Astfel, cea mai mare contribuție în caracterizarea populației o au conținuturile de transcripti *Ovtps4* (46%), *Ovtps3* (24%); *Ovtps1* (8%), *Ovtps6* (9%), *Ovtps5* (7%) din frunze și *Ovtps3* (86%), *Ovtps1* (9%) din flori (fig. 3B).

Aceste variabile au grupat subpopulațiile Or1, Or2, Or3 și Or4 după conținutul mai înalt al transcriptiilor în flori. Subpopulațiile Or5, Or6 și Or7 se evidențiază prin valori ridicate ale conținutului de transcripti în frunze, excepții fiind observate în cazul genelor *Ovtps5*, *Ovtps2* (Or5 și Or6) și *Ovtps7* (Or5), la care nivelul de expresie a fost mai mare în flori. După tipul relației de dependență cantitativă (coeficientul *Pearson*) între transcriptiile terpen-sintetazelor studiate se conturează un profil general de co-expresie. Astfel, supraexpresia genelor în frunze (excepție *Ovtps5*) este asociată cu subexpresia *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps4* în flori. Valorile conținutului *Ovtps5*

din frunze corelează pozitiv cu cel al transcripțiilor codificați de toate genele în flori (fig. 3A). Particularități specifice în activitatea de expresie se constată și la nivel de organ, de exemplu, în frunze sunt corelații negative doar în cazul unei gene, iar în flori se asociază negativ valorile pentru *Ovtps5* cu *Ovtps1*, *Ovtps4*, *Ovtps6* și pentru *Ovtps6* cu *Ovtps3*.



**Figura 3. Profilul general de co-expresie a terpen-sintetazelor în frunze și flori (A) și distribuția subpopulațiilor în baza activității de transcripție a EST-urile studiate (B).** Culoarea neagră în profilul de co-expresie indică corelații negative iar sur – corelații pozitive.

Sinteza datelor obținute prin analiza activității de transcripție a șapte terpen-sintetaze la *O. vulgare* ssp. *vulgare* din flora spontană a pus în evidență un profil de co-expresie, diferențiat în frunze și în flori, cu diverse asocieri corelative, relevând asupra unor efecte polimerice, pleiotropice și epistatice de interacțiune a genelor. Aceste concluzii demonstrează rolul de bază al reglării genice, prin controlul organ-specific al activității genelor *TPS*, în formarea chemotipului calitativ și cantitativ al uleiului volatil de *O. vulgare*. Expresia organ-diferențiată a genelor *TPS*, indusă de factori fiziologici sau de mediu, este descrisă în mai multe lucrări. De exemplu, în cazul plantelor de *Matricaria recutita* (mușetel) a fost stabilit un nivel diferit de activitate a patru terpen-sintetaze (*MrTPS1*, *MrTPS3*, *MrTPS4*, *MrTPS5*) în toate organele aeriene studiate (flori sterile, fertile, frunze, tulpini). În rădăcinile acestei specii s-au identificat transcripții doar a unei gene (*MrTPS2*), care codifică o enzimă multisubstrat. Profilul de acumulare a transcripților *TPS* în diferite organe ale mușetelului a fost convergent cu cel al terpenelor [8]. Compoziția calitativ și cantitativ diferită a terpenoizilor în funcție de organ (frunze, rădăcini) a fost descrisă și la plantele de porumb [9]. De asemenea, autorii studiului au pus în evidență reglarea posttranscripțională a terpen-sintetazelor dependentă de bioritmul circadian în acumularea substratului biochimic. Un alt grup de cercetători au constatat sporirea expresiei unei monoterpen-sintetaze (*ZMM1*) indusă de rănirea mecanică a frunzelor de *Cassumunar ginger* (ghimbir) atribuindu-i acestei particularități un rol esențial în sporirea conținutului și calității uleiului volatil [18]. Stresul hidric este unul dintre factorii abiotici, care afectează grav productivitatea și



compoziția uleiului volatil de *O. vulgare* din regiunile aride și semiaride. Morshedloo M. R. și colab. (2017) studiind două subspecii de *O. vulgare* (ssp. *virens* și ssp. *gracile*) din Iran în condiții de modelare a stresului hidric, au demonstrat creșterea semnificativă a activității genelor *Ovtps2* și *Ovtps6* în condiții de stres [15]. Astfel de reacții de răspuns au fost relevate și în cazul plantelor de *Artemisia annua* L. [20]. Toate aceste studii demonstrează cu certitudine relațiile de dependență dintre transcriptomul terpen-sintetazelor și mediul de creștere și dezvoltare. În același timp rămân neelucidate foarte multe întrebări cu referire la diversitatea genelor TPS, evoluția filogenetică a familiilor de gene și funcția lor spațial-temporală. De exemplu, prin investigarea diversității genelor TPS la speciile de *Eucalyptus* (*E. grandis* și *E. globulus*) a fost identificat un număr mare de gene și pseudogene, organizate în clustere genomice mari, majoritatea fiind expresate în țesuturi lipsite de clorofilă: rădăcini, floem și xilem. Rolul produșilor de expresie a acestor gene în țesuturile menționate nu este pe deplin elucidat [10]. Datele prezentate în lucrare confirmă rezultatele altor autori cu privire la reglarea genică a metabolismului compușilor terpenici, prin codificarea și coordonarea activității enzimelor TPS ce catalizează reacțiile de sinteză și catabolism ale acestora.

### Concluzii

1. Analiza expresiei relative (RT-PCR) a 7 terpen-sintetaze la plantele de *O. vulgare* a prezentat variabilitate în funcție de genotip și organ. Astfel, a fost relevat conținutul mai mare de transcripti ai sesquiterpen-sintetazelor comparativ cu cel al monoterpen-sintetazelor atât în frunze (de cca. 3,3 ori), cât și în flori (de 1,7 ori). Diferența între valorile cantitative minime și maxime în cadrul populației este mult mai mică (de 3-8 ori) în flori, comparativ cu cea din frunze (de 10-30 ori). În cazul sesquiterpen-sintetazei *Ovtps3* variația intrapopulațională este înaltă, atât în frunze, cât și în flori (de 18-20 ori).

2. Profilul de co-expresie cu două grupuri de corelații medii și înalte a conținutului în terpen-sintetaze: (1) *Ovtps1*, *Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps6* din frunze asociate pozitiv între ele și negativ cu *Ovtps1* expresată în flori, și (2) *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps5* din flori asociate pozitiv atât între ele, cât și cu *Ovtps5* din frunze, indică asupra unor efecte polimerice, pleiotropice și epistatice de interacțiune a genelor.

3. Cea mai mare pondere procentuală în caracterizarea populației o au valorile conținutului de transcripti *Ovtps1*, *Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps5* și *Ovtps6* din frunze și *Ovtps1*, *Ovtps3* din flori. Subpopulațiile Or1, Or2, Or3 și Or4 au un conținut mai înalt al transcriptiilor genelor în flori, cu excepția genei *Ovtps5* care are valori mai mari în frunze la Or1 și Or3. Subpopulațiile Or5, Or6 și Or7 se evidențiază prin valori ridicate al conținutului de transcripti în frunze, excepții fiind observate în cazul genelor *Ovtps5*, *Ovtps2* (Or5 și Or6) și *Ovtps7* (Or5), la care nivelul de expresie a fost mai mare în flori.

### Bibliografie

1. Chen F. et al. Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene *1,8-cineole*. *Plant Physiol.*, 2004, vol. 135, p. 1956–1966.
2. Chen F. et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.*, 2011, vol. 66, p. 212–229.
3. Chen X. et al. Terpene synthase genes in eukaryotes beyond plants and fungi: Occurrence in social amoebae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, vol. 113(43), p. 12132–12137.
4. Crocoll C. et al. The terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the

pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Mol Biol.*, 2010, vol. 73(6), p. 587-603.

5. Degenhardt J., Köllner T. G., Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 2009, vol. 70, p. 1621–1637.

6. Garms S, Kollner T. G., Boland W. A multiproduct terpene synthase from *Medicago truncatula* generates cadalane sesquiterpenes via two different mechanisms. *J Org Chem*, 2010, 75(16):5590–5600.

7. Gershenzon J., Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, vol. 3(7), p. 408–414.

8. Irmisch S. et al. The organ-specific expression of terpene synthase genes contributes to the terpene hydrocarbon composition of chamomile essential oils. *BMC Plant Biol.*, 2012, vol. 12:84.

9. Köllner T. G. et al. The sesquiterpene hydrocarbons of maize (*Zea mays*) form five groups with distinct developmental and organ-specific distribution. *Phytochemistry*, 2004, vol. 65(13), p. 1895-1902.

10. Külheim C., Padovan A. et al. The *Eucalyptus* terpene synthase gene family. *BMC Genomics*, 2015, 16:450.

11. Livak J. K., Schmittgen D. T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔT</sup> Method. *Methods*, 2001, vol. 25, p. 402-408.

12. Lukas B., Novak J. The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*). *Gene*, 2013, vol. 528(2), p. 163–169.

13. Martin D. M., Faldt J., Bohlmann J. Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol.*, 2004, vol. 135, p. 1908–1927.

14. Matsuba Y. et al. Evolution of a complex locus for terpene biosynthesis in solanum. *Plant Cell.*, 2013, vol. 25(6), p. 2022-36.

15. Morshedloo M. R. et al. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, vol. 111, p. 119–128.

16. Mutu A. Diversitatea morfologică a populațiilor de *Origanum vulgare* L. din Republica Moldova. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, 2018, nr. 1(334), p. 85-96.

17. Pazouki L., Niinemets Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol. 7, p. 1-16.

18. Saowaluck B.-I. et al. Molecular cloning and expression levels of the monoterpene synthase gene (ZMM1) in *Cassumunar ginger* (zingiber montanum (koenig) link ex dietr.). *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 2014, vol. 66 (4), p. 1321-1331.

19. Tholl D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2015, p. 63–106.

20. Yadav R. K. et al. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. *Plant Physiol. Biochem.*, 2014, vol. 74, p. 70-83.