

# Raport științific și tehnic

PN-III-P2-2.1-PED-2021-4380

## Cultivare controlată cu ajutorul luminii a germenilor și microgreens vegetali cu conținut fenolic ridicat

Etapa a II-a - 1.01.2023 – 05.12.2023

### Introducere

Cu o diversitate structurală uluitoare, substanțele fenolice naturale sunt cunoscute pentru proprietățile lor valoroase, de promovare a sănătății și oferă posibilitatea de a fi utilizate ca parte a unei diete obișnuite sau pot servi ca puncte de plecare pentru îmbunătățirea în continuare a structurii și funcției. Compușii fenolici sunt o clasă de metaboliți secundari care joacă roluri esențiale în fiziologia plantelor și adaptarea la mediu. Sunt implicați într-o gamă largă de procese, inclusiv apărarea împotriva agenților patogeni, protecția împotriva radiațiilor UV, atragerea polenizatorilor și modularea interacțiunilor plante-microb. Biosinteza compușilor fenolici în plante este un proces complex, care implică diverse enzime și gene asociate, cum ar fi fenilalanina amoniac liaza (PAL), O-metiltransferaza acidului cafeic (COMT), sintaza acidului rosmarinic (RAS) și tirozin aminotransferaza (TAT).

Mai multe studii au evidențiat că calitatea spectrală a luminii poate influența semnificativ producția de compuși fenolici. Astfel, se constată o interacțiune complexă între iradierea PAR (radiație activă fotosintetic) și componentele spectrale în acumularea de compuși fenolici la plantele de diverse specii. Impactul cantității luminii (intensitatea și fotoperioda) și al calității (compoziția spectrală) se extinde asupra creșterii și fiziologiei plantelor, interacționând cu alți parametri de mediu și factori de cultură. Această complexitate influențează comportamentul și metabolismul plantelor, inclusiv sinteza compușilor fenolici. Astfel, având în vedere că în etapa precedentă s-a inițiat modelul de cultivare experimental, în această etapă, s-au testat diferite variabile experimentale pentru a optimiza modelul de cultivare. Ca urmare, s-au aplicat diverse spectre luminoase, în combinație cu diferite regimuri de fertilizare, și, pe baza caracteristicilor fenotipice ale plantulelor, s-a selectat modelul experimental optim. Pentru plantulele cultivate în acest model, s-a urmărit identificarea și caracterizarea mecanismelor fiziologice și moleculare ce pot duce la stimularea sintezei de compuși fenolici.

### Raport etapa

Această etapă are denumirea de *Optimizare protocol elicitare și caracterizare biomoleculară a mecanismelor*, iar în cadrul ei s-au întreprins, conform planului de realizare a proiectului:

- 2.1. Optimizare protocol cultivare și elicitare
- 2.2. Caracterizare fiziologică și moleculară a mecanismelor
- 2.3. Modelare și validare experimentală
- 2.4. Diseminare rezultate

Metodele utilizate, precum și rezultatele științifice și tehnice aferente fiecărei activități, sunt după cum urmează:

## 2.1 Optimizare protocol cultivare si elicitare – indeplinit 100%

*S-a realizat modelarea fenotipică a răspunsului speciilor Ocimum basilicum si Chenopodium quinoa, supuse diferitelor spectre luminoase (Fig. 1), dar si unor regimuri de irigare diferite, cu apa, respectiv fertilizant (Fig. 3). Astfel, s-au realizat experimente factoriale bidirecționale, folosind factorul 1 – lumină (lungimi de undă în rapoarte diferite) și factorul 2 – fertilizare. S-au cultivat semnițe de Ocimum basilicum verde – soiul Aromat de Buzau si rosu – soiul Red Rubin, precum si de Chenopodium quinoa cv Vikinga. Plantele cultivate au fost udate, folosind sisteme automate de irigare, cu apa sau cu un fertilizant, conținând N, P și K, dupa urmatoarea reteta:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 0,597 g,  $\text{P}_2\text{O}_5$  - 0,708 g,  $\text{C}_2\text{K}_2\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  - 0,5506 g la 100 ml fertilizant. Substanțele cântărite s-au solubilizat în volumul corespunzător de apă distilată. Solubilizarea s-a realizat prin agitare la 60°C. Plantele s-au udat o dată la 24 ore, prin picurare, timp de 2 minute (aproximativ 50 ml).*



Fig. 1. Seminte de *Ocimum basilicum* (sus) si plantule de *Quinoa chenopodium* (jos) cultivate sub diferite spectre luminoase

S-a constituit un design initial, in care s-au testat 4 compozitii spectrale diferite, dintre care unul contine spectru complet – lumina alba si 3 variante cu proportii diferite de lumina ultraviolet:albastra:verde:rosu indepartat:rosu:alb (Tab 1., Fig. 2). Acest design a fost realizat, pornind de la rezultatele anterioare ale directorului de proiect si de la cele obtinute in etapa precedenta, fiind realizata *o optimizare a parametrilor de cultivare si elicitare* din literatura si din observatii proprii, de catre P2.

Tab. 1. Spectre luminoase experimentale folosite pentru optimizarea protocolului de crestere

Varianta	Raport ultraviolet:albastra:verde:rosu indepartat:rosu:alb
Varianta 1	25:31:0:36:28:0

Varianta 2	0:31:27:70:5:0
Varianta 3	0:23:41:60:11:21
Varianta 4	0:34:0:90:0:0

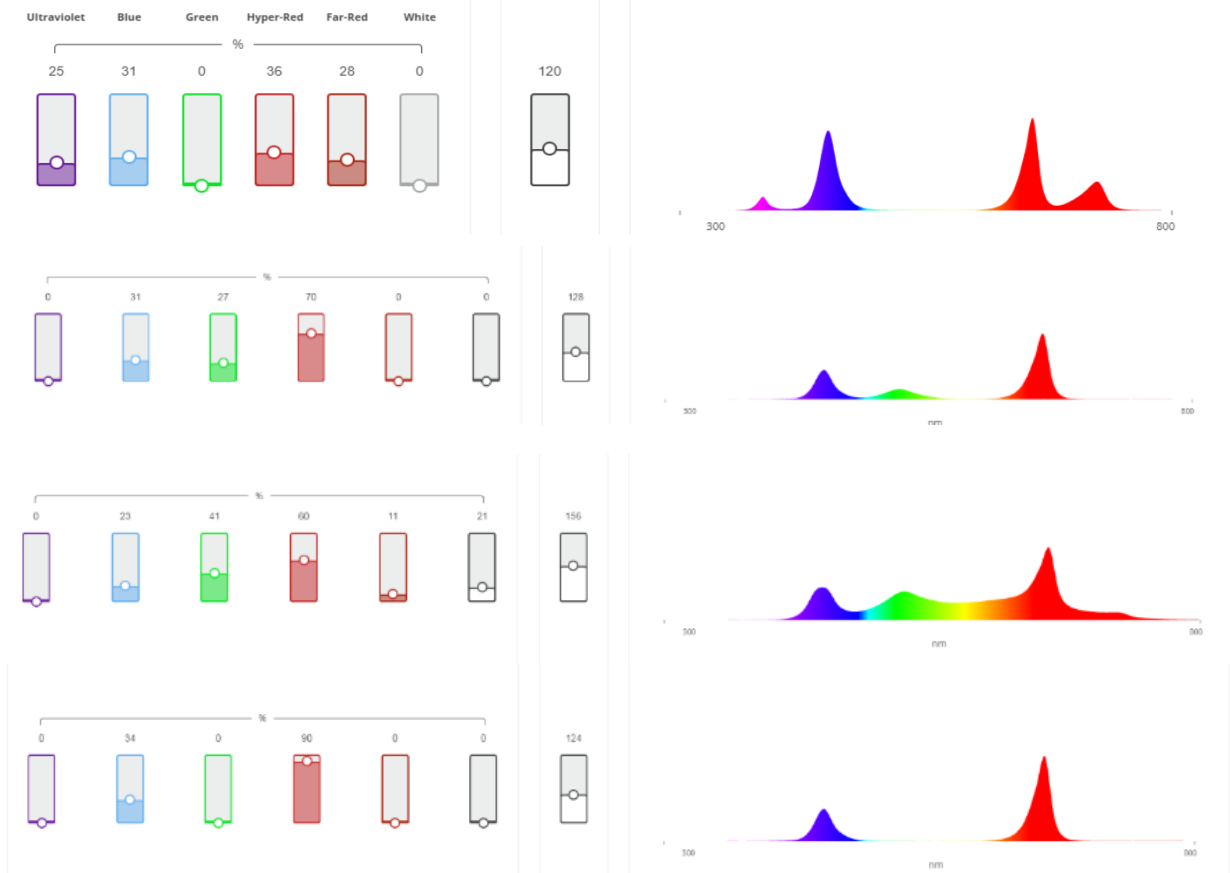


Fig. 2. Compozitia spectrala a variantelor experimentale



Fig. 3. Plantule de *Ocimum basilicum* cultivate sub diferite spectre de lumina, cu irigare

S-au realizat analize cantitative pentru parametri morfometrici și biochimici:

- pentru busuioc, determinarea conținutului de apă și de substanțe minerale s-a realizat pe câte 100 de plantule din fiecare specie cultivată, care s-au cântărit și au fost supuse unor

processe de uscare, in etuvă, timp de 48 de ore, la 60°C, respectiv calcinare, în creuzete de porțelan, la temperatura de 550°C, timp de 3 ore (Tab. 1, 2, Fig. 4).

- pentru quinoa, s-a masurat suprafata foliara, precum si masa a 100 plantule, precum si inaltimea plantulelor (Fig. 5)

Tabel 1. Cantitatea de apă și de substanțe minerală la plante de Quinoa chenopodium cv Vikinga

Probă	Masă proaspătă (g)	Masă uscată (g)	Cantitatea de apă (%)	Masă calcinată (g)	Substanțe minerale (%)
BVLC	0,8000	0,0389	95,1375	0,0335	4,1875
BRLC	0,5562	0,0313	94,3725	0,0299	5,3757
BVLA	0,6632	0,0364	94,5114	0,0315	4,7496
BRLA	0,5571	0,0307	94,4893	0,0276	4,9542

Tabel 2: Cantitatea de apă și de substanțe minerală la plante de Ocimum basilicum soi Aromat de Buzau (BV) si soi Red Rubin (BR), in sistem de irigare, sub diferite spectre luminoasa

Probă	Masă proaspătă (g)	Masă uscată (g)	Cantitatea de apă (%)	Masă calcinată (g)
BVLC_apă	0,745	0,0394	94,7114	0,01
BVLC_fertilizant	0,6348	0,0223	96,4871	0,001
BRLC_apă	0,6289	0,0164	97,3923	0,0087
BRLC_fertilizant	0,6343	0,0318	94,9866	0,0024
BVLA_apă	0,6627	0,0348	94,7487	0,0065
BVLA_fertilizant	0,7113	0,0397	94,4186	0,0098
BRLA_apă	0,5953	0,0308	94,8261	0,0054
BRLA_fertilizant	0,5677	0,0311	94,5217	0,0083

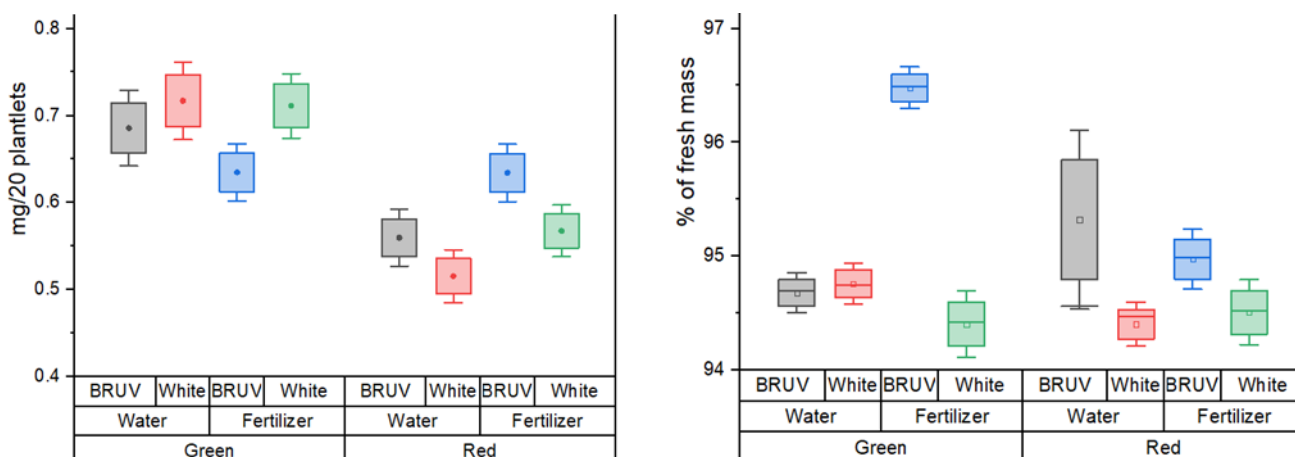


Fig. 4 Acumularea de biomasa (stanga) si de apa (dreapta) la plantule de *Ocimum basilicum* soi verde si rosu, sub diverse spectre de lumina si fertilizare

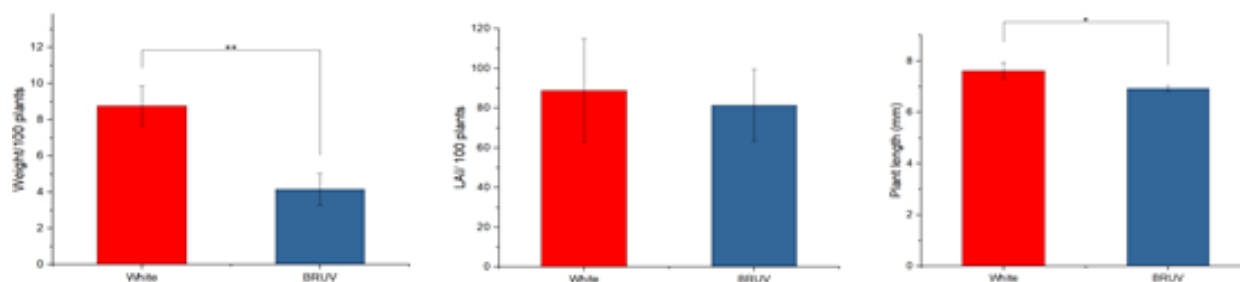


Fig. 5. Suprafata foliara, masa si inaltimea plantulelor de quinoa cultivate

De asemenea, s-a analizat conținutul de polifenoli totali, precum și conținutul anumitor acizi fenolici, de importanță economică și cu rol în menținerea sănătății. Pentru astfel de analize, s-au realizat extracte hidroalcoolice, astfel: plantele s-au recoltat, s-au cântărit și s-au uscat timp de 24 de ore la 50°C. După uscare, s-a cântărit masa uscată. Plantele uscate s-au mojarat până la obținerea unei pulberi fine. S-au preparat extracte prin suspendarea în alcool etilic 70% v/v a masei de plantă uscată într-un raport plantă:alcool de 1:9. Extracția s-a realizat în tuburi de 15 ml din polipropilenă, timp de o oră, la temperatura de 50°C și întuneric, cu agitare la 1000 rpm. Separarea s-a realizat prin centrifugare la 4000 rpm, timp de 10 minute. Supernatantele obținute prin centrifugare s-au filtrat în vederea îndepărtării complete de sediment și s-au depozitat la 4°C și întuneric, până la efectuarea analizelor ulterioare.

*Cuantificarea conținutului total de polifenoli* s-a realizat conform metodei în plăci de microtitru. Determinarea s-a realizat prin măsurarea densității optice a soluției dată de un complex format prin reacția cu reactivul Folin-Ciocalteu, complex care absoarbe la lungimea de undă de 765 nm. Citirea s-a realizat cu ajutorul unui cititor de microplăci, BioTek Epoch 2, și a softului Gen 5 3.05. Experimentul s-a realizat în placă cu 96 godeuri. Extractele preparate conform protocolului descris anterior s-au diluat solventul utilizat la extracție, astfel: Extractele preparate din busuioc verde s-au diluat de 5 ori, iar extractele preparate din busuioc roșu s-au diluat de 10 ori. Pentru formarea complexului, în fiecare godeu s-au introdus 75 μl apă distilată, 25 μl probă diluată și 25 μl reactiv Folin-Ciocalteu. Placa s-a agitat prin mișcări orbitale și s-a incubat timp de 6 minute, pentru desfășurarea reacției. S-au adăugat câte 100 μl soluție Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%, iar după o nouă agitare liniară, placa s-a incubat la întuneric timp de 30 de minute. Ulterior, s-a realizat citirea la 765 nm. Pentru fiecare probă s-a realizat corecția citirii, prin determinarea absorbanțelor blancului și a probelor de control. Blancul s-a realizat din reactivii utilizați pentru reacție și solventul în care s-au preparat extractele. Cantitatea de polifenoli s-a exprimat în raport cu o curbă standard de acid galic, obținută prin citirea absorbantelor unor soluții standard de acid galic cu concentrații cuprinse între 12,5-200 μg/ml. Fiecare probă s-a realizat în triplicat.

Determinarea activității antioxidante s-a realizat cu ajutorul reactivului DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) în plăci de microtitru. În fiecare godeu, s-au introdus câte 200 μl soluție DPPH de concentrație 50 mmoli/L și 25 μl extract diluat/standard. Extractele preparate din busuioc verde s-au diluat de 5 ori, în timp ce extractele preparate din busuioc roșu s-au diluat de 10 ori. Placa se incubează la întuneric și se citește la 517 nm, la următoarele intervale de timp: 30 secunde, 1 minut, 2, 3, 5, 7, 9, 19, 29, 39 minute. Rezultatele s-au calculat în raport cu o curbă standard, trasată cu soluții de acid galic de concentrații cuprinse între 6,25-100 μg/ml.



Rezultatele indică faptul că, folosind **compoziția spectrală selectată**, cantitatea de polifenoli totali a crescut, atât la plantule de busuioc (Tab. 3), cât și la cele de quinoa (Fig. 6).

*Tabel 3. Conținutul total de polifenoli la plantule de busuioc roșu și verde (literele diferite în cadrul aceleasi coloane indica semnificație statistică, pentru  $p < 0.05$ )*

Soi	Fertilizare	Spectru	Polifenoli totali ( $\mu\text{g EAG/g}$ planta uscată)	Activitate (% inhibiție)
Green	Water	BRUV	3739.1 <sup>b</sup> ±202.11	88.08±1.71 <sup>a</sup>
		White	3846.48 <sup>b</sup> ±200.94	88.19±4.83 <sup>a</sup>
	Fertilizer	BRUV	5739.56 <sup>b</sup> ±313.12	85.28±1.54 <sup>a</sup>
		White	4858.96 <sup>b</sup> ±264.71	81.4±3.85 <sup>a</sup>
Red	Water	BRUV	8194.1 <sup>ab</sup> ±476.49	86.96±3.97 <sup>a</sup>
		White	7219.1 <sup>ab</sup> ±425.58	92.73±1.8 <sup>a</sup>
	Fertilizer	BRUV	14063.79 <sup>a</sup> ±755.69	87.84±1.26 <sup>a</sup>
		White	13145.41 <sup>a</sup> ±768.87	92.33±1.46 <sup>a</sup>

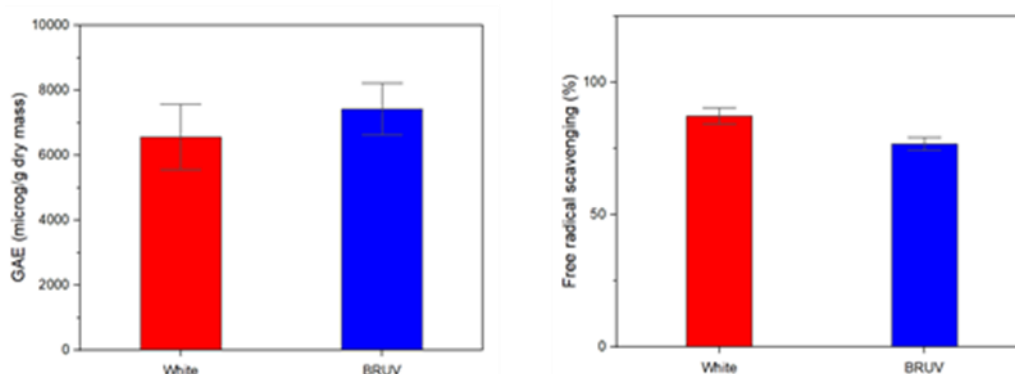


Fig. 6. Conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă la plantule de quinoa

Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici din probe au fost efectuate pe un HPLC Waters 2695e Alliance sistem cuplat cu detector PDA 298. Cromatogramele rezultate au fost procesate un software-ul Empower. Separarea s-a realizat pe coloana Waters XBridge Coloana C18 (50 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ), menținută la 30°C. Faza mobilă A a constat într-o soluție de 0,1 % TFA în apă, în timp ce pentru faza mobilă B a fost o soluție de 0,1 % TFA în acetonitril. Programul de gradient a fost: 0–4 min 100% (A), 5–20 min 98% (A), 27–30 min 96% (A), 32–35 min 90% (A), 40–45 min 82 % (A), 50–53 min 0% (A), 55–60 min 100% (A). Debitul a fost stabilit la 0,7 mL/min și volumul de injecție a fost de 20  $\mu\text{L}$ . Analizele HPLC/DAD au efectuat monitorizarea lungimii de undă de 280 nm. Identificarea compușilor fenolici a fost realizată prin compararea timpului de reținere cu standardele disponibile. Cuantificarea a fost efectuată prin curbe standard, obținute prin reprezentarea grafică a zonelor vârfurilor HPLC față de concentrații (pg/ml) ( $r_2 > 0,99$ ) (Fig 7, 8).

**Pe baza rezultatelor obținute, s-a optimizat protocolul de cultivare**, folosind compoziția spectrală a luminii cea mai avantajoasă pentru sinteza de compuși fenolici, în paralel cu introducerea fertilizării prin sistemul de irigare automat. Totodată, s-a ajustat timpul de expunere la radiație luminoasă, pentru a stimula maxim producția de substanțe fenolice, **protocolul optimizat fiind livrat, anexa la acest raport.**

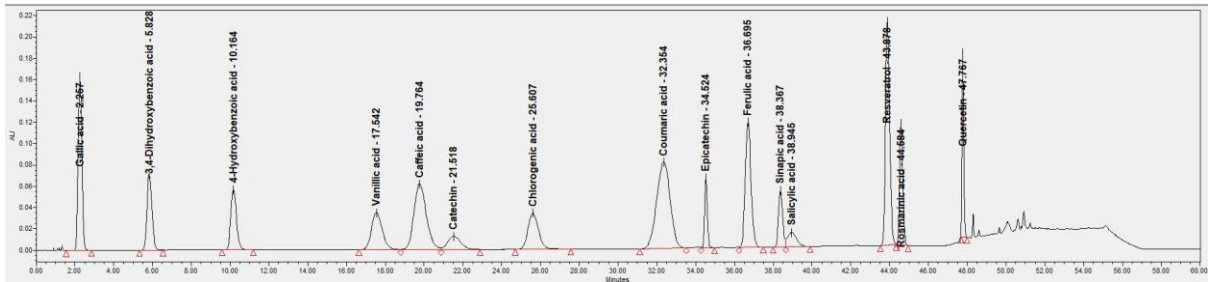


Fig. 7. Cromatograma pentru curba standard in analize de compusi fenolici prin HPLC

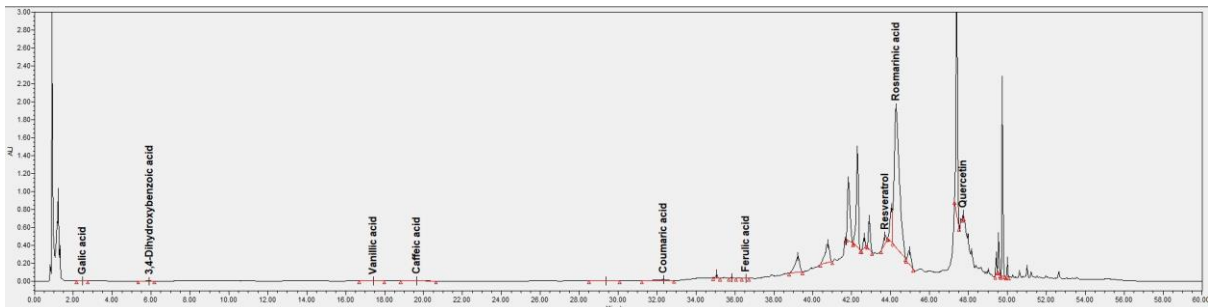


Fig. 8. Cromatograma exemplu, obtinuta pentru extracte de busuioc rosu, analiza HPLC

Rezultatele indica faptul ca, folosirea compozitiei spectrale selectate, in combinatie cu fertilizarea, a dus la o sinteza mai ridicata de acizi fenolici, cu precadere rosmarinic, dar si cumaric sau ferulic (Fig. 9)

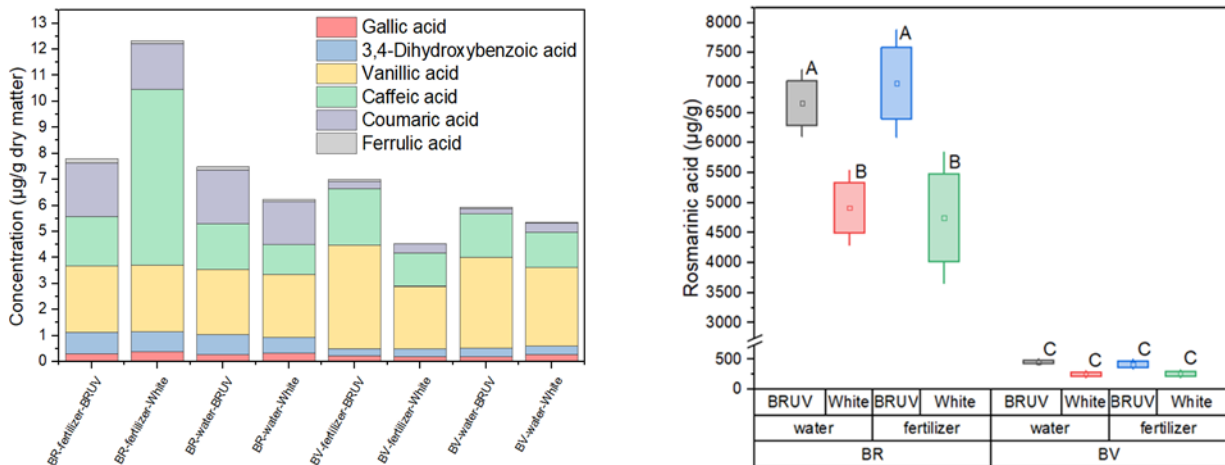


Fig. 9 Continutul de acizi fenolici selectati (stanga) si acid rosmarinic (dreapta) in plantule de busuioc

## 2.2 Caracterizarea fiziologica si moleculara a mecanismelor – indeplinit 100%

Pentru a identifica modul in care compozitia spectrala poate influenta sinteza de compusi fenolici, s-au analizat procese fiziologice precum fluorescenta clorofiliana si acumulare de clorofila, in paralel cu cuantificarea expresiei genice pentru o serie de gene selectate, cunoscute a fi implicate in sinteza acestor compusi. Totodata, s-a evaluat impactul variatiei luminii asupra unei enzime de stress oxidativ, anume peroxidaza.

*Fluorescența plantelor* s-a măsurat cu ajutorul fluorimetrului FMS 2+ Hansatech Instruments. Cablul cu fibră optică al instrumentului s-a poziționat la o distanță de aproximativ 1 cm față de probă. S-au realizat 12 măsurători pentru fiecare specie și condiție de creștere. Pentru fiecare probă s-a calculat media valorilor obținute. Determinarea conținutului de clorofilă s-a realizat utilizând un clorofilmetru portabil, de tip Omniscience CCM-200, care cuantifică clorofila nedistructiv, pe baza spectrofotometrică. Pentru analize statistice, s-au măsurat câte 20 de plantule/soi/condiție tratament.

S-a observat faptul că plantulele de busuioc, dar și cele de quinoa, au înregistrat mici variații în ceea ce privește fluorescența clorofiliană, indicând o funcționare corespunzătoare a aparatului fotosintetic, chiar și sub lumina cu compoziție spectrală modificată (Tab. 4, 5). Totodată, cantitatea de clorofilă a crescut sub această lumina, comparativ cu cea albă, probabil ca adaptare pentru o mai bună captare a energiei luminoase.

*Tabel 4. Parametrii aparatului fotosintetic la plantule de busuioc*

Soi	Fertilizare	Tratament	F <sub>s</sub>	F <sub>m</sub> '	Fluorescența	Clorofila (AU)
Green	Water	BRUV	474.63 <sup>a</sup> ±17.32	2106.89 <sup>ab</sup> ±72.83	0.78 <sup>ab</sup> ±0.01	6.33 <sup>a</sup> ±0.28
		White	539.99 <sup>a</sup> ±21.1	2245.66 <sup>a</sup> ±80.99	0.77 <sup>b</sup> ±0.01	5.16 <sup>a</sup> ±1.91
	Fertilizer	BRUV	561.67 <sup>a</sup> ±89.45	2288.25 <sup>ab</sup> ±343.99	0.76 <sup>ab</sup> ±0.02	-
		White	568.34 <sup>a</sup> ±25.77	2378.59 <sup>a</sup> ±99.4	0.77 <sup>ab</sup> ±0.01	-
Red	Water	BRUV	287.67 <sup>b</sup> ±16.19	1288.27 <sup>c</sup> ±64.63	0.79 <sup>a</sup> ±0.01	5.97 <sup>a</sup> ±0.37
		White	321.5 <sup>b</sup> ±16.79	1388.1 <sup>c</sup> ±54.73	0.78 <sup>ab</sup> ±0.01	3.22 <sup>b</sup> ±0.37
	Fertilizer	BRUV	415.59 <sup>ab</sup> ±20.99	1652.67 <sup>bc</sup> ±90.88	0.75 <sup>b</sup> ±0.01	-
		White	505.34 <sup>a</sup> ±27.53	2083 <sup>a</sup> ±133.11	0.76 <sup>ab</sup> ±0.01	-

*Tabel 5. Parametrii aparatului fotosintetic la plantule de quinoa*

Parametru	Treatment	
	BRUV	White
Chlorophyll (AU)	3.889±0.163 <sup>a</sup>	2.692±0.077 <sup>b</sup>
F <sub>s</sub>	395.97±15.4 <sup>a</sup>	266.82±7.16 <sup>b</sup>
F <sub>m</sub> '	1622.63±55.85 <sup>a</sup>	1249.23±29.84 <sup>b</sup>
ΦPSII	0.76±0.01 <sup>a</sup>	0.79±0.01 <sup>b</sup>

Determinarea activității enzimice: pentru determinarea activității enzimice s-a utilizat kit-ul de reactivi Peroxidase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich). Peroxidaza este o enzimă din sisteme biologice, care utilizează peroxidul de hidrogen pentru oxidarea diferitelor



substraturi. Procedura se bazează pe activitatea catalitică a peroxidazei în reacția dintre peroxidul de hidrogen și probă. Produsul de reacție este un compus colorimetric, a cărui concentrație este proporțională cu activitatea enzimatică. O unitate de peroxidază este definită ca fiind cantitatea de enzimă care reduce 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pe minut, la  $37^\circ\text{C}$ . Determinarea s-a realizat prin măsurare spectrofotometrică, măsurătorile fiind realizate în plăci de microtitru cu 96 godeuri. Rezultatele s-au raportat la o curbă standard trasată cu soluții de substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1 mM cu cantități de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuprinse între 0 și 5 nmoli/probă.

Analiza expresiei genice s-a efectuat asupra unor gene specifice, cunoscute ca fiind implicate în diverse puncte cheie ale caili metabolice de sinteza a fenilpropanoidelor: 4CL, hidroxicinamat-CoA ligaza, PAL, fenilalanină amoniac liază; RAS, sintaza acidului rosmarinic; TAT, aminotransfera de tirozină. Pentru analiza expresiei genice, într-o prima fază s-au extras acizii nucleici de tip mRNA, folosind kituri de extracție de la Macherey Nagel și s-a cuantificat cantitatea acestora prin fluorometrie de tip Qubit. Ulterior, folosind kitul GoTaq 1 step RT-PCR de la Promega, s-a realizat revers-transcripția ARN și amplificarea, cu primeri specifici, și captarea fluorescenței, folosind echipamentul QuantStudio 5. Pe baza rezultatelor obținute, s-a calculat expresia genică relativă, raportată la o genă de referință (COMT, O-metiltransferaza acidului cafeic), folosind tehnica de calcul de tip  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Rezultatele au arătat că, mai ales la soiul de busuioc roșu, genele analizate au înregistrat o creștere a nivelului de expresie genică, de până la 4 ori, în timp ce, la soiul verde, PAL a înregistrat o creștere de 6 ori a expresiei (Fig. 10).

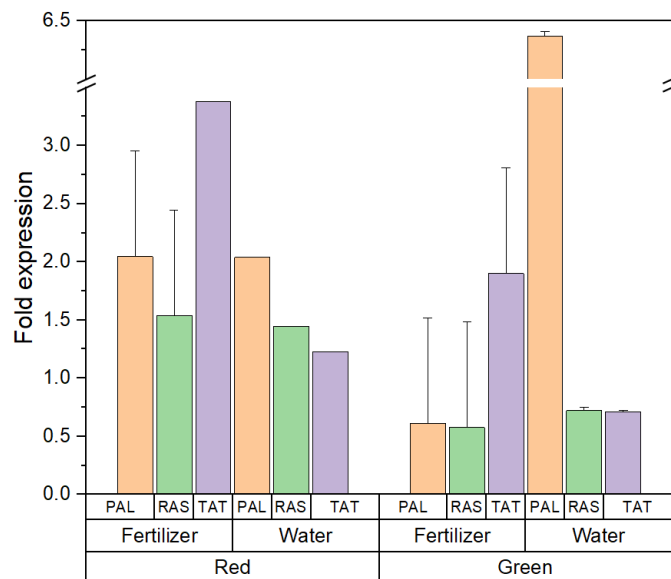


Fig. 10. Nivelul expresiei genice pentru gene selectate din calea de sinteza a acizilor fenilpropanoidici, prin tehnica qRT-PCR

### 2.3. Modelare și validare experimentală – îndeplinit 100%

În cadrul acestei activități, s-au aplicat metode statistice pentru a determina dacă rezultatele obținute sunt valide științific. În acest sens, datele obținute din analizele morfometrice și cele de cuantificare a biomasei, au fost introduse în algoritmi de calcul statistic, care au inclus:

analiza normalitatii distributiei datelor, analiza valorilor extreme, analiza variantei – ANOVA, urmata de teste post-hoc, precum si analiza multifactoriala, pentru a identifica cele mai bune combinatii de spectru luminos – fertilizant pentru cresterea plantulelor. Astfel, s-au obtinut valori semnificativ diferite intre variantele experimentale in ceea ce priveste cresterea plantulelor, si, totodata, semnificatie statistica pentru  $p < 0.05$  si  $p < 0.01$ .

**Model de analiză statistică multivariată:** în urma analizelor ce au inclus spectrul luminos folosit și regimul de fertilizare, s-a selectat Varianta 1 ca fiind cea mai potrivita pentru cultivare ulterioara si analize asociate. Din acest punct de vedere, ecuatia ce descrie variabila polifenoli, în funcție de regimul de iluminare și cel de fertilizare este:

$$\text{Polifenoli} = 7707 + 1021 \text{ Fert\_regime\_Fertilizer} - 1021 \text{ Fert\_regime\_Water} + 1996 \text{ Treatment\_V1} - 205 \text{ Treatment\_V2} - 302 \text{ Treatment\_V3} - 1488 \text{ Treatment\_V4}$$

Totodată, cantitatea de polifenoli sintetizată, în funcție de interacțiunile dintre compoziția spectrală și fertilizare, arată că tratamentul V1, în combinație cu fertilizarea este cel mai eficient (Fig. 11, 12). Prin analize de optimizare a răspunsului de suprafață, tratamentul de lumină V1, în combinație cu fertilizarea a fost selectat (Fig. 13).

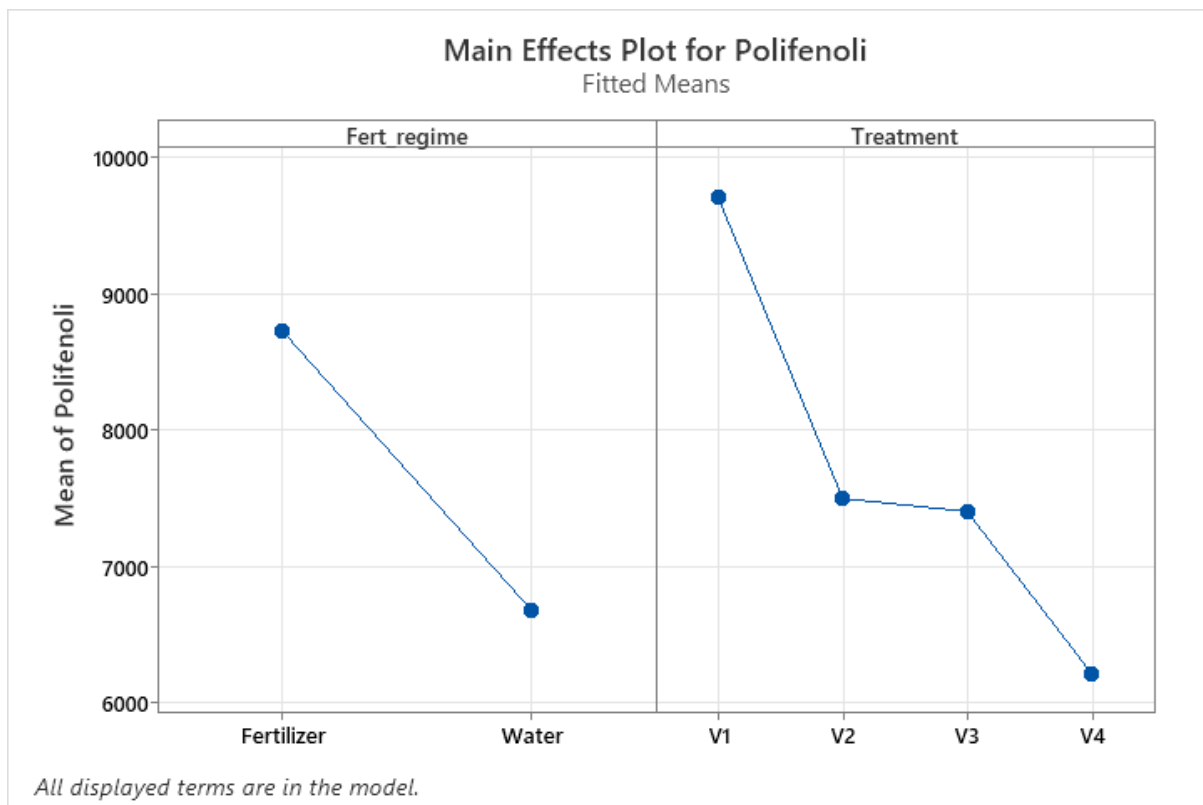


Fig. 11. Analiza efectelor principale pentru fertilizare și, respectiv, regim de iluminare

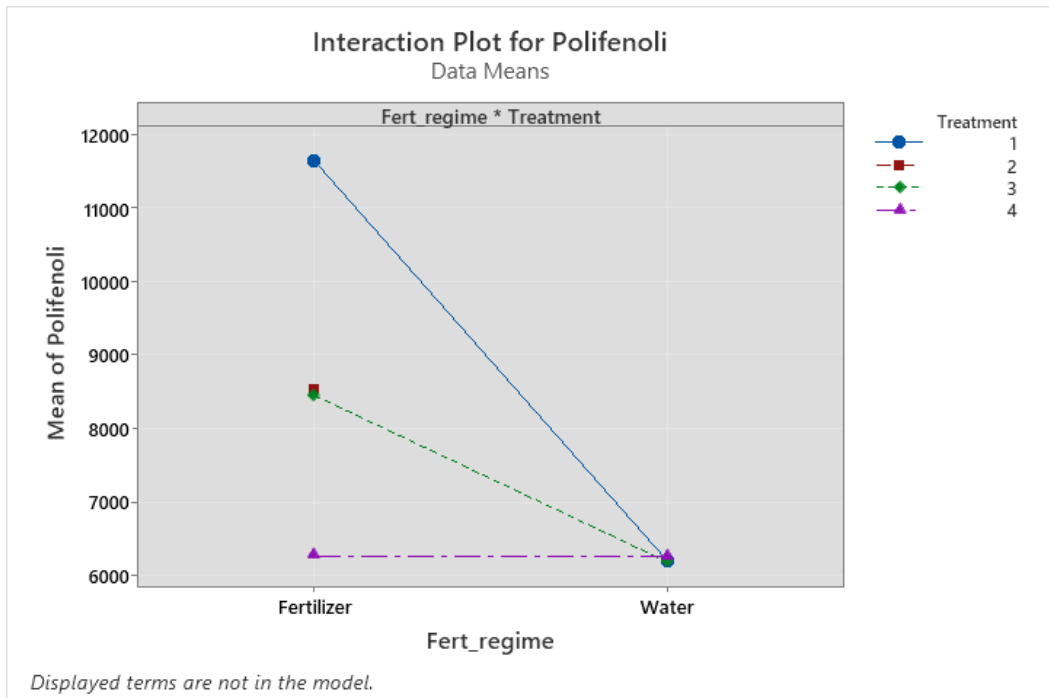


Fig. 12. Analiza interacțiunilor spectru luminos-fertilizare pentru Ocimum basilicum

### Response Optimization: Polifenoli, Masa proaspata 20 plantule (g)

#### Parameters

Response	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Importance
Polifenoli	Maximum	2567.68	23183.1		1	1
Masa proaspata 20 plantule (g)	Maximum	0.42	0.9		1	1

#### Solution

Masa proaspata 20 plantule						
Solution	Fert_regime	Treatment	Polifenoli Fit	Masa proaspata 20 plantule (g) Fit	Composite Desirability	
1	Fertilizer	V1	10724.2	0.649814	0.447170	

#### Multiple Response Prediction

Variable	Setting	Response	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
Fert_regime	Fertilizer	Polifenoli	10724	897	(8959, 12490)	(267, 21182)
Treatment	V1	Masa proaspata 20 plantule (g)	0.6498	0.0182	(0.6140, 0.6856)	(0.4380, 0.8617)

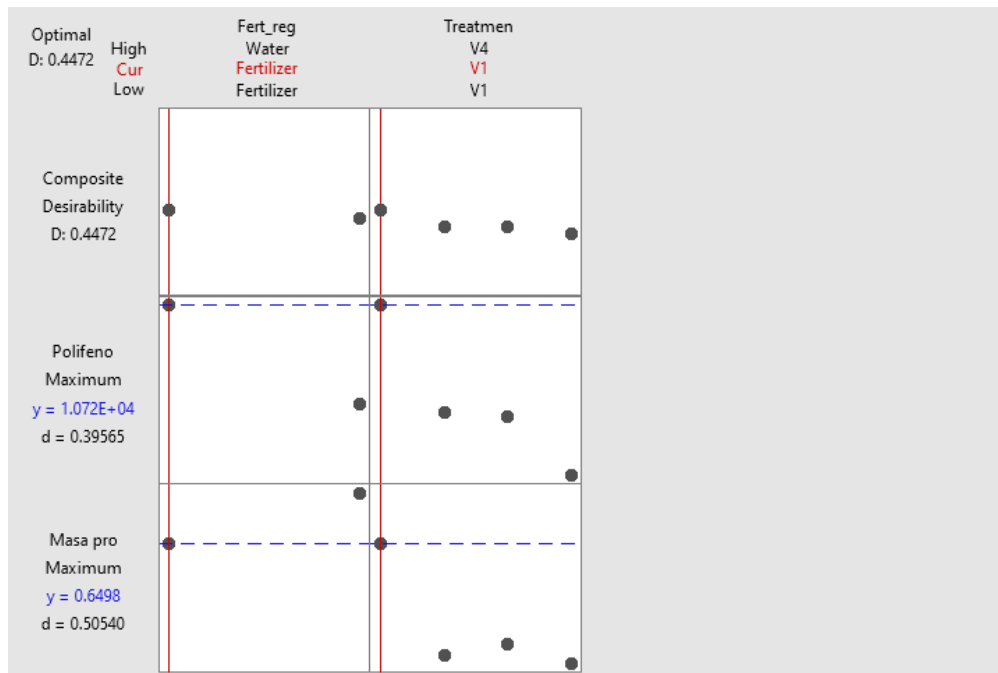


Fig. 13. Optimizarea tratamentului - creșterea cantității de polifenoli totali la *O. basilicum*

Totodata, s-a realizat validarea modelului experimental, prin transferul de echipamente la P1 și inițierea cultivării la scară mai ridicată. Într-o primă fază, plantulele au fost cultivate în camere de creștere (Fig. 11), iar ulterior, în fitotroane (Fig. 12). Analiza multifactorială pentru a identifica valorile optime ale parametrilor tehnologici a relevat faptul că ecuația ce descrie modelul de cultivare, cu valoarea maximă a cantității de polifenoli totali este:  $Polifenoli = 7707 + 1021 Fert\_regime\_Fertilizer - 1021 Fert\_regime\_Water + 1996 Treatment\_V1 - 205 Treatment\_V2 - 302 Treatment\_V3 - 1488 Treatment\_V4$



Fig. 11. Cultivare busuioc în camera de creștere pentru validarea modelului experimental



Fig. 12. Cultivare busuioc in fitotron (P1) pentru validarea modelului experimental

Pentru validarea modelului de crestere ales, s-au transferat la P1 o serie de echipamente, printre care rafturi suport, sisteme de iluminat, sisteme de irigare, vase, pamant etc. S-a implementat modelul de crestere optimizat, pe baza analizelor statistice si s-au cultivat, in cadrul a doua experimente separate, timp de 1 luna, atat plantule de busuioc, cat si de quinoa. In acest mod, s-a validat posibilitatea cultivarea plantulelor speciilor utilizate, in modelul selectat, din mediul de laborator, in cel de semiproductie, la partener.

#### 2.4. Diseminare rezultate – indeplinit 100% si suplimentar

In ceea ce priveste diseminarea rezultatelor, pe parcursul etapei s-a avut in vedere faptul ca, transmiterea rezultatelor si popularizarea acestora in randul comunitatii stiintifice este deosebit de importanta pentru avansul stiintific in domeniu. Astfel, s-au urmarit 3 directii principale: diseminarea prin intermediul evenimentelor stiintifice organizate pe domenii relevante temei de cercetare, diseminarea prin intermediul publicatiilor stiintifice (articole) si diseminarea prin intermediul site-ului web al proiectului.

- Participarea la evenimente stiintifice s-a realizat in cadrul a doua conferinte internationale:
  - 3rd International Conference on Raw Materials to Processed Foods (RP-Foods 2023), cu lucrarea “*Light spectral modulation of phenolic synthesis in Ocimum basilicum L.*”, in perioada 13-15 Mai 2023, Istanbul, Turcia
  - Conferinta Internationala SGEM Green, Viena, 2023, cu lucrarea *Light spectral modulation of phenolic synthesis in Ocimum basilicum L. Cv Red rubin*
- Publicarea sau trimiterea spre publicare de articole stiintifice s-a concretizat in redactarea a 4 manuscrise, dintre care 1 publicat, 1 acceptat pentru publicare si 2 trimise catre publicare, toate in jurnale indexate Web of Knowledge:
  - **Lobiuc A**, Pavăl N-E, Mangalagiu II, Gheorghîță R, Teliban G-C, Amăriucăi-Mantu D, Stoleru V. *Future Antimicrobials: Natural and Functionalized*

*Phenolics. Molecules.* 2023; 28(3):1114.

<https://doi.org/10.3390/molecules28031114>

- Gabriel Ciprian Teliban, Naomi-Eunicia Pavăl, Gabriela Mihalache, Marian Burducea, Vasile Stoleru, **Andrei Lobiuc**. *Physiological and molecular processes in phenolic compounds production of Ocimum basilicum L. under modulated light*, International Journal of Molecular Sciences, ijms-2764872, *under review*
  - **Andrei Lobiuc**, Stoleru Vasile, Gheorghită Roxana and Marian Burducea. The effect of municipal biosolids on the growth, physiology and synthesis of phenolic compounds in basil International Journal of Molecular Sciences, ijms- 2759339, *under review*
  - Gabriel Ciprian Teliban, Naomi-Eunicia Paval, Antoanela Patras, Monica Iavorschi, Vasile Stoleru, **Andrei Lobiuc**. *Light modulated phenolic synthesis in chenopodium quinoa microgreens as a potential biotechnological tool*, Scientific Study & Research - Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, id 574, *acceptat pentru publicare*
- Diseminarea prin intermediul site-ului a inclus restructurarea acestuia si includerea de informatii relevante, pentru publicul larg dar si pentru cercetatori

## Discutii

Compoziția spectrală a luminii joacă un rol semnificativ în fotosinteză și în funcționarea generală a fotosistemelor la plante. Diversitatea efectelor observate datorită variațiilor spectrului luminos este atribuită a trei factori principali: activarea diferiților fotoreceptori, eficiența variabilă a diferitelor componente spectrale în conducerea fotosintezei și adâncimea de penetrare a acestor componente spectrale în frunză. Se știe că diferite lungimi de undă de lumină declanșează diferiți fotoreceptori în plante, cum ar fi fitocromii pentru lumina roșie și criptocromii pentru lumina albastră, care influențează ulterior creșterea și metabolismul plantelor. Influența luminii albastre (maximum 450 nm) și a luminii roșii (maximum 660 nm) asupra creșterii și metabolismului plantelor este recunoscută, dar nu este pe deplin înțeleasă, totuși compoziția spectrală a luminii modifică expresia genelor dependente de lumină și influențează creșterea, fotosinteza și răspunsurile fiziologice la plante, așa cum se observă la răsaduri.

Se știe că luminile albastre și roșii au efecte semnificative asupra PSII și PSI. S-a demonstrat că lumina albastră, în special în intervalul 400-500 nm, îmbunătățește rata fotosintezei și deschiderea stomatică, ceea ce duce la creșterea asimilării CO<sub>2</sub>. De asemenea, s-a demonstrat că utilizarea spectrelor LED roșii și albastre crește acumularea de polifenoli, flavonoide și alte substanțe fitochimice, deși nu sporește neapărat activitatea antioxidantă, posibil din cauza alocării premature intraplantă a metabolizilor către căi alternative, precum sinteza curcuminei. Mecanismele par a fi legate de stresul, indus de intensitatea luminoasă ridicată sau de compozițiile spectrale specifice ale luminii, care activează mecanismele de răspuns ale plantelor care includ producția de compuși fenolici prin căi hormonale.



S-a demonstrat că producția de acid rosmarinic, în special, crește de câteva ori la plantele *Lamiaceae* prin expunerea la tratamente albastru:roșu:roșu îndepărtat, ca urmare a creșterii enzimelor PAL, TAT și RAS, dar cu efecte minime asupra conținutului de clorofilă, similar cu rezultatele din studiul nostru. Mecanismele par a fi un echilibru modificat al nivelurilor de transcripție ale genelor din amonte de sinteza de compusi fenolici.

Ca atare, rezultatele noastre indică faptul că producția de acizi fenolici a crescut, ca urmare a modulării luminii și datorită faptului că calitatea luminii poate fi percepută de plante ca un indiciu pentru nevoia de a proteja de excesul de energie. și că căile fenilpropanoidice sunt implicate într-o astfel de protecție. În arsenalul mecanismelor de apărare a plantelor împotriva mediilor luminoase aspre și a supraproducției de specii reactive de oxigen (ROS), compușii fenolici se remarcă prin capacitatea lor antioxidantă semnificativă. În timp ce plantele folosesc diverse strategii pentru a preveni acumularea de ROS - inclusiv straturile epidermice protectoare UV, disiparea surplusului de energie luminoasă sub formă de căldură și utilizarea compusilor fenolici ca protecție, joacă un rol esențial în procesul de detoxifiere. Acești compuși fac parte din sistemul antioxidant sofisticat al plantei care intră în acțiune sub stres pentru a neutraliza ROS. Alături de antioxidanții enzimatici precum superoxid dismutaza (SOD) și peroxidaza (POD), compușii fenolici sunt antioxidanți cu greutate moleculară mică. Aceștia funcționează împreună cu alți antioxidanți, cum ar fi tocoferolii, ascorbatul, glutatationul și carotenoizii, asigurând menținerea echilibrului între producția de ROS și eliminarea în condiții nestresante.

## Concluzie

Compoziția spectrală a luminii este un factor critic care influențează funcționarea fotosistemelor din plante, afectând o gamă largă de procese fiziologice și de dezvoltare. Rezultatele noastre au arătat că o modulare a calității și cantității luminii, alături de fertilizarea de bază a plantelor *Ocimum basilicum* poate duce la creșteri semnificative ale producției de substanțe fenolice valoroase, în special acid rosmarinic, cu până la 25%. Mai mult, microplantele de busuioc își păstrează producția de biomasă, astfel creșterea plantelor cu spectre modificate sustine valoarea economică și nu se înregistrează stres semnificativ în plante. Amploarea influenței variației spectrului de lumină asupra vieții plantelor subliniază importanța acestui domeniu de studiu, în special în contextul iluminatului artificial în agricultură și potențialul de manipulare țintită a spectrului de lumină pentru a îmbunătăți creșterea și productivitatea plantelor.

## Bibliografie

- Lobiuc *et al.*, 'Blue and Red LED Illumination Improves Growth and Bioactive Compounds Contents in Cyanic and Cyanic *Ocimum basilicum* L. Microgreens', *Molecules*, vol. 22, no. 12, p. 2111, Nov. 2017, doi: 10.3390/molecules22122111.
- R. A. Dixon and N. L. Paiva, 'Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism.', *Plant Cell*, pp. 1085–1097, Jul. 1995, doi: 10.1105/tpc.7.7.1085.
- T. Koshihara, E. Saito, N. Ono, N. Yamamoto, and M. Sato, 'Purification and Properties of Flavin- and Molybdenum-Containing Aldehyde Oxidase from Coleoptiles of Maize', *Plant Physiol.*, vol. 110, no. 3, pp. 781–789, Mar. 1996, doi: 10.1104/pp.110.3.781.
- M. Boudet, S. Kajita, J. Grima-Pettenati, and D. Goffner, 'Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses', *Trends Plant Sci.*, vol. 8, no. 12, pp. 576–581, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.tplants.2003.10.001.

- M. Petersen, E. Hausler, B. Karwatzki, and J. Meinhard, 'Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth', *Planta*, vol. 189, no. 1, Jan. 1993, doi: 10.1007/BF00201337.
- M. Petersen *et al.*, 'Evolution of rosmarinic acid biosynthesis', *Phytochemistry*, vol. 70, no. 15–16, pp. 1663–1679, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.phytochem.2009.05.010.
- M. Kivimäenpä, A. Mofikoya, A. M. Abd El-Raheem, J. Riikonen, R. Julkunen-Tiitto, and J. K. Holopainen, 'Alteration in Light Spectra Causes Opposite Responses in Volatile Phenylpropanoids and Terpenoids Compared with Phenolic Acids in Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Leaves', *J. Agric. Food Chem.*, vol. 70, no. 39, pp. 12287–12296, Oct. 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.2c03309.
- K. Taulavuori, V. Hyöky, J. Oksanen, E. Taulavuori, and R. Julkunen-Tiitto, 'Species-specific differences in synthesis of flavonoids and phenolic acids under increasing periods of enhanced blue light', *Environ. Exp. Bot.*, vol. 121, pp. 145–150, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.04.002.
- R. Pech *et al.*, 'Regulation of Phenolic Compound Production by Light Varying in Spectral Quality and Total Irradiance', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 12, p. 6533, Jun. 2022, doi: 10.3390/ijms23126533.
- O. S. Ptushenko, V. V. Ptushenko, and A. E. Solovchenko, 'Spectrum of Light as a Determinant of Plant Functioning: A Historical Perspective', *Life*, vol. 10, no. 3, p. 25, Mar. 2020, doi: 10.3390/life10030025.
- P. Pashkovskiy *et al.*, 'Influence of Light of Different Spectral Compositions on Growth Parameters, Photosynthetic Pigment Contents and Gene Expression in Scots Pine Plantlets', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 3, p. 2063, Jan. 2023, doi: 10.3390/ijms24032063.
- G. Tarakanov *et al.*, 'Effects of Light Spectral Quality on Photosynthetic Activity, Biomass Production, and Carbon Isotope Fractionation in Lettuce, *Lactuca sativa* L., Plants', *Plants*, vol. 11, no. 3, p. 441, Feb. 2022, doi: 10.3390/plants11030441.
- R. Paradiso and S. Proietti, 'Light-Quality Manipulation to Control Plant Growth and Photomorphogenesis in Greenhouse Horticulture: The State of the Art and the Opportunities of Modern LED Systems', *J. Plant Growth Regul.*, vol. 41, no. 2, pp. 742–780, Feb. 2022, doi: 10.1007/s00344-021-10337-y.
- M. Lazzarin *et al.*, 'LEDs Make It Resilient: Effects on Plant Growth and Defense', *Trends Plant Sci.*, vol. 26, no. 5, pp. 496–508, May 2021, doi: 10.1016/j.tplants.2020.11.013.
- M. Pál *et al.*, 'Light Spectral Composition Modifies Polyamine Metabolism in Young Wheat Plants', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 15, p. 8394, Jul. 2022, doi: 10.3390/ijms23158394.
- M. J. Marchant, P. Molina, M. Montecinos, L. Guzmán, C. Balada, and M. Castro, 'Effects of LED Light Spectra on the Development, Phytochemical Profile, and Antioxidant Activity of *Curcuma longa* from Easter Island', *Plants*, vol. 11, no. 20, p. 2701, Oct. 2022, doi: 10.3390/plants11202701.
- W. Makowski *et al.*, 'Is a blue–red light a good elicitor of phenolic compounds in the family Droseraceae? A comparative study', *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 201, p. 111679, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111679.

## Sumar al progresului – etapa a II-a

În perioada etapei curente, activitățile realizate au permis îndeplinirea completă a indicatorilor asumați. Astfel, s-au întocmit următoarele **livrabile**:

- Protocol optimizat de cultivare pentru 2 specii – *Ocimum basilicum* și *Quinoa chenopodium*
- Articole publicate/trimise către publicare în reviste ISI – Web of Knowledge

**Indicatorii de rezultat** au constat în numărul de livrabile și în îndeplinirea completă a activităților prevăzute în planul de realizare, după cum urmează:

- Protocele optimizate de cultivare – 1
- Articole în reviste ISI – Web of Knowledge – 4 realizate, față de 3 asumate

- 2.1. Optimizare protocol cultivare și elicitare – **îndeplinit 100%**
- 2.2. Caracterizare fiziologică și moleculară a mecanismelor – **îndeplinit 100%**
- 2.3. Modelare și validare experimentală – **îndeplinit 100%**
- 2.4. Diseminare rezultate – **îndeplinit 100%**
  - elaborare lucrări științifice – **îndeplinit 100%**
  - actualizare site – **îndeplinit 100%**

Adițional, s-a întocmit un model de analiză statistică multivariată, conform diagramei Gantt, inclus în RST

**Diseminarea rezultatelor** s-a făcut prin intermediul a 2 conferințe internaționale: 3rd International Conference on Raw Materials to Processed Foods (RP-Foods 2023), în perioada 13-15 Mai 2023, Istanbul, Turcia și Conferința Internațională SGEM Green, Viena, 2023, cu lucrări la care sunt autori membrii echipei, atât de la CO, cât și de la P1. Totodată, s-a actualizat site-ul proiectului cu activitățile și rezultatele din etapă.

## Rezumat executiv

În perioada aferentă raportării, s-au realizat toate activitățile prevăzute în planul de realizare, ceea ce a condus la îndeplinirea indicatorilor - **optimizarea** protocolului de cultivare a microplantulelor din 2 specii: *Ocimum basilicum* și *Chenopodium quinoa* și **diseminarea rezultatelor**. Protocolul optimizat permite obținerea de microplantule cu conținut sporit de substanțe fenolice. Concret, s-au realizat următoarele activități:

**Optimizare protocol cultivare și elicitare:** S-au conceput o serie de programe de iluminare cu compoziție spectrală diferită, sub care microplantulele au fost cultivate, în paralel cu spectru complet – lumină albă. Pentru fiecare program, s-au realizat măsurători morfometrice și biochimice, selectându-se, programul ce a condus la cele mai mari cantități de compuși fenolici. De asemenea, s-a introdus regim de irigare automată.

**Caracterizare fiziologică și moleculară a mecanismelor:** Pentru programul selectat, s-a reluat cultivarea plantulelor la scară extinsă (prin utilizarea unui număr dublu de echipamente de iluminat). La aceste plantule, s-au realizat analize detaliate cu privire la cantitatea sintetizată de compuși fenolici specifici (acid dihidrobenzoic, acid galic, acid cafeic, acid cumaric, acid vanilic virgula acid rozmarinic), prin tehnica HPLC. În paralel, s-a analizat starea fiziologică a plantulelor, prin cuantificarea fluorescenței clorofilene, a observarea histologică a țesuturilor foliare și cuantificarea unor enzime de stress oxidativ. Totodată, s-au cuantificat nivelurile de expresie genică pentru o serie de gene implicate în căile de sinteză a compușilor fenolici, prin tehnica qRT-PCR.

**Modelare și validare experimentală:** Datele obținute la activitățile anterioare au fost supuse unei analize factoriale multivariate, ce a luat în calcul intensitatea luminoasă specifică a unor lungimi de undă, timpul de expunere la lumină, precum și prezența fertilizanților la irigare. De asemenea, datele obținute cu privire la parametrii fiziologici și genetici au fost analizate statistic, pe baza lor fiind stabilite relațiile dintre variabile, în vederea modelării efectului compoziției spectrale asupra creșterii plantelor și a sintezei de acizi fenolici.

**Rezultatele** principale au arătat creșteri a procesului de sinteză de până la 25%, în special pentru acidul rozmarinic, compus cu deosebită valoare economică. Ca mecanism molecular, s-au constatat stimulări semnificative ale expresiei genice, în special la enzimele fenilalanin amoniac liază (PAL) și tirozinaminotransferază (TAT). Totodată, plantele au menținut statusul fiziologic normal, fără un stress semnificativ la nivel tisular sau al fotosistemelor.

**Rezultatele au fost diseminate** prin participarea la **2 conferințe internaționale**, ce au abordat teme din domeniul biochimiei și, în particular, al fitochimiei, precum și din domeniul biotehnologiilor. Totodată, s-a publicat 1 articol în revistă indexată Web of Knowledge (factor de impact 4,6) și s-au trimis alte 3 articole pentru publicare în reviste Web of Knowledge, dintre care 1 acceptat pentru publicare și 2 articole în recenzie. De asemenea, a fost actualizat site-ul phenolight.usv.ro.

Director proiect

Lobiuc Andrei