



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ  
VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE AGRICULTURĂ

**REZUMAT  
TEZĂ DE ABILITARE**

**SUMMARY  
HABILITATION THESIS**

Prof. univ. dr. ing. Camelia SAVA SAND

CLUJ-NAPOCA

2016



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ  
VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE AGRICULTURĂ

**CONTRIBUȚII ȘTIINȚIFICE ÎN  
DOMENIUL ECOFIZIOLOGIEI  
VEGETALE APLICATE**

**SCIENTIFIC CONTRIBUTION IN APPLIED  
PLANT ECO-PHYSIOLOGY**

Prof. univ. dr. ing. Camelia SAVA SAND

CLUJ-NAPOCA

2016

*Marile realizări sunt create nu prin putere, ci prin perseverență*

*Dr. Samuel Johnson  
Pembroke College, Oxford 1709-1784*

## CUPRINS

REZUMAT	5
ABSTRACT	11
CAPITOLUL I - Realizările științifice, profesionale și academice – fundament al elaborării tezei de abilitare	17
1.2. Studii și formare profesională	17
1.2. Activitatea didactică	18
1.3. Activitatea publicistică	20
CAPITOLUL II - Activitatea de cercetare științifică	31
2.1. Obținerea de genotipuri valoroase la <i>Gentiana lutea</i> L. prin culturi <i>in vitro</i>	31
2.1.1. Ecologia și aria de răspândire a speciei <i>Gentiana lutea</i> L. în țara noastră	33
2.1.2. Studii privind materialul de înmulțire la <i>Gentiana lutea</i> L.	37
2.1.3. Studii privind multiplicarea <i>in vitro</i> la <i>Gentiana lutea</i> L.	40
2.1.4. Studii privind conținutul în principii active la genotipuri de <i>Gentiana lutea</i> L. provenite din flora spontană și din culturi <i>in vitro</i>	46
2.1.5. Studii de analiză macroscopică la plantele de gențiană	49
2.2. Identificarea genotipurilor valoroase de <i>Angelica archangelica</i> L. aflate în cultură și proceduri de înmulțire	51
2.2.1. <i>Angelica archangelica</i> L. ca plantă medicinală	51
2.2.2. Ecologia și distribuția speciei <i>Angelica archangelica</i> L.	52
2.2.3. Utilizarea plantei de <i>Angelica archangelica</i> L.	57
2.2.4. Protocol de lucru pentru identificarea genotipurilor valoroase la <i>Angelica archangelica</i> L.	58
2.2.5. Studii de laborator privind influența mediului de cultură și a tipului de explant în procesul de multiplicare <i>in vitro</i> a speciei <i>Angelica archangelica</i> L.	59
2.2.6. Analizele chimice efectuate la nivelul plantelor de <i>Angelica archangelica</i> L. pentru identificarea genotipurilor valoroase din punctul de vedere al conținutului acestora în principii active	63
2.3. Identificarea de noi resurse genetice rezistente la secetă și aciditate, la plantele furajere perene de pajiști	72
2.3.1. Caracterizarea speciilor de plante furajere studiate	74
2.3.2. Cerințele ecologice ale speciilor luate în studiu	78
2.3.3. Testarea reactivității explantelor pe medii cu compoziție chimică diferită la <i>Festuca arundinacea</i> , <i>Festuca pratensis</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> și <i>Trifolium repens</i> .	80
2.3.4. Testarea reactivității diferitelor tipuri de explante prelevate la <i>Festuca arundinacea</i> , <i>Festuca pratensis</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> și <i>Trifolium repens</i> .	82
2.3.5. Aclimatizarea plantelor regenerare <i>in vitro</i> și înființarea loturilor experimentale cu material săditor obținut <i>in vitro</i> și prin proceduri clasice	87
2.3.6. Testarea în condiții de aciditate ridicată și secetă a solului, a gramineelor perene de pajiști cu material săditor obținut <i>in vitro</i> și prin proceduri clasice	90
2.3.7. Testarea gramineelor furajere perene care trăiesc în condiții de secetă accentuată	107
CAPITOLUL III - Planul de dezvoltare a carierei profesionale, științifice și academice ulterioare obținerii abilitării	111
3.1. Planul de dezvoltare a activității didactice	111
3.2. Planul de dezvoltare a activității științifice și de cercetare	113
Referințe bibliografice	117

## TABLE OF CONTENTS

REZUMAT	5
ABSTRACT	11
CHAPTER I – Scientific, professional and academic achievements – basis for habilitation thesis development	17
1.2. Studies and professional training	17
1.2. Educational activity	18
1.3. Publication activity	20
CHAPTER II – Scientific activity	31
2.1. Valuable genotypes obtaining using <i>in vitro</i> techniques for <i>Gentiana lutea</i> L	31
2.1.1. Ecology and distribution of <i>Gentiana lutea</i> L. in our country	33
2.1.2. Studies regarding the seedlings for <i>Gentiana lutea</i> L.	37
2.1.3. Studies regarding the multiplication material for <i>Gentiana lutea</i> L.	40
2.1.4. Studies regarding the active principles content in genotypes of <i>Gentiana lutea</i> L. originating from the wild and from <i>in vitro</i> culture	46
2.1.5. Studies regarding the macroscopic analysis in gentian plants	49
2.2. The identification of valuable genotypes of <i>Angelica archangelica</i> L. cultivated and multiplication methods	51
2.2.1. <i>Angelica archangelica</i> L., as a medicinal plant	51
2.2.2. Ecology and distribution of <i>Angelica archangelica</i> L.	52
2.2.3. Plant uses for <i>Angelica archangelica</i> L.	57
2.2.4. Protocol for the identification of valuable genotypes of <i>Angelica archangelica</i> L.	58
2.2.5. Laboratory studies regarding the culture media influence and explant type for <i>in vitro</i> microporpagation of <i>Angelica archangelica</i> L.	59
2.2.6. Chemical analysis for <i>Angelica archangelica</i> L. plants for the identification of valuable genotypes regarding active principles content	63
2.3. The identification of new genetic resources resistant to drought and acidity for fodder perennial plants	72
2.3.1. Characterization of the studied fodder plant species	74
2.3.2. Ecological requirements for the studied species	77
2.3.3. Testing the reactivity on culture media with different chemical composition on <i>Festuca arundinacea</i> , <i>Festuca pratensis</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> și <i>Trifolium repens</i> .	80
2.3.4. Testing the reactivity of different explants originating from <i>Festuca arundinacea</i> , <i>Festuca pratensis</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> și <i>Trifolium repens</i> .	82
2.3.5. Acclimatation of <i>in vitro</i> plants and test fields starting using seedlings originating both from <i>in vitro</i> and based on classical methods	87
2.3.6. Testing high acidity and soil drought in perennial grasses for pastures using seedlings originating from <i>in vitro</i> and based on classical methods	90
2.3.7. Testing perennial grasses for pastures that are living in extremely high drought conditions	107
CHAPTER III - The planning for professional, scientific and academic career development after habilitation will be granted	111
3.1. Planning for didactic activity	111
3.2. Planning for research and academic activity	113
References	117

## REZUMAT

Teza de abilitare a subsemnatei, Camelia SAVA SAND, profesor dr. la Universitatea “Lucian Blaga” din Sibiu intitulată ”CONTRIBUȚII ȘTIINȚIFICE ÎN DOMENIUL ECOFIZIOLOGIEI VEGETALE APLICATE” cuprinde activitatea științifică, academică și profesională pe care am desfășurat-o după obținerea titlului de doctor în ”Agronomie” în anul 1995. Teza depusă în vederea obținerii abilitării, cuprinde pe lângă o sinteză a cercetărilor desfășurate de mine, și aspecte privind evoluția în carieră precum și planurile de perspectivă pe care le am în vedere în dezvoltarea mea viitoare, rezultat al cercetărilor interdisciplinare desfășurate în domeniile educației și cercetării științifice. Cercetări de graniță care au adus la un numitor comun elementele fundamentale ale studiilor de ecofiziologie vegetală, cu cele de biotehnologie vegetală și de tehnologii agricole moderne, care în ultima perioadă au fost orientate în direcția aplicării principiilor moderne de dezvoltare durabilă.

Lucrarea este împărțită în trei părți distincte și anume: prima parte cuprinde realizările profesionale, în partea a 2-a este prezentată sinteza activității de cercetare științifică cu rezultate publicate în reviste de specialitate, iar partea a 3-a este rezervată planurilor și strategiilor de dezvoltarea a carierei profesionale a subsemnatei, respectiv ale celor de cercetare și de activitate didactică în domeniul fiziologiei vegetale, cu aplicații în biotehnologia vegetală, în agricultura modernă axată pe aspecte de ecofiziologie.

De-a lungul celor 21 de ani de activitate, după obținerea titlului de doctor preocupările mele științifice fiind îndreptate înspre aplicabilitatea elementelor teoretice din domeniul fitofiziologiei, în cel al biotehnologiei vegetale orientată spre protecția mediului și conservarea durabilă a plantelor medicinale din flora spontană, în vederea introducerii în cultură a celor mai valoroase genotipuri din punct de vedere al potențialului agricol, farmaceutic și economic. Astfel, pentru asigurarea conservării și utilizării durabile a speciilor vegetale am luat în studiu mai multe specii din flora spontană, recunoscute pentru potențialul lor farmaceutic. În prezenta teză voi prezenta rezultatele cercetărilor la două dintre specii, respectiv: *Gentiana lutea* L. și *Angelica archangelica* L. O altă preocupare a mea a fost aceea de a identifica prin metode biotehnologice noi resurse genetice rezistente la secetă și la aciditatea solului la plantele furajere perene de pajiști, în scopul valorificării în viitor a suprafețelor agricole afectate de aceste fenomene.

Deci, cele mai importante direcții de cercetare pe care le-am abordat în decursul timpului s-au axat pe problematica:

- ✓ identificării de noi resurse, cu potențial competitiv intern și internațional în contextul dezvoltării durabile și a conservării biodiversității, prin selecționarea și utilizarea de genotipuri valoroase de *G. lutea* L. folosind tehnicile de vitrocultură;
- ✓ identificarea de genotipuri valoroase de *A. archangelica* L. și multiplicarea acestora *in vitro*, în scopul valorificării superioare a lor;
- ✓ identificarea prin metode biotehnologice de noi genotipuri de plante furajere perene, de pajiști, rezistente la secetă și la aciditate în scopul cultivării lor pe terenuri afectate de aceste fenomene.

În urma experiențelor efectuate am reușit să public o serie de studii comparative referitoare la calitățile principiilor active prezente în plantele medicinale recoltate din flora spontană în raport cu cele existente în plantele medicinale cultivate, a căror uniformitate este asigurată prin multiplicarea lor *in vitro*, materialul biologic ulterior fiind utilizat la înființarea loturilor necesare procesării industriale a plantelor medicinale. Toate studiile s-au făcut în contextul cercetărilor științifice efectuate pe plan național și internațional, scoțându-se în evidență - în mod argumentat și documentat - relevanța și originalitatea contribuțiilor personale.

Unul dintre obiectivele dezvoltării durabile este nu numai acela al producerii eficiente de material vegetal valoros, dar și acela al prelucrării și comercializării produselor agricole implicit la plantele medicinale concomitent cu protejarea resurselor naturale și asigurarea nu numai a alimentării ecologice, ci și a competitivității produselor pe piața internă și externă.

În ceea ce privește specia *Gentiana lutea* L. scopul experimentelor a fost acela de a identifica genotipuri valoroase din flora spontană și de a obține cu ajutorul culturilor *in vitro* clone uniforme din punct de vedere al conținutului în principii active cu exemplarele donatoare de explante selectate de noi ca fiind valoroase din acest punct de vedere.

*G. lutea* este o plantă perenă care poate trăi chiar și peste 50 de ani, ea este foarte adânc înrădăcinată, este răspândită în etajele alpin și sub-alpin pe versanții însoriți care beneficiază de precipitații cuprinse între 600-800 mm, solurile în general sunt alcaline, umede, bine drenate, calcaroase pe pajiști sau pe structurile stâncoase. Pornind de la sămânță plantele de *G. lutea* au nevoie de cca. 3-7 ani pentru a atinge stadiul de înflorire. În unele țări din Europa (Franța, Germania) această plantă este cultivată ca specie medicinală.

În țara noastră *G. lutea* este considerată una dintre „podoabele” munților noștri, fiind întâlnită în Carpații Orientali și Meridionali. În studiile noastre am identificate cele mai bogate bazine de creștere spontană a acestei specii în Masivul Ciucaș și în Masivele calcaroase ale M-ților Bârsei – Piatra Mare (1849

m), Postăvarul (1802m) și Piatra Craiului (2239m). Materialul biologic din flora spontană utilizat pentru experimentări l-a constituit cel recoltat din Masivul Postăvarul.

O particularitate importantă întâlnită la această specie este aceea că sămânța germinează foarte greu, ceea ce ne-a impus găsirea de metode neconvenționale vegetative de înmulțire a acestei plante.

Culturile *in vitro* reprezintă tehnica cea mai modernă și mai eficientă care permite clonarea cu ușurință a materialului vegetal, care posedă o valoare ameliorativă ridicată, păstrând intacte calitățile genetice ale plantelor mame donatoare de explante.

În ceea ce privește culturile de țesuturi vegetale, până în prezent se cunoaște că materialul multiplicat prin tehnici de vitroculturi își menține caracteristicile inițiale ale plantei donor. Acest fapt a fost dovedit pe parcursul multiplicării genotipurilor valoroase din punctul de vedere al conținutului în principii active, materialul de plantat rezultat neschimbându-și identitatea și omogenitatea genetică. În aceste sens, am studiat conținutul în principii active ale diverselor genotipuri identificate de noi în flora spontană și am stabilit tehnologia specifică de multiplicare a acestei specii *in vitro*.

Mai mult decât atât, câmpul de gențiană, obținut din material săditor, generat *in vitro*, a dovedit că ex-vitroculturile dețin proprietăți superioare plantelor din flora spontană, în ceea ce privește uniformitatea conținutului de principii active.

Un alt element de noutate și de complexitate a cercetărilor noastre l-a constituit studiul interacțiunilor dintre plantele de gențiană și complexul factorilor ambientali ai agro-ecosistemelor pentru utilizarea speciei ca plantă de cultură.

Pentru aceasta a fost imperios necesară prezentarea și analizarea arealului de răspândire a gențianeii pe teritoriul țării noastre, cu atât mai mult cu cât această specie a fost cuprinsă în programul de protejare ca fiind considerată o specie periclitată (Convenția privind conservarea vieții sălbatice și a habitatelor naturale din Europa sau Convenția de la Berna, 1979). O componentă esențială a activităților reale legate de protecția naturii a constituit-o și identificarea și studierea siturilor eligibile pentru includerea lor în rețeaua ecologică europeană NATURA 2000. Fie că sunt rezervații naturale sau monumente ale naturii, ariile protejate și realizarea unui management eficient a acestora devin scopuri tot mai importante, avându-se în vedere faptul că:

- ✓ ariile protejate se constituie ca exponente ale stării actuale și de perspectivă ale ecosistemelor naturale și seminaturale, ce pot fi astfel evaluate și monitorizate, putându-se în acest mod realiza o raportare a stării acestora la un moment dat. Aceasta devine o necesitate, deoarece ecosistemele naturale reprezintă componentele primordiale ale capitalului natural, ce au ca rol asigurarea resurselor și a proprietăților ce stau la baza dezvoltării socio-economice;



- ✓ prin calitățile lor, ariile protejate se constituie ca modele prin care se poate acumula informația necesară pentru asigurarea tranziției acestora spre o dezvoltare durabilă;
- ✓ aceste arii protejate pot fi considerate ca adevărate săli de clasă în aer liber, în care omul poate fi educat cu privire la rolul naturii în viața sa și, mai ales cu privire la necesitatea conservării patrimoniului natural.

Prin rezultatele obținute în activitatea de cercetare și publicate în diverse reviste de specialitate am scos în evidență încă odată faptul că, biotehnologiile moderne reprezintă o revoluție în ceea ce privește metodele fito-fiziologice de investigare a proceselor care se petrec în interiorul plantelor, precum și în tehnicile de ameliorare, cu ajutorul lor realizându-se noi genotipuri cu caracteristici performante, cu ajutorul cărora se poate reuși o îmbunătățire a conținutului în principii active în organele plantelor dar și prin multiplicarea (clonarea) acelor indivizi care sunt cei mai reprezentativi.

Cultura tipică de țesuturi vegetale presupune utilizarea - pentru vitrocultură - de explante constând din fragmente tisulare sau de celule (solitare ori în agregate celulare) care *in vitro* fiind inoculate se multiplică, generează plantule care cresc și pot fi subcultivate timp îndelungat, fie în condiții aseptice, fie – după aclimatizarea lor la viață în condiții naturale – ele pot fi plantate în teren.

Un rol important și uneori hotărâtor în alegerea naturii explantului, îl are *sezonul*, iar legat de aceasta, *stadiul* sau faza de vegetație în care se află organele donatoare de explante. Viabilitatea țesuturilor și manifestarea deplină a totipotențialității lor sunt dependente și de un anumit stadiu de dezvoltare al plantelor donatoare de explante, respectiv de prelevare și inoculare a țesuturilor într-o fază morfofuncțională optimă, în care structurile anatomice să fie în limitele posibilității de a se dediferenția (peretii celulari să nu fie puternic lignificați, certificați, mineralizați) și să conțină în celule rezerve nutritive și de hormoni, în cantități îndestulătoare, pentru a putea susține *procesele regenerative*.

Din punct de vedere fiziologic, momentul optim de prelevare a explantelor este limitat uneori numai la o anumită etapă - restrânsă ca durată - din faza de vegetație.

În comportamentul explantelor *in vitro* un rol important îl are și vârsta plantei donatoare.

O altă direcție de cercetare a fost aceea de a utiliza specia *Angelica archangelica* L., (specie deosebit de valoroasă care trebuia pusă în valoare și introdusă în cultură pe suprafețe cât mai mare) pentru a stabili un protocol de multiplicare *in vitro* și de a dovedi rolul condițiilor și a factorilor implicați în realizarea micropropagării eficiente a acestei specii, precum și rentabilizarea din punct de vedere economic în cazul propagării *in vitro* a acesteia. Materialul biologic utilizat pentru efectuarea experiențelor cu specia *A. archangelica* a fost reprezentat de populația selecționată 'De Cristian', care a fost introdusă în cultură la Brașov,

tocmai în ideea de a proteja patrimoniul floristic aflat într-o situație dificilă în ceea ce privește reprezentarea acestei specii care rămâne încă în regim de plantă protejată de lege.

Analizele s-au efectuat numai folosind material biologic prelevat din partea aeriană a plantei, deoarece prelevarea de probe din rădăcini presupunea distrugerea plantei.

Pentru evidențierea prezenței principiilor active reprezentative pentru specia *A. archangelica* s-au efectuat două tipuri de analize folosind material vegetal uscat, cu o umiditate medie de 12% și anume:

- ✓ dozarea conținutului probelor în ulei volatil - principiul activ de bază al speciei *A. archangelica* - și care are în compoziția sa chimică, în mod special, substanțe organice din clasa terpenoidelor și care deține o putere aromatizantă deosebită ce exercită o acțiune antiseptică și antispastică;
- ✓ măsurarea derivațiilor fenil-propanici, de tipul acidului cafeic și clorogenic care la specia *A. archangelica* reprezintă, de asemenea, principii totali activi foarte valoroși.

Cercetările efectuate la cele două specii de plante medicinale *G. lutea* și *A. archangelica*, introduse în cultură, au scos în evidență un fapt deosebit de important pe care prin publicarea rezultatelor l-am oferit cercetătorilor și cultivatorilor de plante medicinale, acela că există întotdeauna o corelație între caracteristicile morfologice ale exemplarelor vegetale și capacitatea de biosinteză și de acumulare a principiilor active. Această corelație, de cele mai multe ori negativă, arată că legea compensației funcționează în sensul realizării unui echilibru între cantitate și calitate, cele două elemente ale producției fiind într-un raport de compensare și de completare (de exemplu: masa medie de rădăcină per plantă se corelează negativ cu conținutul de ulei volatil din aceasta). Ca urmare a acestor constatări lucrările de ameliorare a plantelor în general și acelor medicinale și aromatice în special sunt orientate în direcția creșterii potențialului de producție al noilor genotipuri, fapt care va avea consecințe negative asupra potențialului de biosinteză și de acumulare, și invers.

Pe de altă parte, schimbările climatice și efectul lor dezastruos asupra terenurilor agricole, m-a determinat să îmi îndrept atenția spre identificarea - prin metode biotehnologice - de noi resurse genetice rezistente la secetă și la aciditate, la plantele furajere perene de pajiști în scopul valorificării suprafețelor afectate de aceste fenomene.

Regiunile de deal și de munte sunt expuse impactului schimbării climei, frecvența avalanșelor și alunecărilor de teren putându-l modifica dramatic. În contextul încălzirii globale, există o tendință, în ultimele decenii, ca iernile din România să devină mai puțin aspre, cu temperaturi mai ridicate și cu un strat de zăpadă redus, tendință care va continua și în următoarele decenii.

Conform estimărilor făcute în Raportul Grupului Interguvernamental pentru Evoluția Climatului (februarie 2007), temperatura medie globală va crește, până în

anul 2100, cu aproximativ 3°C, fapt ce va determina o declanșare timpurie a ciclului de vegetație primăvara și o prelungire a acestuia toamna (IPCC, 2007).

Sistemul Național de Monitoring a Calității solului a arătat ca circa 7,1 milioane de hectare de terenuri agricole sunt în anumite zone geografice, afectate de instalarea în sol a unui proces de “seceta frecventă”, ca factor restrictiv major de producție (ANPM, 2015).

Solurile podzolice, caracterizate prin gradul redus al fertilității naturale, din cauza unor însușiri negative ale proprietăților fizico-chimice și biologice ale acestora, ocupă chiar și în țara noastră aproximativ un sfert din suprafața arabilă a țării, îndeosebi în regiunile subcarpatice, transilvănene și cele moldovene, în depresiunile submontane din nordul țării, Piemontul vestic, podișul Sucevei, etc. (ANPM, 2015). Strâns legată de procesul de podzolire, în aceste zone se produce o acidifiere a straturilor superioare ale solului, prin îndepărtarea bazelor din mineralele primare și apoi din complexul argilo-humic. Aciditatea ridicată a solurilor podzolice, cu efecte negative asupra plantelor de cultură, este însoțită și de un deficit în elemente de nutriție, ceea ce conferă acestor soluri un grad scăzut de fertilitate.

Din cauza conținutului ridicat de argilă a solurilor acide, acestea nu pot înmagazina - nici în perioadele umede - decât o parte din apa precipitațiilor, rezervele de apă în astfel de soluri fiind insuficiente. În zonele cu soluri podzolice, creșterea animalelor a fost și trebuie să rămână cel mai important sector al agriculturii, ponderea bazei furajere fiind constituită din pajiști permanente sau pajiști semănate, care trebuie să asigure 60-65% din suprafețele culturilor perene.

Utilizarea unei germoplasme valoroase și a tehnicilor neconvenționale, biotehnologice, de selecție *in vitro*, alături de selecția efectuată în condiții dirijate de seră, precum și în condiții climatice diverse, în câmp, asigură premisele obținerii de soiuri rezistente de graminee și de leguminoase perene, de pajiști, ca o alternativă la creșterea productivității pajiștilor în condiții vitrege de viață .

Activitățile de cercetare și de dezvoltare tehnologică de mare complexitate, desfășurate în cadrul unor proiecte câștigate prin competiție la nivel național, au inclus efectuarea de cercetări fundamentale și aplicative, în scopul identificării genotipurilor valoroase la speciile luate în studiu, activități care în cazul meu au urmărit utilizarea unor tehnologii de vârf în vederea:

- ✓ testării *in vitro* a reactivității explantelor constând din semințe, respectiv din embrionii acestora pe medii cu compoziție chimică diferită, la speciile: *Festuca arundinacea*, *F. pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne* și *Trifolium repens*;
- ✓ evaluarea variabilizării productive la speciile: *F. pratensis*, *P. pratense*, *D. glomerata*, *L. perenne*, în cultură pură, în câmpuri experimentale a plantelor obținute *in vitro*;

- ✓ identificarea variabilității productive la speciile: *F. arundinacea*, *F. pratensis*, *P. pratense*, *D. glomerata*, *L. perenne*, *T. repens*, cultivate pe parcele experimentale.

În urma cercetărilor întreprinse de noi s-au obținut răspunsuri distincte la nivel interspecific și intraspecific atât în procesele de micropropagare clonală asociate cu morfogeneza vegetală *de novo* cât și în faza de aclimatizare, în fluxul tehnologic. Noi am constatat la specia *D. glomerata* aclimatizarea celui mai mare număr de plante, respectiv 240 din totalul de 418 plante regenerare *in vitro*, comparativ cu celelalte specii de graminee perene, de pajiști după cum urmează: la *F. pratensis*: 70 plante aclimatizate din 212 plante regenerare, *F. arundinacea*: 106 plante aclimatizate din 301 plante regenerare și la *L. perenne*: 32 plante aclimatizate din 150 plante regenerare (Sand *et al.*, 2009).

Cercetările realizate de către subsemnata au prezentat pe lângă caracterul de noutate și un grad ridicat de complexitate prin implicațiile tehnice, economice și sociale pe care le determină și plasează din acest punct de vedere creația românească în mișcarea de avangardă din UE.

Fiecare din tematicile de cercetare abordate de mine în prezenta teză de abilitare s-au concretizat cu proiecte de cercetare câștigate la competițiile naționale și cu peste 60 de lucrări susținute și publicate în diverse reviste de specialitate.

Toate cercetările realizate în cadrul activității de cercetare științifică, servesc ca o bază de date fito-fiziologice obținute de noi în ceea ce privește cunoașterea reactivității în regim de vitrocultură a explantelor vegetale, în funcție de condițiile adoptate pentru studiu și de varietățile utilizate ca plante mame, donatoare de explante.

În ultima parte a prezentei teze de abilitare am prezentat planul evoluție și de dezvoltarea a carierei științifice și academice.

## ABSTRACT

The thesis for habilitation undersigned by Camelia SAVA SAND, professor dr. at the University "Lucian Blaga" from Sibiu, entitled "SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS IN APPLIED PLANT ECO-PHYSIOLOGY" includes entire scientific, academic and professional activities that was undertaken after obtaining the PhD degree in "Agronomy" in 1995. The submitted habilitation thesis comprises in addition a summary of research conducted by me, and issues related to career progression and future plans that may pave the way for my further development, as a result of my carrier activity in education and scientific research. Interdisciplinary investigations brought to a common denominator the fundamentals of plant eco-physiological studies, plant biotechnology and modern agricultural technologies, that lately were directed towards applying modern principles on sustainable development.

The thesis is divided into three distinct parts, namely a first part comprising professional achievements the second is comprising scientific results obtained following the publication in scientific journals of research results, and the third part that includes plans and strategies for professional career development, respectively of that of research and teaching activities in the field of plant physiology, with applications in plant biotechnology, and modern agriculture focused on eco-physiological aspects.

Over the 21<sup>st</sup> years of intense activity, after obtaining the doctorate title, my scientific goals were oriented towards putting in practice the theoretical background from plant eco-physiology into plant biotechnology for environmental protection and sustainable conservation of medicinal plants originating from wild flora in order to introduce them into the *in vitro* culture of the most valuable genotypes in terms of agricultural, pharmaceutical and economic potentials. Thus, to ensure the conservation and sustainable use of plant species we studied several species of spontaneous recognized for their pharmaceutical potential. In the current thesis I will present results of research for two wild plant species: *Gentiana lutea* L. and *Angelica archangelica* L. Another of our concerns was to identify new genetic resources based on using biotechnological methods, drought resistant and soil acidity resistant in perennial forage pastures in order to capitalize on future affected agricultural areas.

Thus, the most important research directions that I have addressed on this occasion focused on the following issues:

- To identify new genetic resources, highly competitive at national and international level in the context of sustainable development and biodiversity conservation, through the selection and use of valuable genotypes of *G. lutea* L. using *in vitro* cultures techniques;
- To identify valuable genotypes of *A. archangelica* L. and their *in vitro* multiplication in order to assert their superior use;
- To identify through biotechnological methods of new genotypes resistant to drought and soil acidity belonging to fodder perennial grassland in order to be cultivated on affected arable land.

Following the results of these experiments we were able to publish a series of comparative studies regarding the quality of the active principles extracted from herbs harvested from the wild flora compared to those originating from cultivated medicinal plants as crops, whose uniformity is ensured by multiplying them into *in vitro* for later planting lots needed being coupled with industrial processing of medicinal plants. All studies were made in the context of scientific research conducted nationally and internationally, underlying - with arguments and documented - the relevance and originality of personal contributions.

One of the aims of sustainable development is not only that of efficient producing valuable plant material followed by agricultural products processing and marketing but also the conservation and sustainable use of natural resources and the ensuring not only of a organic supply as well as of the competitiveness of products on the internal and external market place.

Regarding the species *Gentiana lutea* L. the main purpose of the experiments was to identify the valuable genotypes within the wild flora and using *in vitro* cultures to obtain uniform clones in terms of the content in active principles for donor specimens as valuable genetic resources in this regard.

*G. lutea* is a perennial plant that can live even 50 years, it is deeply rooted, is widespread in the alpine and sub-alpine areas, on the sunny slopes, and in areas with 600-800 mm of rainfall. The preferred soils are generally alkaline, moist, well-drained, calcareous or rocky structures. Starting from seed, plants of *Gentiana lutea* L. reach maturity after approx. 3-7 years. In some European countries (i.e. France, Germany) this plant is cultivated as a crop medicinal species.

In our country *G. lutea* is still considered one of the "jewels" of our mountains, it is found in the Eastern and Southern Carpathians. In our studies we identified the richest pools of spontaneous growth of this species in the wild in the Carpathians Massif of Ciucaș and in the limestone Massifs of Bârsa - Piatra Mare (1849 m), Postăvarul (1802 m) and Piatra Craiului (2239 m). Biological material originating from the wild flora used for research was represented by that harvested from the Postavaru Massive.

An important feature of this species is found that seed germinates very hard, which has imposed finding unconventional methods such as vegetative propagation of this plant. *In vitro* cultures is the technique most modern and efficient which

allows easy plant material cloning, which possesses a high ameliorative worth preserving plant genetic qualities intact explants donor mothers.

Regarding plant tissue cultures, so far knowing that the genetic material is multiplied by *in vitro* techniques and maintains its original genetic characteristics of the plant donor. This was proved for valuable genotypes from the point of view of content in active principles, results firmly showed that they do not change their genetic identity and homogeneity. In this respect, we studied the content in active principles of different genotypes identified by us in the wild flora and set specific *in vitro* technology multiplication of this species.

Moreover, gentian field obtained from seedlings, generated *in vitro*, proved that have superior properties compared to the spontaneous flora plants, with regard to content uniformity of active ingredients.

Another element of novelty and complexity of our research was represented by studying interactions between gentian plants and agro-ecosystem components in which they will integrate after planting.

For this it was imperative to presenting and analyzing the areas of distribution of gentian our country, knowing that this species was included in the European protection program to be considered an endangered species (Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats in Europe or the Berne Convention, 1979, Berry, 2008). An essential component of actual activities related to this species conservation has been the identification and study of sites eligible for inclusion in the European ecological network NATURA 2000. Whether natural reserves or natural monuments, declaring protected areas and an efficient management will become increasingly important purposes, taking into account that:

- protected areas are considered as exponents of the current state and future of natural and semi-natural ecosystems, which can then be evaluated and monitored, and could thus achieve their condition for monitoring reporting. This becomes necessary because natural ecosystems are the primary components of natural capital, which have the role of providing resources and properties underlying socio-economic development;
- objectively, protected areas are considered as models that can garner the necessary information to ensure their transition towards sustainable development;
- these protected areas can be considered as true outdoor classrooms where man can be educated about the role of nature in his life and especially about the need to preserve natural heritage.

Modern biotechnology is a revolution in terms of developing methods for investigating the physiological plant processes that are occurring within the plant and breeding techniques. With their help it was possible to obtain new genotypes

with high performance features; it can improve the content of active ingredients within plant organs and can get thousands of individuals within a very short time.

Typical plant tissue cultures require *in vitro* cultivation of plant explants. They consist of fragments of tissues or cells (i.e. solitary or cell aggregates) which multiply *in vitro*, generates seedlings that grow and can be subcultivated for a long time both in aseptic or septic conditions after acclimatization (e.g. adaptation to natural conditions and planting in field).

An important and sometimes decisive role in choosing the nature of explants, it is the season, and connected with it, it is the stage or phase of vegetation in which the donor organs explants are. The viability of tissues and full manifestation of totipotency depends on the stage of development of plants donor explants. Thus, inocula extraction and tissues inoculation should be done in an optimal morphofunctional phase, in which anatomical structures are within the possibility of de-differentiation (cell walls are not strong lignified, waxed, mineralized) and cells contain the nutrients and hormones reserves in sufficient quantities to be able to support regenerative processes.

From physiological point of view the optimal momentum for taking explants is sometimes limited only to a certain stage (limited duration), stage of vegetation.

In the fate of explants cultivated *in vitro* have the age of the donor plant.

Another research direction pursued by us in studies with propaguli of *A. archangelica* (particularly valuable species that needs to be exploited and placed on the market and cultivated in the field as a crop species) was to investigate the conditions and environmental factors involved in achieving effective multiplication of the species of economically profitable. The biological material used to make experiences with *A. archangelica* was a selected population 'Cristian', which was introduced in field culture in Braşov, following the idea of protecting natural heritage as this species is under the national plant protected by law.

Analyses were done only with biological material taken from the aerial part of the plant because sampling roots means plant destroying. For the presence of active principles representative of *A. archangelica* were conducted two types of analysis made with dried plant material with an average humidity of 12% i.e.:

- dosing volatile oil compounds, the active core compounds of the species *A. archangelica* that is recognized especially for the content in organic substances such as terpenoids compounds with special flavouring, antiseptic and antispasmodic actions;
- measuring derivatives of phenyl-propane, caffeic and chlorogenic acid type of *A. archangelica* that also are very valuable active principles. These naturally occurring compounds have in their chemical structure, alcoholic, phenolic or carboxylic groups. Natural products containing such compounds have a remarkable cholagogue - choleric and hepatoprotective actions.



All researches conducted by us on the two medicinal plant species *G. lutea* and *A. archangelica* that have been introduced into *in vitro* culture, highlighted a very important fact based on our publications for researchers and farmers, that there is always a correlation between morphological characteristics of plant specimens and the ability in biosynthesis and accumulation of active principles. This correlation, most often negative, shows that the law of compensation works towards achieving a balance between quantity and quality, the two elements of production being in the ratio of compensation and components (e.g. average mass of roots per plant is negatively correlated with volatile oil content thereof). Following these findings the work of plant breeding in general and especially that for medicinal and aromatic plants are geared towards increasing the production potential of new genotypes, which will have negative repercussions on the active compounds biosynthesis and accumulation and vice versa.

On the other hand, climate change and their negative impact on arable land, prompted me to direct my attention toward identifying - by biotechnological methods - new genetic resources resistant to drought and soil acidity, such as fodder perennial grasslands for ecological restoration of these affected arable area.

Hilly and mountain area are also exposed to the impact of climate change, the frequency of avalanches and landslides may change dramatically. In the context of global warming, there is a tendency in recent decades, winters in Romania become less harsh, with higher temperatures and reduced snow cover, a trend that will continue in the coming decades.

According to estimates made in the Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), the average global temperature will increase until the year 2100 by about 3°C, which will trigger early plant vegetation during spring and an extension of this to long autumns.

The National Soil Quality Monitoring showed that about 7.1 million hectares of agricultural land are in geographical, soil affected by installation of a process of "frequent drought" as a major limiting factor of production.

Podzolic soils, characterized by the very low natural fertility, because of the negative traits of the physico-chemical and biological characteristics, occupies even in our country about a quarter of the arable land, especially in Carpathian, Transylvanian and Moldavian regions at the foothill lowlands of northern, western plateau of Suceava, etc. Closely linked to the podzolit in these areas occurs acidification of the upper layers of the soil by removing bases from primary minerals and then clay-humic complexes. Podzolic soil acidity is high, with adverse effects on crops, is accompanied by a deficiency in nutrition elements, which gives such a low fertility soils.

Because of the high clay content of the acidic soil, reduce their capacity of retaining water even in raining periods, water reserves in these soils will be insufficient. In areas with podzolic soils, livestock has been and must remain the

most important sector of agriculture, the share of fodder made up of permanent pastures or meadows sown, which should provide 60-65% of the areas of perennial crops.

Perennial grasses and especially those from leguminous are the main components of the vegetation. The total area of grassland in Romania is 4.9 million hectares, representing about 21% of the total area of the country and 34% of agricultural land, of which 3.4 million ha to 1.5 million ha is grassland meadows. From this point of view Romania ranks the 5<sup>th</sup> in Europe after France, UK, Spain and Germany.

Cultivation performance, adapted to climatic and their use is the main means of increasing forage production, together with respect for culture technologies. Knowing drought resistance varieties and unfavourable soil conditions is a basic element in ensuring the stability of production in areas affected by these phenomena.

Using a valuable germplasm and unconventional techniques, such as biotechnology, *in vitro* selection, along with your selection under controlled greenhouse conditions as well as under diverse climatic conditions in the field, provides premises to obtain resistant varieties of grasses and perennial leguminous in the meadows, as an alternative to increasing productivity in grasslands under harsh living conditions.

Research and technological development, of high complexity, included basic and applied research in order to identify valuable genotypes for the studied species, activities that in my case followed the use of high technology in order to:

- test explants for *in vitro* reactivity consisting of seeds, respectively of embryos cultivated on media with different mineral composition for species such as *Festuca arundinacea*, *F. pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Trifolium repens* and *Lolium perenne*;
- evaluate the variability of production for *F. pratensis*, *P. pratense*, *D. glomerata*, *L. perenne* for field tests and fields of plants originating from *in vitro* culture;
- identify the variability of production for *F. arundinacea*, *F. pratensis*, *P. pratense*, *D. glomerata*, *L. perenne*, *T. repens* cultivated on field test.

Following our research the analysis of our results yielded answers for interspecific and intraspecific levels, that are distinct also for clonal micropropagation that is associated with de novo plant morphogenesis as well as for the acclimatisation. We have found the species *D. glomerata* acclimated largest number of plants and 240 of the total 418 plants regenerated *in vitro*, compared to other species of perennial grasses such as the following: *F. pratensis* with 70 plants acclimatized from 212 plants regenerated, *F. arundinacea* with 106 plants acclimatized from 301 plants regenerated *L. perenne* with 32 plants acclimatized from 150 plants regenerated (Sand *et al.*, 2009).

These studies realized by undersigned presented in addition to the novelty and high complexity regarding the implications of technical, economical and social impacts by placing them into the Romanian avant-garde research movement in the context of the EU.

Research topics addressed each of us in this thesis empowerment materialized with research projects at national competitions and won more than 60 scientific papers supported and published in scientific journals.

All research mentioned in the abstract serve as a database for plant physiology for the acquired new knowledge regarding the *in vitro* reactivity of plant explants, that depends on the experienced micro-environment and plant genetic resources used as donor explants.

In the last part of the habilitation thesis I presented the evolution planning for professional, scientific and academic career development.

## Referințe bibliografice

1. \*\*\* Agenția Națională Pentru Protecția Mediului, 2015, *Raport anual privind starea mediului în România, anul 2014*. Editori: Ministerul Mediului Apelor și Pădurilor și Agenția Națională Pentru Protecția Mediului, București. Accesat on line la <http://www.anpm.ro/documents/12220/2209838/RSM.2014.pdf/4dbde2ae-a7a4-43ef-8abc-67511d11715f>
2. \*\*\* IPCC, 2007: *Climate Change 2007: Synthesis Report*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp. Accesat on line la : [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/publications\\_ipcc\\_fourth\\_assessment\\_report\\_synthesis\\_report.htm](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_synthesis_report.htm)
3. \*\*\*. 1964. *Flora Europaea*. Cambridge University Press.
4. Abraham, E.M. et al. 2004. *Evaluation of drought resistance for Texas bluegrass, Kentucky bluegrass, and their hybrids*. Crop Sci. 44:1746-1753
5. Athanasiu, L. 1984. *Ecofiziologia plantelor*, Ed. Științifică și Enciclopedică, București
6. Beldie, A. 1977. *Flora României: determinant ilustrat al plantelor vasculare*. Vol XIII, Editura Academiei Republicii Socialiste România.
7. Berry, P. 2008, *Climate change and the vulnerability of Bern Convention species and habitats*. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats, Standing Committee 28th meeting, Strasbourg (pp. 24-27).
8. Bhat, Z.A., Kumar, D., Shah, M.Y. 2011. *Angelica archangelica L. is an angel on earth for the treatment of diseases*. International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases, 1(1), 36.
9. Bown. D. 1995. *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*. Dorling Kindersley, London. ISBN 0-7513-020-31
10. Cattivelli, L. et al. 2008. *Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics*. Field Crops Res. 105:1-14
11. Chiej. R. 1984. *Encyclopaedia of Medicinal Plants*. MacDonald. ISBN 0-356-10541-5
12. Ciccotti, A. M., Bezzi, A. 1983. *Prime esperienze di micropropagazione di Gentiana lutea L*. Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Assestamento Forestale e per l'Alpicoltura, Trento.
13. Constantinescu, Gr., Hațieganu Buruiană, E. 1986. *Plante medicinale*, Ed. Medicală, București

14. Dall'Agnol, M., Bouton, J.H., Parrott, W.A. 1996. *Screening methods to develop alfalfa germplasms tolerant of acid, aluminum toxic soils*. Crop Sci. 36:64-70
15. Dihoru, G., Negrean, G. 2009. *Cartea roșie a plantelor vasculare din România*. Ed. Academiei Române.
16. Doneanu, C., Anitescu, G. 1998. *Supercritical carbon dioxide extraction of Angelica archangelica L. root oil*. The Journal of Supercritical Fluids, 12(1), 59-67.
17. dos Santos, P. R. D., de Lima Moreira, D., Guimarães, E. F., Kaplan, M. A. C. 2001. *Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest*. Phytochemistry, 58(4), 547-551.
18. Facciola, S. 1990. *Cornucopia - A Source Book of Edible Plants*. Kampong Publications ISBN 0-9628087-0-9,
19. Fisher, R.A., Maurer, R. 1978. *Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield response*. Aust. J. Agric. Res. 29:879-912
20. Foy, C.D., Murray, J.J. 1998. *Developing aluminum - tolerant strains of tall fescue for acid soils*. Journal of plant nutrition, 21(6), 1301-1325.
21. Giaveno, C.D., Miranda Filho, J.B. 2002. *Selection methods for maize seedlings in greenhouse as related to aluminum tolerance*. Scientia Agricola 59(4):807-810
22. Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ...& Toulmin, C. 2010. *Food security: the challenge of feeding 9 billion people*. Science, 327(5967), 812-818.
23. Grieve, M. 1984. *A Modern Herbal*. Penguin 1984 ISBN 0-14-046-440-9,
24. Grigorescu, E. 1987. *Din ierburi s-au născut medicamentele*. Editura Albatros.
25. Hedrick, U.P. 1972. *Sturtevant's Edible Plants of the World*. Dover Publications ISBN 0-486-20459-6,
26. Heltmann, H. 1970. *Introducerea in Cultura a Speciei Gentiana lutea L. in Romania*. Rev. Medical. 16, 389
27. Holobiuc, I, Blindu, R. 2006. *in vitro culture introduction for ex situ conservation of some rare plant species*. Rom. J. Biol. Plant Biol, 51, 52.
28. Holtom, J., Hylton, W. 1979. *Complete Guide to Herbs*. Rodale Press ISBN 0-87857-262-7
29. Hopkins, A.A. et al. 2004. *Russian wildrye seedlings are sensitive to acidic soil*. Crop Sci.44:2187-2192
30. Hsiao, T.C. 1973. *Plant responses to water stress*. Annual review of plant physiology, 24(1), 519-570.
31. Huxley. A. *The New RHS Dictionary of Gardening*. 1992. MacMillan Press ISBN 0-333-47494-5.
32. Iojă, C. I., Pătroescu, M., Rozyłowicz, L., Popescu, V. D., Vergheteș, M., Zotta, M. I., Felciuc, M. 2010. *The efficacy of Romania's protected areas*

- network in conserving biodiversity*. Biological Conservation, 143(11), 2468-2476.
33. Kathe, W., Heym, A., Honnef, S. 2003. *Medicinal and aromatic plants in Albania, Bosnia-Herzegovina, Bulgaria, Croatia and Romania*. Bundesamt für Naturschutz.
  34. Kemp, D.R., Culvenor, R.A. 1994. *Improving the grazing and drought tolerance of temperate perennial grasses*. New Z. J. Agric. Res. 37:365-378
  35. Kerrola, K., Galambosi, B., Kallio, H. 1994. *Characterization of volatile composition and odor of angelica (Angelica archangelica L., subsp. archangelica L.) root extracts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(9), 1979-1988.
  36. Kery, M., Matthies, D., & Spillmann, H. H. 2000. *Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants Primula veris and Gentiana lutea*. Journal of Ecology, 88(1), 17-30.
  37. Kochian, L.V., Pineros, M.A., Hoekenga, O.A. 2005. *The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity*. Plant Soil 274:175-195
  38. Kohlein, F. 1991. *Gentians*. Christopher Helm. London. ISBN 0-88192-192-0,
  39. Launert, E. 1981. *Edible and Medicinal Plants*. Hamlyn ISBN 0-600-37216-2
  40. Le, T.-N., McQueen-Mason, S.J. 2006. *Desiccation-tolerant plants in dry environments*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 5:269-279
  41. Lundqvist, E., Andersson, E. 2001. *Genetic diversity in populations of plants with different breeding and dispersal strategies in a free -flowing boreal river system*. Hereditas, 135(1), 75-83.
  42. Lust, J. 1983. *The Herb Book*. Bantam books ISBN 0-553-23827-2,
  43. Moisuc Al, Dukic, D. 2002. *Cultura plantelor furajere*, Ed. Orizonturi Universitare, Timisoara.
  44. Nasir, M.H., Nadeem, R., Akhtar, K., Hanif, M. A., Khalid, A. M. 2007. *Efficacy of modified distillation sludge of rose (Rosa centifolia) petals for lead (II) and zinc (II) removal from aqueous solutions*. Journal of Hazardous Materials, 147(3), 1006-1014.
  45. Nykänen, I., Nykänen, L., Alkio, M. 1991. *Composition of Angelica Root Oils Obtained by Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Steam Distillation*. Journal of Essential Oil Research, 3(4), 229-236.
  46. Ojala, A. 1985. *Seed dormancy and germination in Angelica archangelica subsp. archangelica (Apiaceae)*. Annales Botanici Fennici, pp. 53-62.
  47. Petcu, E. et al. 2006. *A preliminary method of screening for soil acidity tolerance in alfalfa*. Proceedings of the XXVI-th Meeting of the EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section and the XVI-th Meeting of Medicago ssp. Group, Perugia,

48. Phillips, R., Rix, M. 1991. *Perennials*, Volumes 1 and 2. Pan Books ISBN 0-330-30936-9.
49. Pop, M. 2007. *Culturi furajere pentru nutreț sau sămânță indicate în zonele cu soluri podzolice*, INFO-ANSEM, anul VIII, Nr. 2, p.54-57.
50. Pop, M.R., Sand C., Tănase, M., Barbu, C.H. 2007. *Studies concerning the phenotypical variability of some *Gentiana lutea* L. genotypes*, Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, Seria Agricultură, Vol. 63-64, ISSN 1843-5262.
51. Pop, M.R., Sand, C. 2003. *Testarea unor primeri în vederea realizării unor analize RAPD la zece genotipuri din specia *Angelica archangelica* L.*, pp. 43 - 46, Acta Universitatis Cibiniensis, Seria Științe Agricole, Vol.1, nr.1 (3), Editura Universității „Lucian Blaga” Sibiu.
52. Pop, M.R., Sand, C., Barbu C.H. 2008. *The correlations between phenotypical characters in selected families by *Gentiana lutea* L. and the chemical compounds of underground organs*, Analele Universității din Oradea, Fascicola Biologiem Tom XV, ISSN 1224-5119, Oradea.
53. Pop, M.R., Sand, C., Barbu, C.H. 2004. *Molecular markers for random polymorphic DNA analysis in ten genotypes of *Angelica archangelica* L.* “Scientific Papers – Animal Sciences and Biotechnologies”, Ed. Agroprint, Timișoara, vol. XXXVII, pp. 540-545.
54. Pop, M.R., Sand, C., Barbu, C.H. 2008. *Determination of genetic variability and polymorphism for some families to *Gentiana lutea* L. species by RAPD*, Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, Seria Agricultură, Vol. 65 (1-2), ISSN 1454-2382.
55. Pop, M.R., Sand, C., Barbu, C.H. 2008. *The establishment of the correlation between underground organs in selected family by *Gentiana lutea* L. and their chemical compounds*, Cercetări științifice, Seria a XII-a, Horticultură / Inginerie Genetică, Editura Agroprint, Timișoara, ISSN 1453-1402.
56. Pop, M.R., Sand, C., Barbu, C.H. 2008. *The variability of the capacity in active origins of subteraneus organs in selected familys by *Gentiana lutea* L.*, Revista Lucrări științifice a Universitatii de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara "Ion Ionescu de la Brad" Iași, seria Horticultură, vol. 51.
57. Pop, M.R., Sand, C., Barbu, C.H., Lazurca, D. 2007. *Studies concerning the phenotypical variability of certain *Gentiana lutea* L. families*, Proceedings of the International Conference “Agricultural and Food Sciences, Processes and Technologies with the context of European integration”, Editura Universității Lucian Blaga, Sibiu, ISBN 1843-0694.
58. Pop, M.R., Sand, C., Bobiț, D., Barbu, C.H. 2007. *Phenotypic variability in the subterranean organs of certain *Gentiana lutea* L. families*, Cercetări științifice, Seria a XI-a, Horticultură / Inginerie Genetică, Editura Agroprint, Timișoara, ISSN 1453-1402.

59. Pop, M.R., Sand, C., Bobiț, D.M., Barbu, C.H. 2004. *Assessment of the DNA from 10 Angelica lines, extracted by CTAB*, Buletinul USAMV Cluj-Napoca, vol. 60, pp 309-312.
60. Pop, M.R., Sand, C., Savatti, M., Cătană, C., Barbu, C.H., Power, J.B., Davey, M.R. 2003, *Testing of 20 OPC primers for the RAPD analyze of ten genotypes of Angelica archangelica L.*, pp.306, Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, Seria Zootehnie și Biotehnologii, Vol. 59.
61. Pop, N. 2008. *Research regarding the topographical position and water consumption of some leguminous fodder plants and perennial gramineous plants in the subhumid area of Transylvania-Romania*. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture, 65(2), 522-527.
62. Popa, I.A. et al. 2008. *Screening of forage perennial grasses for tolerance to soil acidity : preliminary results on Dactylis glomerata L., Festuca pratensis Huds., Phleum pratense L. and Lolium perenne L.* Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference “Modern Technologies and Biotechnologies for Environmental Protection”, Sibiu 2008
63. Rani, V., & Raina, S. N. 2000. *Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal.* *in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(5), 319-330.
64. Requis, J., Culvenor, R.A. 2004. *Progress in improving aluminium tolerance in the perennial grass, Phalaris.* *Euphytica*, 139(1), 9-18.
65. Ring, S.M. et al. 1993. *Screening species and cultivars for their tolerance to acidic soil conditions.* *Plant Soil* 155/156:521-524
66. Samac, D.A., Tesfaye, M. 2003. *Plant improvement for tolerance to aluminum in acid-soils – a review.* *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 75:189-207
67. Samuil, C. 2007. *Tehnologii de agricultură ecologică.* Editura Pim, Iași.
68. Sand, C., Barbu, C.H., Bălan, M.B., Pop, M.R., Antofie, M.M., Grusea, A. 2009. *Studies regarding the acclimatation of the new regenerants plants belonging to Dactylis glomerata and Festuca rubra species.* *Acta Universitatis Cibiniensis*, 1(1), 65-70.
69. Sand, C., Bobiț, D., Lazurca, D., Barbu, C.H., Pop, M.R. 2007. *Studies for the identification of the valuable genotypes of wild flora Gentiana lutea L. Species*, Proceedings of the International Conference “Agricultural and Food Sciences, Processes and Technologies with the context of European integration”, Editura Universității Lucian Blaga, Sibiu, ISBN 1843-0694.
70. Sand, C., Bobiț, D., Lazurcă, D., Barbu, C.H., Pop, M.R. 2008. *Identification of new Gentiana lutea L. Germoplasm sources using „in vitro cultures”*, The 12<sup>th</sup> International Congress PHYTOPHARM 2008, 2-4 July, Saint- Petersburgm Rusia.



71. Sand, C., Pop M.R. 2003. *Studies on in vitro micropropagation of Angelica archangelica L.*, Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, Seria Zootehnie și Biotehnologii, Vol. 59, pp.307
72. Sand, C., Pop, M.R., Bobiț, D., Barbu, C.H. 2004. *Possibilities of increasing the in vitro multiplication yield at Angelica archangelica L.* “Scientific Papers – Animal Sciences and Biotechnologies”, vol. XXXVII, pp. 546-550, Ed. Agroprint, Timișoara.
73. Sand, C., Pop, M.R., Bobiț, D., Barbu, C.H., Lazurcă, D. 2008. *Studies concerning the amount of active principles in some valuable genotypes of Gentiana lutea L.*, Proceedings of Croatian International Symposium on Agriculture, ISBN 978-953-6135-67-7, Opatijam, Croatia.
74. Sanders, T.W. 1926. *Popular Hardy Perennials*. Collingridge,
75. Scott, B.J., Riddley, A.M., Conyers, M.K. 2000. *Management of soil acidity in long-term pastures of south-eastern Australia. A review*. Aust. J. Agric. Res. 40:1173-1198
76. Sojka, R.E. 1984. *Field evaluation of drought response in small-grain cereals*. Progress in plant breeding, G.E. Russell (ed.), p.165-191
77. Tanase, M., Sand, C., Bobit, D., Lazurca, D., Boncut, M., Barbu, C.H., Pop, M.R. 2007. Variation of the morphological characteristics and active principles in wild and cultivated *Gentiana lutea L.* from Romania, *Planta Medica*, International Journal of Natural Products and Medicinal Plant Research, ISSN 0032-0946, Thieme Publishers, Graz, Austria.
78. Voigt, P.W., Stanley, T.E. 2004. Selection for aluminum and acid-soil resistance in *white clover*. *Crop Sci.* 44: p. 38-48.
79. Volaire, F., Norton, M. 2006. *Summer dormancy in perennial grasses*. *Ann. Bot.* 98: p. 927-933.
80. von Uexkull, H.R., Mutert, E. 1995. *Global extent, development and economic impact of acid soils*, *Plant Soil*, 171: p. 1-15.
81. Wang, J. et al. 2006. *Aluminium tolerance in barley (Hordeum vulgare L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods*. *J. Zhejiang Univ. SCIENCE B* 7(10): p.769-787.
82. Wedge, D.E., Klun, J.A., Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Baser, K.H.C., Zhang, J. 2008. *Bioactivity-guided fractionation and GC/MS fingerprinting of Angelica sinensis and Angelica archangelica root components for antifungal and mosquito deterrent activity*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(2), 464-470.
83. Wheeler, D.M. et al. 1992. *Screening perennial rye-grass from New Zealand for aluminium tolerance*. *Plant Soil* 146: p. 9-19.
84. Wszelaki, N., Paradowska, K., Jamróz, M.K., Granica, S., Kiss, A.K. 2011. *Bioactivity-guided fractionation for the butyrylcholinesterase inhibitory activity of furanocoumarins from Angelica archangelica L. roots and fruits*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(17), p. 9186-9193.