

# Caracterizarea genotipurilor de Cyclamen folosind descriptori morfologici, compuși bioactivi și markeri moleculari ADN

(REZUMAT AL TEZEI DOCTORALE)

---

Doctorand **Mihaiela Cornea-Cipcigan**

---

Coordonator științific Acad. Prof. dr. **Doru Pamfil**





## REZUMAT

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății [1] 60% dintre plantele medicinale ar putea fi utilizate mai frecvent în următorii douăzeci de ani, împreună cu aproximativ 80% dintre persoanele din țările subdezvoltate (65% din populația lumii) care folosesc în prezent medicina tradițională. Genul *Cyclamen* include 24 de specii și este distribuit în principal în zonele mediteraneene cu climă temperată [2]. Conform listei Uniunii Internaționale pentru Conservarea Naturii (IUCN), *C. purpurascens* Mill. (ciclamen purpuriu) este în declin datorită colectării sale în vederea utilizării din punct de vedere medicinal în Croația, în timp ce *C. libanoticum* Hildebr. (ciclamenul din Liban) este pe cale de dispariție.

*C. persicum* este o plantă decorativă populară, cu o valoare comercială semnificativă, în special în Țările de Jos, Germania și Italia. În plus față de valoarea sa ornamentală și comercială, ciclamenul este foarte important în medicina tradițională și modernă [3-5]. Beneficiile terapeutice ale ciclamenului au fost cunoscute încă din antichitate de romani, greci și egipteni. Tuberculii măcinați sunt folosiți ca remediu tradițional pentru a acoperi rănilor infectate, sau ca și tratament pentru psoriazis, dermatită, ulcere și alte probleme ale pielii [6,7]. Este folosit pentru a trata arsurile și bolile minore ale pielii, precum și ca antihelmintic, împotriva artritei și reumatismului [8]. Speciile de *Cyclamen* prezintă efecte antioxidante semnificative datorită conținutului fenolic, iar proprietățile lor anticancerigene au fost demonstrate în celulele HeLa, H1299, HCT 116, HT-29, MDA-MB-231 și BJ [9-11].

Datorită insuficienței materialului vegetal, utilizarea acestuia în industria farmaceutică a devenit o preocupare masivă, contribuind în mod semnificativ la reducerea populațiilor și soiurilor de plante, la distrugerea habitatelor naturale și/sau la dispariția speciilor. Doar câteva specii de *Cyclamen* originare din Turcia au fost clasificate din punct de vedere al caracteristicilor morfologice [12,13]. Materialele din băncile de gene, cum ar fi speciile sălbatice, cultivate și selectate, sunt surse valoroase de varietate pentru amelioratori. Astfel, de-a lungul anilor, amelioratorii au folosit tehnici multiple pentru a examina și cuantifica gradul de diversitate în diferite populații de plante [14]. În privința speciilor de *Cyclamen*, variația genetică a fost evaluată cu ajutorul caracteristicilor morfologice și al markerilor moleculari, cum sunt: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) [15], SRAP (sequence-related amplified polymorphisms) [16] și SCoT (PCR-based start codon targete) [3].

Scopul acestei teze a fost determinarea capacității de germinare și caracterizarea morfologică a genotipurilor de *Cyclamen* în condiții de aplicare a GA<sub>3</sub> și în condiții diferite, urmată de identificarea antocianilor, carotenoidelor și caracterizarea moleculară. Prima direcție a fost evaluarea efectelor aplicării GA<sub>3</sub> asupra germinăției semințelor și dezvoltării plantelor în condiții diferite de expunere la lumină; capacitatea de germinare și dezvoltarea plantelor la genotipurile de *Cyclamen* tolerante sau sensibile la căldură supuse la condiții de stres termic. A doua direcție a fost determinarea conținutului total de polifenoli, flavonoide, antociani și carotenoide; identificarea și cuantificarea carotenoidelor individuale și a clorofilelor din frunze, precum și a antocianilor din flori; activități antioxidante, antimicrobiene și antitumorale; și determinarea corelației dintre activitățile mai sus menționate și compușii identificați, utilizând analiza multivariată.

În plus, a fost efectuată o comparație între metodele de grupare bazate pe markeri fenotipici și moleculari (markeri SRAP și SCoT).

Experimentele au fost realizate la Institutul de Cercetări Horticole Avansate din Transilvania, Laboratorul de Analiză și Spectrometrie Celulară, Facultatea de Horticultură și Afaceri în Dezvoltare Rurală. O parte din experimente a fost realizată la Facultatea de Zootehnie și Biotehnologii și Facultatea de Medicină Veterinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca sub supravegherea dl. Acad. Prof. dr. Doru Pamfil.

## Obiectivele principale ale acestei teze de doctorat au fost:

Speciile de Cyclamen sunt plante perene decorative și medicinale răspândite în principal în zona mediteraneană. Prezintă adaptabilitate la alterări ecologice și la diferite condiții de mediu, dar comercializarea sa a avut un impact dăunător asupra populațiilor native. Ca urmare a încălzirii globale, stresul abiotic a apărut ca o sursă majoră de îngrijorare în ceea ce privește productivitatea agricolă. Se desfășoară cercetări semnificative pentru a dezvolta noi tehnici de abordare a provocărilor induse de stresul abiotic, precum și aspira realizării de cultivare tolerante la căldură și la secetă și abordări de gestionare a resurselor, printre altele. De asemenea, amelioratorii sunt interesați de compușii care protejează plantele de o varietate de condiții climatice severe. În acest aspect, regulatorii de creștere aplicați exogen, cum ar fi acizii gibberelici (GA), se dovedesc a fi avantajoși în ameliorarea stării fiziologice a plantelor supuse la anumite condiții abiotice.

Pornind de la aceste considerente, scopul tezei a fost evaluarea efectului administrării de GA<sub>3</sub> asupra germinăției semințelor și dezvoltării plantelor, precum și doza ideală de GA<sub>3</sub> aplicată la varietățile de Cyclamen, influențate de diferite niveluri de iluminare solară. În plus, deficitul de apă și alte condiții (a)-biotice pot avea un impact asupra calității și randamentului culturilor, ambele fiind influențate de temperatură și de accesibilitatea apei. Având în vedere aceste aspecte, studiul de față a avut ca scop evaluarea nedistructivă a capacității de germinare și a dezvoltării plantelor la genotipurile de Cyclamen tolerante și sensibile la căldură supuse la condiții de stres termic. În plus, prezentul studiu a urmărit să analizeze diversitatea genetică a germoplasmei selectate pentru toleranța la stresul abiotic și să selecteze genotipurile cu o toleranță mai mare la căldură.

În plus față de calitatea sa ornamentală, Cyclamenul are puternice activități antioxidante și anticancerigene. Având în vedere acest aspect, al doilea obiectiv a fost determinarea conținutului total de polifenoli, flavonoide, antociani și carotenoide din frunzele și florile de Cyclamen. În plus, s-a urmărit determinarea activităților antioxidante, antimicrobiene și antitumorale; și, în cele din urmă, să determine corelațiile dintre activitățile menționate mai sus și compușii identificați utilizând analiza multivariată.

Ultima parte a tezei prezintă compararea diferitelor matrici de corelație și analiza ierarhică, precum și evaluarea diversității genetice și a divergenței în genotipurile Cyclamen folosind date morfologice, moleculare și combinate. Având în vedere importanța caracterizării morfologice și moleculare pentru ameliorarea Cyclamenului cultivat, acest studiu a evaluat 32 de genotipuri folosind 36 de trăsături morfologice, indicatori de culoare și caracterizare moleculară (markeri SRAP și SCOT) într-o analiză multivariată.

În vederea realizării scopurilor prezentei teze, următoarele aspecte au fost investigate și concretizate în patru obiective:

**0.1.** Evaluarea efectului diferitelor concentrații de GA<sub>3</sub> asupra germinăției semințelor, creșterii și calității ornamentale a unor specii selectate de Cyclamen în condiții de zi scurtă și lungă.

**0.2.** Evaluarea germinăției și a parametrilor morfologici i varietăților de *Cyclamen persicum* tolerante sau sensibile la căldură în prezența diferitelor soluții de GA<sub>3</sub> în condiții de temperatură ambiantă și de stres termic;

**0.3.** Evaluarea și compararea *in vitro* a activităților antioxidante, antimicrobiene și anticancerigene, precum și a conținutului individual de carotenoide și antociani din extractele metanolice ale diferitelor genotipuri de Cyclamen;

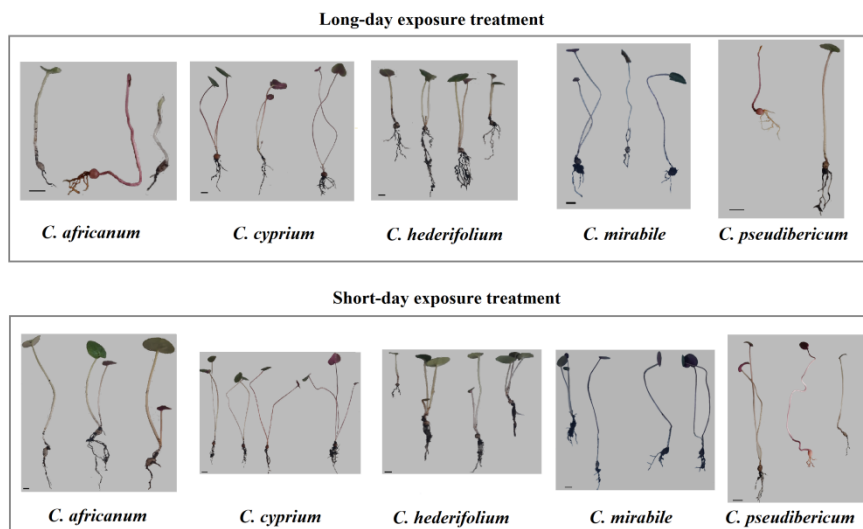
**0.4.** Investigarea diversității genetice a genotipurilor de Cyclamen utilizând analiză multivariată pentru trăsăturile morfologice și caracterizarea moleculară;

Rezultatele prezentei teze au fost publicate în două articole științifice (unul indexat ISI cu IF 0.456 - în *Acta Poloniae Pharmaceutica Journal*; al doilea BDI în *BUASVM Cluj-Napoca. Horticulture*), și un capitol de carte ce urmează a fi publicat în Springer Nature. În plus, au fost publicate patru articole originale (unul indexat ISI cu IF 2.259 - în *Agronomy Journal*; al doilea indexat ISI cu IF 6.313 - în *Antioxidants Journal*; al treilea indexat ISI cu IF 4.658 - în *Plants Journal*; al patrulea indexat ISI cu IF 6.627 - în *Frontiers in Plant Science Journal*).

Studiile și experimentele descrise în această teză au fost realizate în cadrul Institutului de Cercetări Horticole Avansate din Transilvania din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca.

Teza de doctorat este structurată în două părți principale: stadiul actual al cunoașterii care conține două articole de analiză a literaturii de specialitate (**Capitolul 1**) și cercetarea originală care conține ipoteza de lucru/obiectivele (**Capitolul 1 din partea a doua**) și metodologiile generale (**Capitolul 2**), urmate de articolele de cercetare proprii și un capitol de carte (**Capitolele 3-7**), concluzii generale și recomandări (**Capitolul 8**), respectiv originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei (**Capitolul 9**).

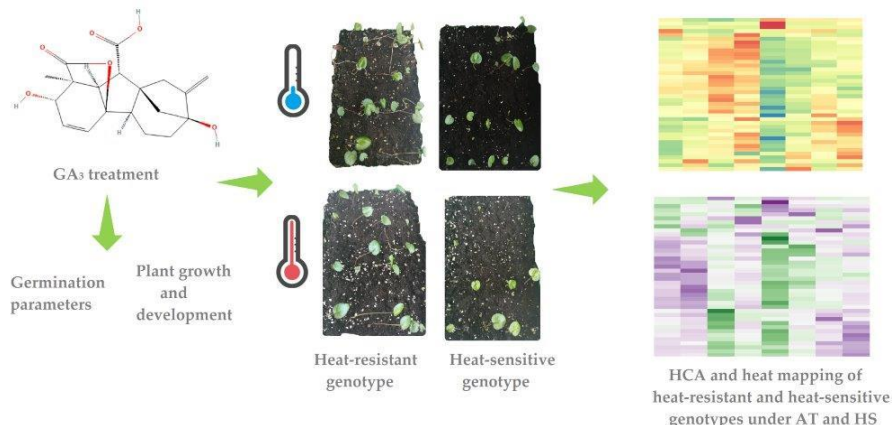
În ceea ce privește articolele de analiză a literaturii, studiile au fost identificate prin efectuarea de căutări electronice în PubMed, Web of Science Core Collection, Scopus și Google Scholar. În urma analizei bibliografice prezentate în cadrul stadiului actual al cunoașterii, acidul gibberelic se dovedește a fi un bioregulator ecologic care este utilizat pe scară largă pentru a spori productivitatea și caracteristicile fenotipice ale multor culturi ornamentale. Genotipurile de Ciclamen se dovedesc a fi utile ca agenți anticancerigeni datorită conținutului ridicat în polifenoli, demonstrând, de asemenea, proprietăți antioxidante și antimicrobiene semnificative. Strategiile investigate, cum ar fi capacitatea de germinare, dezvoltarea plantelor, rezistența la stresul abiotic, caracterizarea morfologică și moleculară, susțin importanța speciilor de *Cyclamen* ca plante ornamentală și medicinale.



**Figura 1.** Variația ratei de germinare și a dezvoltării răsadurilor la diferite concentrații de  $GA_3$  (martor, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L) la genotipurile *Cyclamen* supuse la condiții de zi lungă sau de zi scurtă, (<https://doi.org/10.3390/agronomy10040516>).

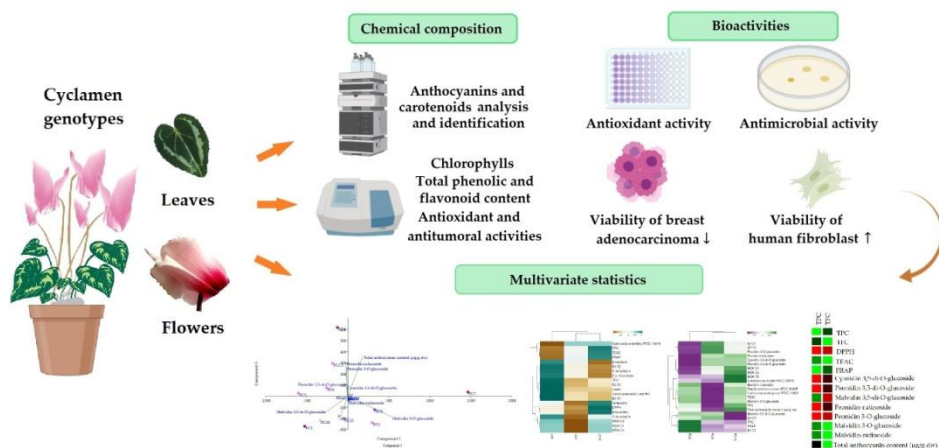
Experimentele, care au implicat submersia semințelor de *Cyclamen* în diferite concentrații de  $GA_3$ , urmată de examinarea stadiilor de dezvoltare a plantelor, efectuate în condiții controlate și de stress (**Figura 1**). În plus, parametrii morfologici a varietăților de *Cyclamen persicum* tolerante și sensibile la căldură în

prezența diferitelor concentrații de GA<sub>3</sub> au fost evaluate în condiții de control și de stres termic, ulterior utilizând analiza multivariată (**Figura 2**). Au fost evaluate profilurile individuale de carotenoide și antociani ale mai multor genotipuri de Cyclamen, împreună cu posibila corelație dintre carotenoide, antociani și caracteristicile de culoare, ca punct de plecare pentru a stabili o estimare rapidă, rentabilă și precisă a conținutului de pigmenți (**Figura 3**).

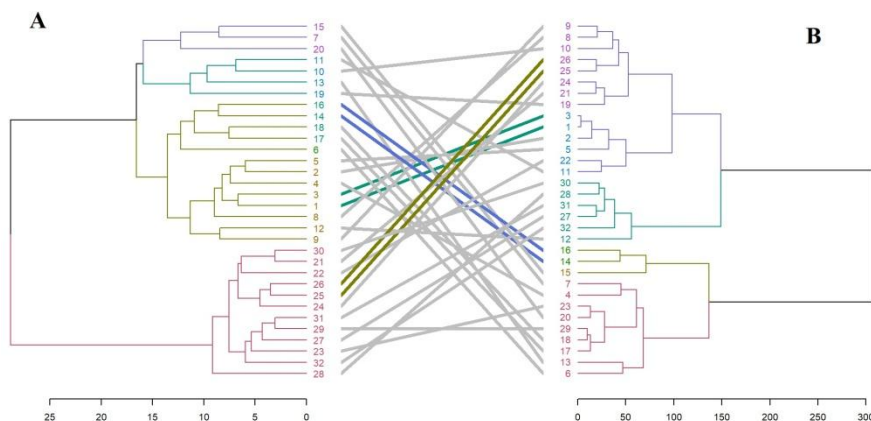


**Figura 2.** Variația în dezvoltarea plantelor la genotipurile de Cyclamen rezistente și sensibile la căldură în condiții de stres termic (<https://doi.org/10.3390/plants11141868>)

Ultimul studiu prezintă compararea mai multor matrici de corelație și a grupării ierarhice pentru investigarea diversității genetice la Cyclamen, precum și evaluarea diversității genetice și a divergenței genotipurilor de Cyclamen prin utilizarea de date morfologice, moleculare și combinate (**Figura 4**). Analizele și determinările au fost efectuate în duplicat sau triplicat pentru fiecare studiu și analiză individuală.



**Figura 3.** Carotenoidele și antocianii identificați în florile și frunzele genotipurilor de ciclamen sunt corelate cu activitățile antioxidante, antimicrobiene și anticancerigene, (<https://doi.org/10.3390/antiox11061126>)



**Figura 4.** Comparație între dendrogramele pentru cele 32 de genotipuri Cyclamen cu markerii SRAP (A) și datele fenotipice (B) cu entanglement = 0,30. Liniile gri în conectarea dendrogramei corespund genotipurilor nepotrivite, în timp ce liniile colorate sunt genotipurile care și-au menținut poziția între clustere, (<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1100099>)

Analizele statistice au fost efectuate utilizând software-ul GraphPad Prism 8.2.1.441 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, SUA) și software-ul XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, SUA). Rezultatele au fost exprimate ca medie  $\pm$  deviație standard (SD). În primul studiu, semnificația diferențelor dintre tratamentele cu GA<sub>3</sub> a fost testată prin aplicarea unei analize a varianței (ANOVA) cu o singură direcție, la un nivel de încredere de 95%. Testul Tukey Post hoc a fost efectuat pentru a stabili diferențele semnificative din punct de vedere statistic la  $p < 0,05$ . În cel de-al doilea studiu, datele colectate au fost analizate cu tehnica de analiză a varianței (ANOVA), utilizând testul HSD Tukey ( $p < 0,05$ ) și prezentate ca interacțiuni între stresul de temperatură ambiantă și ridicată și tratamentul GA<sub>3</sub>. Heatmap-urile, dendrogramele, matricile de corelație și matricile de diversitate au fost generate folosind software-ul Paleontological Statistics (PAST) (versiunea 4.0, Oslo, Norvegia) și, respectiv, software-ul R (versiunea 4.2.2).

Rezultatele obținute în articolele de cercetare menționate mai sus sunt rezumate după cum urmează:

**Capitolul 3** prezintă originea, distribuția, taxonomia, semnificația economică, avantajele asupra sănătății, resursele genetice, practicile de cultivare, metodele tradiționale de ameliorare și metodele contemporane de ameliorare utilizate în inițiativele de ameliorare a speciilor de Cyclamen.

**Capitolul 4** prezintă răspunsul speciilor de Cyclamen expuse la zile lungi și scurte la diferite concentrații de GA<sub>3</sub>. Aceste constatări relevă răspunsul acestor plante supuse unui stres de intensitate luminoasă ridicată și scăzută, precum și capacitatea de germinare indusă de tratamentul cu GA<sub>3</sub>. Toate speciile investigate au avut caracteristici morfologice și parametri de germinare unici, ceea ce permite diferențierea lor cu ușurință pe baza proprietăților germinative.

**Capitolul 5** se concentrează pe efectele de amorsare ale GA<sub>3</sub> asupra germinăției semințelor și creșterii plantelor, precum și pe cea mai benefică doză de GA<sub>3</sub> pentru varietățile de Cyclamen în condiții de temperatură ambiantă și de stres termic. Acest capitol demonstrează faptul că utilizarea concentrațiilor optime de GA<sub>3</sub> este o etapă premergătoare care duce la selectarea genotipurilor rezistente, care ar putea fi utilizate în studii viitoare pentru a evalua rezistența acestora în condiții de stres termic și/sau de secetă, dar și supuse la diferiți regulatori ai hormonilor de creștere.

**Capitolul 6** prezintă activitățile antioxidante, antimicrobiene și anticancerigene, precum și conținutul individual de carotenoide și antociani ale extractelor metanolice din diferite genotipuri de Cyclamen. În acest capitol, frunzele de *C. persicum*, *C. mirabile* și *C. hederifolium* prezintă diferențe în ceea ce

privește profilul lor carotenoidic și activitățile antioxidante, antimicrobiene și antitumorale. Florile de ciclamen au prezentat activități antibacteriene și antitumorale crescute, subliniind importanța lor ca sursă naturală de antioxidanți. Compoziția de antociani și carotenoide contribuie la cercetarea substanțelor fiziologic active descoperite în genotipurile de Cyclamen examinate.

**Capitolul 7** prezintă combinația de analize fenotipice și genetice privind evaluarea amănunțită a diversității reale în genotipurile de Cyclamen. Constatările studiului actual sunt valoroase în privința evaluării varietății și a variabilității genetice în studiile de ameliorare și genetică a speciilor de Cyclamen.

### **Concluziile generale au fost următoarele:**

1. În tratamentul de expunere de zi lungă, concentrația optimă de GA<sub>3</sub> pentru creșterea plantelor a fost de 150 mg/L la *C. cyprium* și *C. mirabile*. S-a observat o creștere a alungire a plantelor la *C. cyprium* și *C. mirabile* în tratamentul de expunere de scurtă durată, urmată de *C. pseudibericum* la concentrații de 50 și, respectiv, 100 mg/L.

2. Vigurozitatea răsadurilor și calitatea ornamentală au fost crescute prin aplicarea de GA<sub>3</sub>, o strategie economică pentru îmbunătățirea germinației și creșterii anumitor specii de Cyclamen.

3. Genotipurile tolerante la căldură, în principal C3 (6,42%), C15 (6,47%) și C16 (5,12%) au avut cea mai mare rată de germinare cu un tratament cu 90 mg/L de GA<sub>3</sub> în comparație cu martorul.

4. În condiții de stres termic la genotipurile tolerante la căldură C9, C10 și C14 au prezentat cea mai mare dezvoltare a plantelor sub tratamentul cu 70 mg/L GA<sub>3</sub>, cu valori cuprinse între 12,79 și 15,43 cm.

5. Frunzele de ciclamen au conținuturi semnificative de luteină și β-caroten cu potențiale proprietăți anticancerigene. Cel mai mare conținut de carotenoide a fost observat la *C. persicum* Merengue Magenta cu 228,34 μg/g substanță uscată și cel mai mic la Origami cu 79,62 μg/g substanță uscată.

6. Florile de Cyclamen au prezentat activități antimicrobiene și antitumorale crescute, subliniind utilizarea lor ca agenți antioxidanți naturali. Cel mai mare conținut de antociani a fost observat la *C. persicum* Halios falbala cu 1673,6 μg/g substanță uscată și cel mai mic cu 564,77 μg/g la *C. mirabile*.

7. *C. persicum* Halios falbala a prezentat cea mai mare activitate antimicrobiană posibil datorită conținutului ridicat de malvidină 3-O-glucozidă și malvidină rutinosidă.

8. Florile de *C. hederifolium* au demonstrat cea mai mare activitate împotriva liniilor celulare MDA-MB-231, indiferent de concentrația utilizată, care s-ar putea datora conținutului ridicat de polifenoli și flavonoide, dar și a conținutului ridicat de malvidină 3,5-di-O-glucozidă (357,53 μg/g substanță uscată), malvidină 3-O-glucozidă (127,55 μg/g substanță uscată) și malvidină rutinosidă (95,07 μg/g substanță uscată).

9. S-a observat o activitate citotoxică ridicată împotriva liniilor celulare MDA-MB-231 și BJ în frunzele de *C. mirabile* care au prezentat cele mai ridicate niveluri de neoxantină (31,13 μg/g substanță uscată) și violaxantină (22,48 μg/g substanță uscată).

10. Analiza principalelor component (PCA) a sprijinit, în cea mai mare parte, gruparea caracteristicilor fenotipice în grupuri specifice speciilor, așa cum s-a observat în cazul genotipurilor de *C. persicum* care s-au grupat în principal în al doilea și al treilea cadran. Variabilele semnificative ale PC1 au fost NS, PL, FA, LN, CA și BCRD, după cum arată cele mai mari valori proprii, în timp ce PC2 a reprezentat caracteristicile de culoare a florilor.

11. Analiza diversității genetice generată cu ajutorul markerilor SRAP ( $r = 0,95$ ) și SCoT ( $r = 0,82$ ) a relevat o discriminare clară a genotipurilor Cyclamen, datorită faptului că genotipurile apropiate din punct de vedere genetic au fost grupate împreună.



12. Analiza moleculară combinată a relevat o estimare genetică mai precisă între genotipuri în funcție de filogenia acestora, organizând genotipurile în subgenul Gyrophoebe în cel de-al doilea grup, în timp ce al treilea grup a cuprins genotipurile corespunzătoare subgenului Cyclamen.

13. După cum reiese din nivelul ridicat al coeficientului (0,30) între combinația dendrogramelor, markerii SRAP s-au dovedit a fi instrumente eficiente pentru separarea speciilor și/sau a genotipurilor de Cyclamen când sunt combinați cu datele fenotipice.

14. Datele colorimetrice pentru frunze (entanglement=0,47), flori (entanglement=0,45) și markerii SCoT au evidențiat similitudini moderate.

### **Perspective:**

1. Tratamentul cu GA<sub>3</sub> poate îmbunătăți vigoarea răsadurilor și calitatea ornamentală într-o manieră dependentă de doză, care poate fi utilizată în continuare ca o tehnică rentabilă pentru creșterea capacității de germinare și dezvoltarea genotipurilor de Cyclamen.

2. Genotipurile cu cea mai mare capacitate de germinare a semințelor și de dezvoltare a plantelor pot fi alese ca genotipuri rezistente la căldură pentru a fi depozitate în băncile de germoplasmă și utilizate în programe ulterioare de ameliorare în condiții biotice și/sau abiotice pentru a obține genotipuri rezistente.

3. Parametrii chimici și bioactivitățile evaluate utilizând analize multivariate (PCA, HCA și dendrograme) ar putea constitui o orientare utilă pentru cercetători și amelioratori în selectarea genotipurilor pe baza profilului de carotenoide și antociani, dar și a calității lor potențial terapeutice și ornamentale.

4. Sunt necesare investigații farmacologice *in vitro* suplimentare ale compușilor specifici izolați din Cyclamen pentru a înțelege mai bine utilizarea lor în mai multe domenii medicinale.

5. Abordările de analiză multivariate pot fi utilizate în continuare pentru a clasifica cu precizie diverse specii de Cyclamen pe baza compoziției agro-morfologice, moleculare, chimice sau a bioactivităților, care sunt comparate în mod regulat cu coeficienții de corelație. Acest lucru poate contribui la o analiză mai cuprinzătoare a diversității genetice în cadrul și între specii, la investigații filogenetice și la identificarea amprentelor digitale la Cyclamen.

## ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Rezultatele prezentate în această teză pot fi considerate utile pentru comunitatea științifică din domeniile biotehnologiei, ameliorării și horticulturii. Această cercetare poate fi considerată un studiu cuprinzător care prezintă răspunsul mai multor specii de *Cyclamen* la diferite concentrații de GA<sub>3</sub> în condiții de expunere la zile scurte, zile lungi și stres abiotice. Aceste metode au fost studiate ca o modalitate potențială de a scurta perioada de germinare și de înmulțire a acestor specii de *Cyclamen* și de a alege genotipuri rezistente la stres termic. În plus, prezenta teză a avut ca scop evaluarea nedistructivă a capacității de germinare și a dezvoltării plantelor la genotipurile de *Cyclamen* tolerante și sensibile la căldură supuse la condiții de stres termic. Genotipurile rezistente la căldură pot fi utilizate în continuare în programe de ameliorare cu diferite modele de stres și tratamente hormonale pentru a produce o toleranță sporită la căldură în generațiile de culturi, ceea ce poate rezulta într-o producție ridicată.

Carotenoidele și antocianii individuali din aceste specii de *Cyclamen* selectate oferă o bază pentru cercetări viitoare, pentru evidențierea importanței activității lor biologice și a calităților terapeutice. Conform celui mai recent studiu cuprinzător pe această temă, nu există articole științifice care să investigheze acești compuși în genotipurile *Cyclamen* utilizate în prezenta teză. Procesul de liofilizare a fost efectuat pentru a determina conținutul de apă și pentru a compara rezultatele experimentale cu datele din literatura de specialitate, exprimate adesea în substanță uscată. Identificarea profilurilor de carotenoide și antocianini în genotipurile *Cyclamen* selectate poate oferi o mai bună cunoaștere a valorii terapeutice, datorită faptului că substanțele chimice separate pot fi utilizate ca agenți de promovare a sănătății în tratamentul diferitelor boli. De asemenea, au fost mășurați parametrii de culoare ai frunzelor și florilor de *Cyclamen* ceea ce poate contribui la discriminarea genotipurilor similare pe baza acestor măsurători. Nivelul general al componentelor polifenolice și flavonoide care pot acționa sinergic cu concentrația de antociani, poate fi asociat cu potențiala activitate antibacteriană a speciei *C. persicum*. Speciile de ciclamen, cu precădere *C. persicum* și *C. hederifolium*, se dovedesc a fi potențiali agenți anticancerigeni datorită conținutului semnificativ ridicat de luteină și β-caroten prezent în frunze și de malvidină 3-O-glucozidă și cianidină 3,5-di-O-glucozidă regăsit în flori.

Un alt obiectiv a fost acela de a discrimina mai bine probele utilizând atât PCA, cât și HCA, pe baza compușilor izolați și a activităților biologice. Ambele analize au arătat asemănările și diferențele dintre probele de flori și frunze, pe baza activităților antibacteriene și de citotoxicitate ale acestora.

În cele din urmă, ultimul nostru obiectiv a fost de a compara mai multe matrici de corelație și HCA pentru investigarea diversității genetice a diferitelor varietăți și specii de *Cyclamen* și de a evalua diversitatea genetică și divergența acestora folosind date morfologice, moleculare și combinate. Genotipurile au fost grupate pe baza asemănărilor și diferențelor dintre caracteristicile fenotipice și de culoare. Analiza datelor genetice a evidențiat o variabilitate scăzută între genotipurile utilizate în prezenta teză, cu câteva valori aberante indicate de spectrul variat de culori. În schimb, s-a observat o variabilitate mai mare între genotipurile de *Cyclamen* în comparație cu varietățile de *C. persicum*. Analiza combinată (0,30) între dendrogramele obținute din analizele morfologice și SRAP a arătat cea mai mare asociere în comparație cu celelalte analize. Astfel, datele colorimetrice pentru frunze și markerii SCoT au prezentat similitudini mai mici (entanglement=0,47) în comparație cu datele colorimetrice pentru flori și markerii SCoT (entanglement=0,45). În schimb, markerii moleculari utilizați (SRAP și SCoT) au prezentat cele mai mici similitudini, fără nicio suprapunere, ceea ce nu este surprinzător, având în vedere că acești primeri nu sunt specifici pentru *Cyclamen*. După cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care compară datele fenotipice, moleculare și combinate ale genotipurilor *Cyclamen* folosind tehnici de analiză multivariate.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. WHO. World Health Organization-Traditional Medicine; WHO: Geneva, Switzerland, 2008.
2. Grey-Wilson. Cyclamen (A Guide for Gardeners, Horticulturists and Botanists); Grey-Wilson: London, UK, 2015.
3. Cornea-Cipcigan M, Pamfil D, Sisea CR and Margaoan R (2023) Characterization of Cyclamen genotypes using morphological descriptors and DNA molecular markers in a multivariate analysis. *Front. Plant Sci.* 14:1100099. doi: 10.3389/fpls.2023.1100099
4. Sarikurkcü, C. (2011). Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* hildebr. tubers and leaves. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (5), 831–839.
5. Turan, M., and Mammadov, R. (2018). Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, larvicidal and anthelmintic activities and phenolic contents of & cyclamen alpinum. *J. Pharmacol. Pharm.* 09 (04), 17. doi: 10.4236/pp.2018.94008
6. Ali-Shtayeh, M.S.; Yaniv, Z.; Mahajna, J. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: A classification of the healing potential of medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2000, 73, 221–232.
7. Ali-Shtayeh, M.S.; Jamous, R.M.; Al-Shafie, J.H.; Elgharabah, W.A.; Kherfan, et al. Traditional knowledge of wild edible plants used in Palestine (Northern West Bank): A comparative study. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2008, 4, 13
8. Blasdale, W.C. *Cyclamen Persicum. Its Natural and Cultivated Forms*; Stanford University Press: London, UK, 1953; p. 49.
9. Mihci-Gaidi, G., Pertuit, D., Miyamoto, T., Mirjolet, J.-F., Duchamp, O., Mitaine-Offer, A.-C., et al. (2010b). Triterpene saponins from cyclamen persicum. *Natural Product Commun.* 5, 1023–1025. doi: 10.1177/1934578X1000500707
10. Yildiz, M., Bozcu, H., Tokgun, O., Karagur, E. R., Akyurt, O., and Akca, H. (2013). Cyclamen exerts cytotoxicity in solid tumor cell lines: a step toward new anticancer agents? *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 14 (10), 5911–5913. doi: 10.7314/APJCP.2013.14.10.5911
11. Cornea-Cipcigan, M., Bunea, A., Bouari, C. M., Pamfil, D., Pál, E., Urcan, A. C., et al. (2022a). Anthocyanins and carotenoids characterization in flowers and leaves of cyclamen genotypes linked with bioactivities using multivariate analysis techniques. *Antioxidants* 11, 1126. doi: 10.3390/antiox11061126
12. Curuk, P., Sogut, Z., Bozdogan, E., Izgu, T., Sevindik, B., Mohammad Tagipur, E., et al. (2015). Morphological characterization of cyclamen sp. grown naturally in Turkey: Part I. *South Afr. J. Bot.* 100, 7–15. doi: 10.1016/j.sajb.2015.03.199
13. Curuk, P., Sogut, Z., Izgu, T., Sevindik, B., Tagipur, E. M., Da Silva, J., et al. (2016). Morphological characterization of cyclamen sp. grown naturally in Turkey: Part II. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 15, 205–224.
14. Bhandari, H. R., Bhanu, A. N., Srivastava, K., Singh, M. N., and Shreya, H. A. (2017). Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. *Adv. Plants Agric. Res.* 7 (3), 279–286.
15. Taşkin, B. G., Vardareli, N., Doğaç, E., Mammadov, R., and Taşkin, V. (2012). Genetic diversity of natural cyclamen alpinum populations. *Turkish J. Biol.* 36 (4), 413–422.
16. Simsek, O., Curuk, P., Aslan, F., Bayramoglu, M., Izgu, T., Da Silva, J., et al. (2017). Molecular characterization of cyclamen species collected from different parts of Turkey by RAPD and SRAP markers. *Biochem. Genet.* 55, 87–102.