

**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

## **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Cercetări privind biologia unor taxoni de plante aparținând  
genului *Taxus* L. – surse de extracte vegetale cu potențial de  
biocontrol evaluat în condiții experimentale**

**Conducător de doctorat:**

**PROFESOR DR. EMERIT**

**MARIA-MAGDALENA ZAMFIRACHE**

**Student-doctorand:**

**MĂDĂLINA-ELENA FRUNZETE**

**IAȘI**

**2023**

## CUPRINS

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>LISTA ABREVIERILOR.....</b>                                                                                             | <b>7</b>  |
| <b>INTRODUCERE.....</b>                                                                                                    | <b>8</b>  |
| <b>PARTEA I – CONSIDERAȚII TEORETICE .....</b>                                                                             | <b>10</b> |
| <b>CAPITOLUL 1. EFECTUL UNOR SUBSTANȚE DE ORIGINE VEGETALĂ ASUPRA PROCESELOR DE GERMINAȚIE ȘI CREȘTERE LA PLANTE .....</b> | <b>10</b> |
| <i>1.1. Considerații ecologice .....</i>                                                                                   | <i>10</i> |
| <i>1.2. Substanțe cu activitate fitotoxică și moduri de acțiune .....</i>                                                  | <i>11</i> |
| <i>1.3. Semnificația interacțiunilor de tip alelopativ în ecosisteme naturale și antropizate .....</i>                     | <i>12</i> |
| <i>1.4. Substanțe alelopatice folosite ca bioerbicide .....</i>                                                            | <i>13</i> |
| 1.4.1. Avantaje și dezavantaje folosirii bioerbicidelor.....                                                               | 13        |
| 1.4.2. Biotehnologii pentru investigarea erbicidelor naturale .....                                                        | 14        |
| <i>1.5. Testarea „in vitro” a efectelor fitotoxice .....</i>                                                               | <i>15</i> |
| <b>CAPITOLUL 2. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND PROCESUL DE GERMINAȚIE .....</b>                                             | <b>15</b> |
| <i>2.1. Sămânța – origine și alcătuire .....</i>                                                                           | <i>15</i> |
| 2.1.1. Origine ontogenetică .....                                                                                          | 16        |
| 2.1.2. Părțile componente ale seminței.....                                                                                | 16        |
| <i>2.2. Germinația semințelor.....</i>                                                                                     | <i>16</i> |
| 2.2.1. Factorii germinației.....                                                                                           | 16        |
| 2.2.2. Metabolismul germinației.....                                                                                       | 16        |
| <b>CAPITOLUL 3. CONSIDERAȚII TEORETICE PRIVIND PROCESUL FIZIOLOGIC LA PLANTE (CU REFERIRI LA PLANTELE LEMNOASE) .....</b>  | <b>17</b> |
| <i>3.1. Regimul hidric .....</i>                                                                                           | <i>17</i> |
| 3.1.1. Regimul apei în viața arborilor .....                                                                               | 17        |
| 3.1.2. Absorbția apei de către plante lemnoase.....                                                                        | 17        |
| 3.1.2.1. Factori de mediu care influențează absorbția apei .....                                                           | 18        |
| 3.1.3. Circulația apei în corpul plantelor.....                                                                            | 18        |
| 3.1.4. Bilanțul hidric. Ofilirea plantelor .....                                                                           | 18        |
| <i>3.2. Procesul de transpirație.....</i>                                                                                  | <i>19</i> |
| 3.2.1. Factori care influențează transpirația .....                                                                        | 19        |
| 3.2.2. Particularități ale transpirației arborilor.....                                                                    | 19        |
| <i>3.3. Procesul de fotosinteză .....</i>                                                                                  | <i>20</i> |
| 3.3.1. Importanța fotosintezei în natură .....                                                                             | 21        |
| 3.3.2. Factori care influențează fotosinteza .....                                                                         | 21        |
| <i>3.4. Procesul de respirație .....</i>                                                                                   | <i>21</i> |
| 3.4.1. Respirația arborelui și a părților sale componente .....                                                            | 21        |

|                                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.2. Factori care influențează respirația.....                                                                                                    | 22        |
| 3.5. Rezistența la stresurile termic și hidric.....                                                                                                 | 22        |
| <b>CAPITOLUL 4. SITUL DE IMPORTANȚĂ COMUNITARĂ DEALU MARE - HÂRLĂU ROSCI 0076 - PREZENTARE GENERALĂ.....</b>                                        | <b>22</b> |
| 4.1. Caracterizarea sitului.....                                                                                                                    | 22        |
| 4.2. Prezentare generală.....                                                                                                                       | 23        |
| 4.3. Geologie/ Geomorfologie .....                                                                                                                  | 23        |
| 4.4. Pedologie.....                                                                                                                                 | 23        |
| 4.5. Hidrologie .....                                                                                                                               | 23        |
| 4.6. Aspecte climatologice .....                                                                                                                    | 23        |
| 4.7. Vegetația .....                                                                                                                                | 24        |
| 4.8. Fauna.....                                                                                                                                     | 24        |
| 4.9. Rezervația de tisă Tudora, județul Botoșani.....                                                                                               | 25        |
| <b>CAPITOLUL 5. SPECII STUDATE - PREZENTARE GENERALĂ.....</b>                                                                                       | <b>25</b> |
| 5.1. Taxoni ai genului <i>Taxus</i> L. ....                                                                                                         | 25        |
| 5.1.1. Încadrarea taxonomică.....                                                                                                                   | 25        |
| 5.1.2. Caractere morfologice.....                                                                                                                   | 27        |
| 5.1.3. Caractere anatomice .....                                                                                                                    | 28        |
| 5.2. Specii test .....                                                                                                                              | 29        |
| 5.2.1. <i>Amaranthus retroflexus</i> L.....                                                                                                         | 29        |
| 5.2.2. <i>Lycopersicon esculentum</i> Miller .....                                                                                                  | 30        |
| <b>PARTEA a II-a – CERCETĂRI PERSONALE.....</b>                                                                                                     | <b>30</b> |
| <b>SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR .....</b>                                                                                                     | <b>30</b> |
| <b>CAPITOLUL 6. MATERIAL ȘI METODE DE LUCRU .....</b>                                                                                               | <b>31</b> |
| 6.1. Material biologic.....                                                                                                                         | 31        |
| 6.2. Model experimental.....                                                                                                                        | 32        |
| 6.2.1. Prepararea extractelor.....                                                                                                                  | 33        |
| 6.2.2. Obținerea uleiurilor volatile .....                                                                                                          | 34        |
| 6.3. Metode și tehnici de cercetare .....                                                                                                           | 34        |
| 6.3.1. Metode de investigație în teren - Determinarea „ <i>in vivo</i> ” a intensității proceselor de fotosinteză, transpirație și respirație ..... | 34        |
| 6.3.2. Metode de investigație în laborator .....                                                                                                    | 35        |
| 6.3.2.1. Determinări morfologice - măsurarea suprafeței foliare .....                                                                               | 35        |
| 6.3.2.2. Determinări micro-morfologice și histo-anatomice .....                                                                                     | 35        |
| 6.3.2.3. Determinări biochimice.....                                                                                                                | 35        |
| 6.3.2.3.1. Determinarea conținutului de apă și de substanță uscată .....                                                                            | 35        |

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.3.2.3.2. Determinarea conținutului de cenușă (elemente minerale) și de substanțe organice.....                                                                                 | 35        |
| 6.3.2.3.3. Determinarea conținutului de pigmenți fotoasimilatori foliari.....                                                                                                    | 36        |
| 6.3.2.3.4. Determinarea conținutului de pigmenți antocianici din arili.....                                                                                                      | 36        |
| 6.3.2.3.5. Determinarea conținutului de pigmenți carotenoidici din arili .....                                                                                                   | 36        |
| 6.3.2.3.6. Determinarea conținutului de vitamina C din arili.....                                                                                                                | 36        |
| 6.3.2.3.7. Determinarea conținutului de polifenoli totali din extractele alcoolice .....                                                                                         | 36        |
| 6.3.2.3.8. Determinarea conținutului de flavonoide din extractele alcoolice .....                                                                                                | 36        |
| 6.3.2.3.9. Determinarea activității antioxidante a extractelor alcoolice .....                                                                                                   | 36        |
| 6.3.2.3.10. Evaluarea activității antidenaturante a extractelor alcoolice asupra proteinelor.....                                                                                | 37        |
| 6.3.2.4. Evaluarea calitativă a spectrelor de absorbție a hidrosolurilor și extractelor apoase și alcoolice .....                                                                | 37        |
| 6.3.2.5. Determinarea compoziției chimice a uleiurilor volatile de tisă prin GC-MS.....                                                                                          | 37        |
| 6.3.2.6. Identificarea taxolului prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) .....                                                                                | 38        |
| 6.3.2.7. Condiții experimentale de testare a extractelor apoase .....                                                                                                            | 38        |
| 6.3.2.7.1. Analiza indicilor de germinație .....                                                                                                                                 | 39        |
| 6.3.2.7.2. Determinări biometrice ale plantulelor nou formate .....                                                                                                              | 39        |
| <b>6.3.3. Analiza statistică.....</b>                                                                                                                                            | <b>39</b> |
| <b>CAPITOLUL 7. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....</b>                                                                                                                                  | <b>40</b> |
| <b>7.1. Cercetări privind biologia „in situ” și „ex situ” a unor taxoni ai genului <i>Taxus</i> L.....</b>                                                                       | <b>40</b> |
| <b>7.1.1. Modificări morfologice la nivel foliar, ca răspuns la acțiunea factorilor de mediu</b>                                                                                 | <b>40</b> |
| <b>7.1.2. Caracteristici micromorfologice și histo-anatomice ale frunzelor și tulpinilor, în funcție de acțiunea factorilor de mediu.....</b>                                    | <b>41</b> |
| 7.1.2.1 Caracteristici micromorfologice.....                                                                                                                                     | 41        |
| 7.1.2.2. Caracteristici histo-anatomice .....                                                                                                                                    | 43        |
| <b>7.1.3. Reacții fiziologice de răspuns la nivel foliar în corelație cu factori interni ai frunzei, cu factori de la suprafața frunzei, cu factori externi (de mediu) .....</b> | <b>47</b> |
| <b>7.1.4. Variația conținutului unor compuși biochimici din arili, ca răspuns la acțiunea factorilor de mediu .....</b>                                                          | <b>49</b> |
| 7.1.4.1. Conținutul de pigmenți antocianici (antociani) .....                                                                                                                    | 49        |
| 7.1.4.2. Conținutul de pigmenți carotenoidici (caroteni).....                                                                                                                    | 50        |
| 7.1.4.3. Conținutul de vitamina C .....                                                                                                                                          | 50        |
| <b>7.2. Cercetări privind compoziția biochimică „in situ” și „ex situ” a unor taxoni ai genului <i>Taxus</i> L.....</b>                                                          | <b>51</b> |
| <b>7.2.1. Compoziția biochimică a uleiurilor volatile extrase din frunze .....</b>                                                                                               | <b>51</b> |
| 7.2.1.1. Evaluarea calitativă a hidrosolilor/ hidrosolurilor.....                                                                                                                | 54        |

|                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.2.2. Identificarea și izolarea taxolului din extracte acetone.....                                                                                                                       | 56 |
| 7.3. Evaluarea calitativă, cantitativă și a posibilelor efecte ale unor extracte vegetale obținute din taxoni ai genului <i>Taxus</i> L. ....                                              | 58 |
| 7.3.1. Evaluarea calitativă a extractelor obținute din organe vegetative și de reproducere .....                                                                                           | 58 |
| 7.3.2. Evaluarea cantitativă a extractelor alcoolice .....                                                                                                                                 | 59 |
| 7.3.2.1. Conținutul total de polifenoli al extractelor alcoolice .....                                                                                                                     | 59 |
| 7.3.2.2. Conținutul total de flavonoide al extractelor alcoolice.....                                                                                                                      | 60 |
| 7.3.3. Evaluarea efectelor antioxidante și antidenaturante a extractelor alcoolice .....                                                                                                   | 61 |
| 7.3.3.1. Activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice .....                                                                                                                            | 61 |
| 7.3.3.2. Activitatea antidenaturantă a extractelor alcoolice.....                                                                                                                          | 61 |
| 7.3.4. Evaluarea în condiții experimentale de laborator a potențialului de biocontrol a unor extracte vegetale obținute din taxoni ai genului <i>Taxus</i> L. la specii de plante test ... | 64 |
| 7.3.4.1. Efecte asupra indicilor de germinație .....                                                                                                                                       | 64 |
| 7.3.4.2 Efecte asupra indicilor biometrici .....                                                                                                                                           | 65 |
| CONSIDERAȚII FINALE.....                                                                                                                                                                   | 66 |
| BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ .....                                                                                                                                                               | 73 |
| ANEXE .....                                                                                                                                                                                | 80 |

## MULȚUMIRI

Întreg parcursul stagiului doctoral a fost unul laborios, îndelungat, nelipsit de provocări și situații imprevizibile și nu aș fi reușit să definitivez această lucrare fără sprijinul necondiționat, îndrumarea și susținerea Doamnei Profesor universitar dr. emerit Maria-Magdalena Zamfirache, conducătorul științific al prezentei lucrări. La finalul acestei etape importante din viața mea personală și profesională se cuvine să îmi exprim cele mai respectuoase mulțumiri doamnei profesor, care, și de data aceasta cu profesionalism și rigurozitate științifică m-a ghidat și mi-a fost alături în perioada stagiului doctoral, dar și pe tot parcursul studenției mele.

În egală măsură sunt recunoscătoare fiecărui membru al Comisiei de Îndrumare pentru timpul acordat, sprijinul și sugestiile oferite pe parcursul studiilor doctorale. Așadar, se cuvin mulțumiri alese Doamnei Conferențiar universitar dr. Lăcrămioara Ivănescu, Doamnei Profesor universitar dr. emerit Zenovia Olteanu și Domnului Șef de lucrări dr. Marius Grigore.

Totodată, doresc să adresez sincere mulțumiri membrilor Comisiei de Referenți pentru amabilitatea de a analiza această lucrare.

Sunt recunoscătoare și mulțumesc Doamnei Profesor universitar dr. Liliana Bădulescu și Domnișoarei chimist dr. Violeta Ion pentru sprijinul oferit în realizarea analizei compoziției chimice a uleiurilor volatile, precum și Domnului Profesor universitar dr. habil. Marius Mihășan pentru echipamente, reactivi, implicare și colaborare în vederea realizării multor determinări biochimice, între care identificarea, izolarea și determinarea taxolului din extracte vegetale a reprezentat un moment aparte, consumator de timp și energie.

Adresez mulțumiri colegilor din cadrul Laboratorului de Fiziologie, doamnei tehnician (biolog) și tuturor persoanelor din cadrul Facultății de Biologie cu care am interacționat, m-au ajutat, sfătuit, încurajat și mi-au fost alături.

Nu în ultimul rând, doresc să îmi exprim recunoștința față de întreaga mea familie pentru nenumăratele dovezi de dragoste, încurajare și susținere permanentă.

## LISTA ABREVIERILOR

**T1** – *Taxus baccata* – spontan

**T2** – *Taxus baccata* – cultivat

**T3** – *Taxus baccata* ‘*Robusta*’ – cultivat

**IV** – aprilie (formarea strobililor)

**VI** – iunie (creșterea vegetativă intensă)

**IX** – septembrie (alocarea biomasei către rădăcini)

A – rata fotosintetică

E – rata transpirației

R – rata respirației

Qleaf - P.A.R. incident pe suprafața frunzei

tleaf – temperatura de la suprafața frunzei

Ci – CO<sub>2</sub> substomatal

gs – conductanța stomatală

WUE – eficiența utilizării apei

E/gs – raportul dintre rata transpirației și conductanța stomatală

\* – diferențe statistic semnificative pentru  $p < 0.05$

\*\* – diferențe statistic semnificative pentru  $p < 0.01$

\*\*\* – diferențe statistic semnificative pentru  $p < 0.001$

\*\*\*\* – diferențe statistic semnificative pentru  $p < 0.0001$

## INTRODUCERE

Interacțiunile între plante și factorii biotici și abiotici au determinat, pe parcursul stabilirii și consolidării lor, sinteza în organele acestora a unui număr mare de metaboliți secundari, produși cu proprietăți biologice specifice, de real interes pentru industria farmaceutică sau pentru agricultură, intens cercetați la ora actuală pe plan local, național și internațional.

În acest context, se consideră astăzi, că regnul vegetal reprezintă, prin diversitatea de specii, o bogată sursă de compuși cu potențial erbicid încă insuficient explorată și utilizată de către practicieni, *alelopatia* impunându-se ca soluție pragmatică în rezolvarea problemelor din agricultura modernă; astfel, abordări multiple, ca de exemplu rotația culturilor, culturile de acoperire, culturile intercalate, mulcirea, încorporarea reziduurilor de culturi și aplicarea de extracte apoase sunt doar câteva dintre direcțiile de cercetare dezvoltate cu tematică alelopatică, în vederea gestionării dăunătorilor agricoli, a atenuării stresului abiotic și biotic asupra plantelor de interes și a îmbunătățirii și creșterii producției agricole (Farooq și colab., 2013).

Privită din perspectiva efectelor practice urmărite și așteptate de agricultori, alelopatia este un fenomen ecologic natural, în care diferite organisme afectează funcționarea altor organisme din vecinătatea lor într-un mod negativ sau pozitiv (Rice, 1984), prin eliberarea de metaboliți secundari (Farooq și colab., 2011a), la nivelul interacțiunilor plante-plante legăturile între organismele partenere fiind generate de substanțe chimice produse și eliberate de către acestea în mediu pe diverse căi (volatilizare, exsudare, dizolvare etc.) (Wier și colab., 2004).

În cadrul metabolismului vegetal compușii sintetizați au diverse roluri: informațional, structural, energetic, de sinteză, de semnalizare (Soltys și colab., 2013), o categorie aparte reprezentând-o compușii cu rol de apărare sau de asigurare a competitivității. Între acești compuși există numeroase categorii, precum alcaloizii, flavonoidele, taninurile, acizii organici sau compușii volatili, substanțe care pot induce stimularea, la concentrații mari sau inhibiția, la concentrații mici a germinației și creșterii plantelor din jur (Narwal, 1999; Li și colab., 2010). Astfel, compușii fenolici și terpenoidele pot acționa diferit, în raport cu diverse organisme vegetale: aceștia pot inhiba sinteza lipidică și proteică, pot altera fotosistemul I (Hirata și colab., 2003) și fotosistemul II (Einhellig, 1993; Dayan și Duke, 2006), pot inhiba prelucrarea nutrienților ori germinația sau pot



modifica rata de transpirație și respirație (Rimando și colab., 1998; Abraham și colab., 2003; Dayan și Duke, 2006).

În lumina celor prezentate au fost aleși spre studiu diverși taxoni de *Taxus*, ca sursă potențială de compuși cu rol de biocontrol (Reigosa și colab., 1999), genul fiind bogat în compuși cu activitate fitotoxică (fenoli, flavonoide, alcaloizi) (Das și colab., 1998; Parmar și colab., 1998). *Taxus baccata* L. – tisa - este un gimnosperm dioic, prezent în toată Europa, cu populații dispersate, care se extind până în Africa de Nord și Orientul Mijlociu (Thomas și Polwart 2003). Specia este cunoscută ca fiind una dintre cele mai tolerante specii de arbori la umbră din flora europeană (Ellenberg și colab., 1992; Thomas și Polwart 2003; Iszkulo și Boratynski 2006, cf. Devaney și colab., 2015); puieții săi supraviețuiesc în umbra puternică a tiselor mature și cresc frecvent sub coroanele dense de *Tilia*, *Acer*, *Carpinus*, *Picea* și *Abies*, dar și sub coroanele mai deschise de *Quercus* sau *Pinus* și chiar în plin soare (Iszkulo și Boratynski 2006, Thomas și Polwart 2003).

Din punctul de vedere al preferințelor ecologice, *tisa* se întâlnește, în general, în zonele cu climă oceanico-montană și se dezvoltă bine în condiții de adăpost și umbră (păduri), cu umiditate atmosferică relativ ridicată. Specia este, de asemenea, sensibilă la secetă (Șofletea și colab., 2007, cf. Bîrsan și colab., 2017). În România este considerată o specie vulnerabilă și rară (Oltean și colab., 1994), fiind o specie ocrotită de lege și declarată monument al naturii distribuită sporadic în păduri pure de fag, dar și în păduri mixte de conifere și fag unde joacă roluri ecologice și de mediu importante (Sârbu și colab., 2013; Alavi și colab., 2020).

În contextul celor prezentate, cercetările care fac subiectul prezentei teze urmăresc, pe de o parte, să evidențieze câteva aspecte referitoare la biologia unor taxoni ai genului *Taxus* L. spontani și cultivați în zona de NE a țării în funcție de factori specifici de influență (factori interni, care țin de suprafața foliară și factori externi), prin determinări de ordin anatomic, micro-morfologic, fiziologic și biochimic, realizate pe parcursul a trei faze fenologice specifice ciclului său ontogenetic. Pe de altă parte, rezultatele analizelor noastre evaluează posibilul potențial alelopat (de bioerbicid) al extractelor apoase de concentrații diferite obținute din diverse organe ale respectivilor taxoni, interpretând efectele induse de acestea, în condiții experimentale de cultivare în laborator, asupra procesului de germinație și de dezvoltare a plantulelor rezultate la două specii de plante test: *Amaranthus retroflexus* L. (specie de buruiană cu frunză lată) și *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia (specie de cultură).

## **PARTEA I – CONSIDERAȚII TEORETICE**

### **CAPITOLUL 1. EFECTUL UNOR SUBSTANȚE DE ORIGINE VEGETALĂ ASUPRA PROCESELOR DE GERMINAȚIE ȘI CREȘTERE LA PLANTE**

#### ***1.1. Considerații ecologice***

În diferite regiuni ale globului pământesc plantele nu cresc în mod hazardat, respectiv la întâmplare, ci ele formează asociații și comunități ecologice bine definite, adaptate la condițiile de viață specifice, caracteristice unui anumit areal geografic, care deține particularități constitutive specifice (Corbu și Cachiță-Cosma, 2010). Anumite substanțe eliberate în mediu de către plante exercită asupra acestora sau a altor plante (ori asupra multor altor viețuitoare aflate în imediata lor vecinătate) influențe variate, mai mult sau mai puțin severe. Acțiunea unor astfel de produși secundari de metabolism pot favoriza sau defavoriza viața altor organisme învecinate, care recepționează în mod diferit „mesajele chimice” interceptate, în funcție de natura acestora, respectiv de gen, specie sau genotip, dar și de starea lor fiziologică. Acest fenomen complex a fost denumit **alelopatie**, fenomen natural în care diferite organisme afectează funcționarea altor organisme din vecinătatea lor, în mod negativ sau pozitiv, prin eliberarea de metaboliți secundari (Bhadoria, 2011; Bajwa, 2014; Kostina-Bednarz și colab., 2023). ansamblu de factori în care condițiile de mediu joacă un rol major (Bhadoria, 2011).

Termenul de „*allelopathie*” derivă de la cuvintele grecești „*allelon*” = reciproc și „*pathos*” = suferință; el definește suferința provocată unei plante de către o altă plantă (Rizvi și colab., 1992). Termenul a fost folosit pentru prima dată de fiziologul austriac Hans Molisch în anul 1937, în cartea sa *Allelopathie*, pentru a include atât interacțiunile biochimice dăunătoare, cât și pe cele benefice între toate tipurile de plante, inclusiv microorganisme (Scavo și colab., 2018).

Pe baza definițiilor anterioare ale alelopatiei și a încercărilor de a explica mecanismul de acțiune al acesteia, Societatea Internațională de Alelopatie (IAS) a definit **alelopatia** ca fiind știința care "*studiază orice proces care implică metaboliți secundari produși de plante, alge, bacterii și ciuperci care influențează creșterea și dezvoltarea sistemelor agricole și biologice*" (Duke 2010; Kostina-Bednarz și colab., 2023).

Unul dintre cele mai notabile și vechi exemple de *alelopatie* este acela al *nucului negru* (*Junqlans nigra* L.), deoarece juglona (5-hidroxi-1,4-naftochinona) a fost primul

compus alelopativ descris. Juglona este obținută în principal din frunze, rădăcini și cojile fructelor acestei specii și a demonstrat efecte inhibitoare asupra creșterii întregii plante la speciile precum tomate, lucernă, soia și castraveții (Durán și colab., 2019; Rietveld și colab., 1983; Terzi și colab., 2003; Babula și colab., 2014; Macías și colab., 2020). Pliniu cel Bătrân (23-79 d.Hr.) a fost primul care a observat că "*umbra nukului este otrăvitoare pentru toate plantele aflate în raza sa de acțiune*" (Durán și colab., 2018).

Un alt exemplu de specie cu activitate alelopativă este sorgul (*Sorghum bicolor* L.) care produce o varietate de compuși alelopatici, dintre care cei mai importanți sunt p-benzochinona hidrofoabă (sorgoleona), fenolii și glicozidele acianogene (Abbas și colab., 2021). Sorgoleona și forma sa resorcinol (1,4-dihidroxilată) reprezintă 90 % din compușii prezenți în exudatele rădăcinilor de sorg (Glaab și colab., 2017). Aceasta este toxică pentru numeroase alte specii de plante, precum buruieni ca *Phalaris minor* L., *Chenopodium album* L., *Rumex dentatus* L. și *Convolvulus arvensis* L. (Bhadoria, 2011).

### **1.2. Substanțe cu activitate fitotoxică și moduri de acțiune**

Alelopatia este considerată un fenomen multidimensional, care se produce constant în ecosistemele naturale și antropice (Gniazdowska și colab., 2005), fiind definită ca interacțiunea ce se realizează între plante și microorganisme printr-o varietate de compuși, denumiți de obicei *alelopatine*, *alelochimice* sau *compuși alelopatici*. Determinarea practică a calității și cantității efectelor directe sau indirecte ale compușilor alelopatici asupra comunităților de plante sau asupra microorganismelor din mediul natural este foarte dificil de realizat, datorită caracterului multidimensional al acestor interacțiuni, motiv pentru care a fost necesară dezvoltarea unor tehnici analitice care să permită o mai bună specificare a efectelor directe ale *alelopatinelor*, cercetările acestui fenomen fiind mutate astfel din câmp în laboratoare.

Termenul de „**alelopatie**” se referă mai degrabă la interacțiunile care apar în mediul natural (Soltys și colab., 2013). În studiile cu extracte obținute din plante, cu alelopatine izolate din țesutul vegetal, colectate din exudate sau chiar cu compuși sintetici identici cu cei naturali s-a definit termenul „fitotoxicitate”, pentru a distinge alelopatia (ca un fenomen care apare în mediul natural) de studiile efectuate în laborator.

Activitatea fitotoxică a anumitor specii și a extractelor obținute din acestea se datorează prezenței unor substanțe chimice și efectelor pe care acestea le produc, în principal metaboliți secundari derivați ai căilor metabolice primare (Weir și colab., 2004; Iqbal și colab., 2012). Metaboliții secundari defensivi implicați în interacțiunile alelopatiche cuprind o gamă foarte largă de compuși chimici, dintre care cei mai reprezentativi sunt compușii

fenolici (fenoli simpli, flavonoide, chinone, cumarine etc.), terpenoidele (mono-, di- și triterpene, sesquiterpene și steroizi) și compușii care conțin un atom de azot (de exemplu, benzoxazinoidele) (Scavo și Mauromicale, 2021).

Multe substanțe potențial alelopatiche prezintă o activitate biologică slabă asupra plantelor din sol din cauza levigării rapide a compușilor foarte solubili în apă și a instabilității sau a degradării rapide a acestora de către microorganisme (Mehdizadeh și Mushtaq 2019). Cercetări recente au dovedit că sinergismul substanțelor alelopatiche poate crește biodisponibilitatea, din cauza distribuției preferențiale, ceea ce conduce la o persistență sporită a amestecurilor alelochimice în compoziția solului (Kostina-Bednarz și colab., 2023).

Numeroase studii efectuate cu extracte obținute din diferite specii de plante au demonstrat că efectele toxice ale substanțelor alelopatiche se bazează pe întârzierea germinării semințelor și pe inhibarea creșterii răsadurilor. Inhibarea creșterii poate genera, de asemenea, deformări anatomo-morfologice la nivelul vârfului rădăcinii. Acizii fenolici, la fel ca și cumarinele, prezintă efecte inhibitorii similare asupra creșterii plantelor și induc deformări morfologice ale rădăcinilor (Kumar și colab., 2020).

Compușii alelopatici afectează germinarea și creșterea plantelor vecine prin perturbarea diferitelor procese fiziologice, inclusiv fotosinteza, respirația, regimul de apă și echilibrul hormonal, în principal prin inhibarea activității enzimelor. Conform literaturii, capacitatea unei substanțe alelochimice de a inhiba sau întârzia creșterea plantelor și/sau germinarea semințelor este de obicei definită drept potențialul său „alelopativ (sau fitotoxic)” (Soltys și colab., 2013).

### ***1.3. Semnificația interacțiunilor de tip alelopativ în ecosisteme naturale și antropizate***

Comunicarea chimică între organismele vegetale, dar și între acestea și alte tipuri de organisme (microorganisme, animale etc.) este un fenomen care a apărut și s-a dezvoltat pe parcursul evoluției ecosistemelor. Această comunicare, alături de alte tipuri de interacțiuni, a dus la conturarea biocenozelor prin efecte co-evolutive (Sinkkonen, 2006). Implicarea relațiilor de tip alelopativ în organizarea ecosistemelor este valabilă nu doar pentru cele terestre, ci și pentru cele acvatice (Erhard, 2006) și marine (Granéli și Pavia, 2006).

Interacțiunile alelopatiche și-au găsit aplicații în agricultură din timpuri îndepărtate ale istoriei, una din principalele probleme ale cultivării plantelor pe scară largă constituind-o prezența speciilor invazive (segetale), care pot produce pierderi semnificative de recoltă; ca urmare, lupta împotriva acestora a necesitat utilizarea, în timp, a unei largi game de substanțe cu efect erbicid. Astfel de substanțe, utilizate în prezent, sunt de origine sintetică, fapt ce introduce o serie de dezavantaje, între care amintim: contaminarea apei potabile cu substanțe

toxice, contaminarea lanțului trofic cu pesticide și apariția de plante segetale rezistente la erbicide (Liu și colab., 2008).

Interacțiunile alelopatiche în agroecosisteme constituie baza unor tehnici destinate creșterii productivității și reducerii numărului de indivizi aparținând speciilor segetale. Astfel de tehnici, între care amintim rotația culturilor, intercultivarea și utilizarea de mulci, se bazează pe substanțele chimice eliberate de către plante pe parcursul dezvoltării lor sau prezente în reziduuri vegetale. Tot în aceste sisteme agricole pot fi utilizate pentru combaterea unor dăunători din clasa fungilor fitopatogeni, a insectelor sau a nematodelor diverse reziduuri din plante sau preparate vegetale (Narwal, 2006).

În ecosisteme forestiere interacțiunile de tip alelopatic joacă un rol deosebit în procese precum invazia unor specii exotice, inhibiția creșterii puieților și alterarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale solului (Reigosa și González, 2006). Din acest motiv, identificarea existenței acestor interacțiuni și descifrarea mecanismelor lor de realizare sunt fundamentale pentru stabilirea de practici agroforestiere eficiente.

#### ***1.4. Substanțe alelopatiche folosite ca bioerbicide***

##### **1.4.1. Avantajele și dezavantajele folosirii bioerbicidelor**

Modul de acțiune al unor substanțe alelopatiche este similar cu cel al erbicidelor sintetice, utilizarea acestor substanțe la momentul actual în managementul buruienilor, ca bioerbicide, constituind o direcție de cercetare de strictă actualitate. Până în prezent, doar 3% din cei aproximativ 400 000 de compuși cunoscuți ca având activitate alelopatică au fost recunoscuți acționând ca bioerbicide, deși peste 2000 de specii de plante prezintă efecte alelopatiche puternice (Li și colab., 2019).

Compușii alelopatici sunt foarte atractivi ca noi clase de erbicide, datorită unei largi varietăți de avantaje, deși, în perspectiva obținerii bioerbicidelor bazate pe substanțe alelopatiche, efectele cauzate de acești compuși asupra plantelor țintă sunt de asemenea clasificate drept „fitotoxice” (Soltys și colab., 2013).

Caracterizate printr-o largă diversitate, substanțele alelopatiche pot constitui instrumente valoroase de luptă împotriva buruienilor din culturile agricole; datorită proprietăților lor, acestea pot fi utilizate în efortul de descoperire de noi situs-uri țintă specifice în plantele acceptante. Pe lângă capacitatea de a inhiba procesele de fotosinteză sau respirație, respectivii compuși alelopatici se pot lega și de proteine la diferite locus-uri comparative cu erbicidele sintetice (Nimbal și colab., 1996; Dayan și colab., 2009), fapt ce

le poate conferi capacitatea de a elimina buruienile deja rezistente la erbicidele sintetice cu același mod de acțiune, comercializate la această oră pe piața agricolă.

În ciuda numeroaselor lor avantaje, substanțele alelopatiche prezintă unele limitări în ceea ce privește utilizarea directă ca bioerbicide. Este destul de greu de a se stabili modurile diferite de acțiune ale fiecărei clase de compuși alelopatici, precum și determinarea modului în care condițiile de mediu afectează activitatea acestora. De asemenea, la conceperea noilor bioerbicide trebuie să se țină cont de faptul că efectele alelopatiche variază între soiuri sau genotipuri, deoarece nu este obligatoriu ca plantele cu o proximitate taxonomică apropiată să aibă efecte alelopatiche similare (Motmainna și colab., 2021).

#### **1.4.2. Biotehnologii pentru investigarea erbicidelor naturale**

Studiile de explorare a interacțiunilor alelopatiche s-au dezvoltat mult în decursul timpului, beneficiind de efortul unor echipe largi de specialiști și de tehnici de investigație biochimică tot mai performante, care au îmbunătățit identificarea compușilor alelopatici și au completat cunoștințele despre natura, biosinteza și modul lor de acțiune acceptându-se, pe baza unor dovezi clare faptul că acești metaboliți secundari sintetizați și eliberați de plante pot lua parte la interacțiunile ecologice inter și intra-specifice foarte complexe în mediu (Soltys și colab., 2013).

Dezvoltarea bioerbicidelor este mult mai complicată decât a celor de sinteză, deoarece substanțele bioactive trebuie mai întâi izolate în mod corespunzător din extractele de plante, iar masa extractibilă a compușilor recuperați este de obicei mică în comparație cu procesul simplu de producere a unor cantități mari de erbicide prin sinteză chimică (Soltys și colab., 2013; Kostina-Bednarz și colab., 2023).

Compușii alelopatici ar putea fi utilizați ca șabloane pentru sintetizarea unor noi ierbicide. Literatura de specialitate prezintă mai multe studii care au fost efectuate pentru a dezvolta bioerbicide folosind cumarinele datorită bioactivității lor, iar rezultatele au arătat că unii dintre compuși au avut același efect inhibitor asupra buruienilor ca și ierbicidul comercial acetoclor (Zhao și colab., 2021). În lucrarea realizată de Zhao și colab., (2021), au fost proiectate și sintetizate o serie de noi derivați de fenoxipiridină care conțin produsul natural cumarină. Acești compuși au prezentat o activitate alelopatică excelentă în condiții de seră, similară cu ierbicidul comercial oxifluorfen; testele de selectivitate a culturilor au arătat că porumbul, bumbacul și soia au avut o toleranță excelentă la noul compus, dar orezul și grâul au fost afectate (Zhao și colab., 2021; Kostina-Bednarz și colab., 2023).

Alelopatia ar putea fi utilizată în două scopuri principale: agricultură și fitomedicină. În domeniul agriculturii, se pot aplica extracte sau fracții îmbogățite din plante, reziduuri ale

acestora sau compuși bioactivi puri ori formulări nou dezvoltate prin metode de încapsulare în: combaterea buruienilor într-un mod ecologic; creșterea gradului de dezvoltare și a randamentului altor culturi; combaterea insectelor dăunătoare; combaterea bolilor cauzate de microorganisme; îmbunătățirea penetrării și solubilității pesticidelor în sol ( Farooq și colab., 2011; Sunulahpašić și colab., 2017; Lim și colab., 2019; Walker și colab., 2018; Macías și colab., 2019) sau în cadrul domeniului fitomedicinii (Macias și colab., 2008). Aceste abordări ar putea fi utilizate și pentru dezvoltarea de noi medicamente prin modificarea sintetică a compușilor principali, îmbunătățirea biodisponibilității, precum și aplicarea unui extract îmbogățit în căutarea unor medicamente mai eficiente și mai eficace pentru tratamente împotriva unor boli (Macias și colab., 2020).

### ***1.5. Testarea „in vitro” a efectelor fitotoxice***

Evaluarea acțiunii fitotoxice a diversilor compuși chimici, inclusiv cei de origine vegetală, poate fi realizată în condiții *in vitro*, folosind specii de plante test, care corespund anumitor cerințe: viteză crescută de germinație, sensibilitate față de respectivii compuși testați (Dayan și Duke, 2006; Reigosa și colab., 2013). Se recomandă, de asemenea, testarea activității pe mai multe specii test, cu caracteristici diferite (morfologie, structuri anatomice, compoziție biochimică etc.), pentru a putea surprinde diferite grade de activitate și, eventual, moduri diferite de acțiune a respectivilor compuși. Printre aceste specii se numără ridichea, castravetele, salata, tomate etc.

În acest context, în determinările practice care fac subiectul cercetărilor de față s-au ales pentru germinare semințe aparținând la două specii de plante: știrul - *Amaranthus retroflexus* L., specie ruderală cu frunza lată prezentă în culturile agricole – și roșia - *Lycopersicon esculentum* Miller, plantă de cultură, – specii cu o germinație rapidă, cu sensibilitate față de acțiunea unor factori externi (stresanți), ale căror semințe diferă morfologic și structural (de dimensiuni mai mici la *Amaranthus* și mai mari la *Lycopersicon*, cu un tegument mult mai gros).

## **CAPITOLUL 2. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND PROCESUL DE GERMINAȚIE**

### ***2.1. Sămânța – origine și alcătuire***

Sămânța înseamnă începutul unei vieți noi. Ea conține noul individ în forma lui incipientă, embrionară, înzestrat cu tot ce este necesar, inclusiv rezerva de hrană pentru primele faze ale creșterii și dezvoltării.

După formare, sămânța crește și se dezvoltă, căpătând mărimea, greutatea, însușirile fiziologice și ereditare ce o fac aptă să reproducă organismul pe care s-a format. În condiții de mediu corespunzătoare fiecărei specii, sămânța trebuie să treacă de la viața latentă la viața activă și să dea noi plante. Semințele ies din starea de repaus, impusă de condițiile de mediu sau endogene, prin procesul de germinație.

#### **2.1.1. Origine ontogenetică**

Sămânța provine din ovul în urma procesului de dublă fecundație la angiosperme. Din zigotul principal va lua naștere embrionul, din zigotul secundar (accesoriu) va rezulta un țesut hrănitor - albumenul sau endospermul secundar, iar din integumentele ovulului se va forma tegumentul seminței (seminal). Acest complex tisular alcătuit din embrion, endosperm și tegument poartă numele de sămânță. Toate transformările suferite de ovul după fecundație au menirea de a asigura hrănirea și apărarea embrionului până când acesta ajunge în condiții favorabile pentru a reproduce un nou individ (Bădulescu, 2009).

#### **2.1.2. Părțile componente ale seminței**

Cu toate variațiile privind forma, mărimea, culoarea, numărul etc., o sămânță matură cuprinde următoarele componente: tegument seminal, embrion, endosperm sau albumen și perisperm (acolo unde există) (Ungurean, 1966, cf. Bădulescu, 2009).

### ***2.2. Germinația semințelor***

**Germinația semințelor** reprezintă procesul prin care acesta inițiază un nou ciclu de dezvoltare ontogenetică, când sunt asigurate condiții favorabile de mediu (Burzo și colab., 2004, cf. Bădulescu 2009).

#### **2.2.1. Factorii germinației**

Germinația semințelor este determinată de acțiunea factorilor diferiți ai mediului extern, de structura semințelor, de stadiul lor de dezvoltare, de prezența diferitelor substanțe și în primul rând a enzimelor în compoziția acestora. Astfel, germinația semințelor se desfășoară dependent de o serie de factori, care se pot grupa în: **factori interni și factori externi**.

#### **2.2.2. Metabolismul germinației**

În cursul germinației se petrec în semințe transformări biochimice complexe, substanțele depozitate în țesuturile de rezervă fiind treptat utilizate în procesele derulate în acest interval de timp. Germinația, prin care se inițiază un nou ciclu de dezvoltare ontogenetică, cuprinde patru etape importante cu procese specifice.



### **CAPITOLUL 3. CONSIDERAȚII TEORETICE PRIVIND PROCESELE FIZIOLOGICE LA PLANTE (CU REFERIRI LA PLANTELE LEMNOASE)**

Literatura de specialitate națională și internațională pe care am avut posibilitatea să o consultăm prezintă, în general, procesele fiziologice realizate de plantele ierboase, descriu anumite procese funcționale înregistrate la plantele lemnoase, în special angiosperme, cu o suprafața foliară mare, destul de ușor accesibilă cercetărilor pe teren, *in vivo* și conține mult mai puține date referitoare la funcțiile coniferelor, între care se numără și arborii din familia *Taxaceae*, considerată una dintre cele mai vechi enigme din sistematica gimnospermelor, cu un loc mult controversat printre conifere, inclusiv cei din genul *Taxus*, gen cu o poziție taxonomică specială, încă dezbătută de specialiști la ora actuală.

Ca urmare, prezentul capitol încearcă o prezentare sintetică a informațiilor referitoare la funcțiile de nutriție ale plantelor superioare, punând împreună date disponibile din literatura națională, cu unele completări preluate din articole și tratate internaționale, care fac referire la plante lemnoase și conifere, cu exemplificări la taxoni ai genului *Pinus*, de departe cel mai mult studiat gen din acest punct de vedere, dar și ai genului *Taxus*, gen extrem de dificil de delimitat în specii, subspecii și varietăți doar pe baza trăsăturilor morfologice.

#### **3.1. Regimul hidric**

##### **3.1.1. Regimul apei în viața arborilor**

Prezența apei într-o cantitate suficientă reprezintă un factor primordial pentru supraviețuirea, creșterea și dezvoltarea plantelor. Posibilitățile de aprovizionare cu apă, lumina și valorile temperaturii sunt factori ecologici principali în repartizarea vegetației forestiere, determinând zonarea altitudinală și latitudinală a acesteia (Grudnicki, 2006).

Regimul de apă al plantelor prezintă trei momente: *absorbția, circulația și eliminarea în mediul extern*. Raportul între cantitatea de apă absorbită de plante și cea pe care o elimină în unitatea de timp reprezintă *bilanțul hidric*. Pentru întreținerea unei balanțe normale, este necesar ca pierderea apei să fie compensată de absorbția ei. Dacă în anumite condiții, cantitatea de apă pierdută o întrece pe cea procurată prin absorbție, apare în țesuturi un *deficit hidric* (Murariu, 2002).

##### **3.1.2. Absorbția apei de către plante lemnoase**

Plantele lemnoase prezintă un sistem radicular ce diferă în raport cu specia și condițiile de sol în care cresc. Extinderea sistemului radicular depinde de condițiile de aerație

și structura fizică a solului. Pentru realizarea unei suprafețe de absorbție cât mai mare, rădăcina prezintă o ramificație bogată și, cel puțin în fazele tinere, un număr mare de peri absorbanți. Aceștia sunt prezenți la rădăcinile puieților și la vârfurile ramificațiilor rădăcinilor plantelor și au un perete celular bogat în celuloză, iar la exterior un strat subțire peptidic sau un înveliș gelatinos, ce constituie o fază umedă care intervine în schimburile de apă dintre sol și rădăcină (Parascan și colab., 2001).

#### *3.1.2.1. Factori de mediu care influențează absorbția apei*

**a. Apa din sol și accesibilitatea ei pentru plante.** Plantele pot absorbi apa din sol când aceasta ajunge în contact cu zona activă de absorbție și dacă forța de reținere a apei de către particulele solului nu depășește forța de sugere a rădăcinilor.

**b. Concentrația soluției solului.** În regiunile în care regimul de precipitații are valori normale și în cele acoperite de pădure, forța osmotică a soluției solului nu este limitativă în procesul de absorbție al apei.

**c. Aerația solului.** Pe solurile cu exces de umiditate sau pe cele cu număr redus de capilare, sistemul radicular suferă din lipsa de oxigen și ca urmare a acumulării unui surplus de dioxid de carbon. În aceste condiții pot vegeta numai plantele cu adaptări speciale, lipsa oxigenului o perioadă mai lungă ducând, în timp, la intoxicarea rădăcinilor.

**d. Temperatura solului.** La temperaturi cuprinse între 15°C și 40°C absorbția apei se desfășoară normal la majoritatea plantelor. Scăderea temperaturii duce la mărirea vâscozității protoplasmei și micșorarea permeabilității ei pentru apă. De asemenea, temperaturile ce depășesc 40°C provoacă o rigidizare a protoplasmei și, deci, o scădere a permeabilității ei (Parascan și colab., 2001).

#### **3.1.3. Circulația apei în corpul plantelor**

În plantele lemnoase apa absorbită parcurge distanțe mari, de la nivelul țesuturilor rădăcinii, prin tulpină, până la mezofilul frunzelor, de unde, după utilizarea în procese fiziologice care implică prezența sa, este eliminată în exterior. Ascensiunea apei prin vasele xilemului de la rădăcină până la ultimele nervuri din frunze se realizează, în principal, prin aspirația apei, ca urmare a transpirației și prin împingerea acesteia datorată presiunii radiculare.

#### **3.1.4. Bilanțul hidric. Ofilirea plantelor**

Între cantitatea de apă absorbită și cea transpirată există un raport, numit *bilanț hidric*. În zilele cu umiditate normală și nu prea calde, bilanțul de apă este echilibrat,

deoarece transpirația corespunde cu absorbția apei. În zilele de vară cu insolație puternică transpirația crește, iar în plante apare deficitul de apă.

Între cauzele deficitului de apă pot fi enumerate dezarmonia între funcțiile sistemului foliar și radicular sau lipsa apei din sol. Când solul este bine aprovizionat cu apă, deficitul de apă în plante apare uneori numai în timpul zilelor foarte călduroase, acesta având valori mici, de 5—10%. Ofilirea poate fi *temporară și permanentă*.

### **3.2. Procesul de transpirație**

Procesul de transpirație - eliminarea în atmosferă a apei din organismul plantelor sub formă de vapori - constituie o evaporare a acesteia controlată de structura frunzei și de activitatea stomatică, însușiri ce depind, la rândul lor, de adaptările plantelor la condițiile de mediu.

Date din literatura de specialitate indică faptul că transpirația plantelor reprezintă aproximativ 61% din evapotranspirația globală (Schlesinger și Jasechko, 2014); cea mai mare parte a pierderilor de apă se produce prin frunze, iar stomatele controlează în mare măsură transpirația foliară. Reglarea deschiderii stomatelor este foarte complexă, deoarece stomatele răspund la o varietate de influențe de mediu (de exemplu, lumina, umiditatea, temperatura, concentrația de CO<sub>2</sub>) și endogene (de exemplu, producția și eliberarea de hormoni la nivelul rădăcinilor și frunzelor, vârsta) (Pallardy, 2008).

#### **3.2.1. Factori care influențează transpirația**

##### **A. Factori externi**

Intensitatea transpirației depinde într-o mare măsură de factorii mediului înconjurător, dintre care o influență semnificativă o au lumina, temperatura, presiunea atmosferică, curenții de aer, umiditatea solului și a aerului.

##### **B. Factori ce țin de natura plantei**

Deși procesul de transpirație este controlat în mod special de factori fizici, acesta nu are un parcurs asemănător la toate plantele lemnoase care vegetează în aceleași condiții de mediu, fiind influențat de factori interni, precum suprafața frunzelor, raportul dintre suprafața rădăcinilor și a frunzelor, gradul de deschidere a stomatelor, numărul, mărimea și poziția lor, etc.

#### **3.2.2. Particularități ale transpirației arborilor**

Transpirația plantelor lemnoase este influențată atât de caracteristici proprii fiecărei specii în parte, cât și de factorii mediului. Când în sol există suficientă apă, transpirația este corelată cu factorii climatici, în special cu temperatura, iar în stepă și silvostepă, unde

umezeala în sol este foarte scăzută, procesul de transpirație este corelat în primul rând cu rezerva de apă din sol.

În raport cu vârsta, s-a constatat că la puietii rata transpirației este mai mare decât la arborii adulți, iar raportată la timp și unitatea de suprafață foliară, rata transpirației este mai mică la rășinoase, ale căror frunze prezintă structuri mai adaptate pentru stoparea acestui proces, decât la foioase. În același timp, suprafața foliară a unui arbore rășinos este mult mai mare decât a unui arbore foios, astfel că, la coroane de mărimi asemănătoare, rășinoasele pierd mai multă apă decât foioasele (Burzo și colab., 2005).

**Gutația**, ca proces de eliminare apei de către plante sub formă de picături, se produce când, după o perioadă călduroasă, în care aprovizionarea cu apă s-a făcut în mod normal, în mediu apar mase reci de aer, condiții în care temperatura mediului scade, iar umiditatea relativă a aerului crește până la valori aproape de saturare, fenomene ce determină inhibarea procesului de transpirație. În același timp absorbția apei la nivel radicular din sol se desfășoară în ritm normal, iar presiunea radiculară determină ascensiunea sevei brute până la nivelul frunzelor, unde apa se elimină sub formă de picături. Gutația are o importanță foarte mică pentru plantele lemnoase și se întâlnește doar accidental, atunci când intensitatea transpirației este prea mică. La conifere procesul de gutație nu se manifestă (Burzo și colab., 2005).

### ***3.3. Procesul de fotosinteză***

Fotosinteza plantelor este un proces biologic, fizic și chimic complex în care plantele convertesc energia luminoasă în energie chimică și realizează sinteza materiei organice, care este premisa și baza tuturor activităților fiziologice ale plantelor, iar nivelul de eficiență fotosintetică reflectă nu numai eficiența utilizării energiei luminoase în plante, ci și potențialul de creștere și capacitatea de rezistență la stres (Iszkulo, 2010; Adams și colab., 2018; Yin și colab., 2022).

**Plantele lemnoase** se încadrează din punct de vedere fotosintetic în tipul C3, specific plantelor din zonele temperate. În cazul acestora fotosinteza înregistrează variații atât în funcție de specie, cât și la nivelul unei singure plante datorită coroanei arborilor în care captarea luminii de către frunze variază în timp și spațiu. Frunzele tinere de *Pinus taeda* de exemplu, realizează o fotosinteză pozitivă după aproximativ 40 de zile de la dezmugurit, pentru ca după 3 luni de la dezmugurit intensitatea fotosintetică să devină egală sau o depășește pe cea a frunzelor mai bătrâne cu un an. Când frunzele au atins peste 90% din dimensiunile maxime procesul fotosintetic se desfășoară cu intensitatea cea mai mare (Radoglou și Teskey cf Burzo și colab., 2005).

Parametrul funcțional numit **rată de asimilație**, care reprezintă cantitatea de substanță organică acumulată de unitatea de suprafață foliară, variază în cazul plantelor conifere tinere între 3-10 mg substanță uscată/dm<sup>2</sup>/zi în perioada de creștere și între 10 -50 mg/dm<sup>2</sup>/zi în perioada maximă de acumulare.

### **3.3.1. Importanța fotosintezei în natură**

Fotosinteza reprezintă procesul prin care are loc absorbția energiei solare cu ajutorul pigmentilor asimilatori din frunză, urmată de transformarea ei în energie chimică ce este folosită pentru sinteza unor substanțe organice, prin reducerea dioxidului de carbon captat din atmosferă.

Carbonul se găsește în compoziția a 90 – 95% dintre substanțele structurale ale organismelor vegetale, principala sursă de carbon a plantelor verzi fiind reprezentată de dioxidul de carbon preluat de către acestea din atmosferă. Fiind un proces de mare amploare, plantele verzi de uscat încorporează în fiecare an aproximativ 20 miliarde tone de dioxid de carbon, ca rezultat al procesului fotosintetic fiind stocate, în decursul unor perioade îndelungate de evoluție a vieții pe Terra cantități mari de cărbune, petrol, gaze naturale.

### **3.3.2. Factori care influențează fotosinteza**

Variațiile fotosintezei sunt determinate atât de *factori interni* (ce țin de natura plantei), cât și de o serie de *factori externi* (factori ai mediului), cu care se află în strânsă legătură.

## **3.4. Procesul de respirație**

În procesul de respirație se consumă o parte din produșii fotosintetizați de către plante pentru obținerea treptată, prin reacții realizate în prezența oxigenului din aer, a energiei biochimice necesară desfășurării proceselor vitale, alături de compuși intermediari mai simpli, utilizați ca material suport pentru procesul de creștere la nivel celular (Burzo și colab., 2005).

Respirația, proces ce se realizează atât ziua cât și noaptea, are loc în toate celulele, iar o parte din energie se pierde sub formă de energie termică. Această producere de căldură, care poate atinge 90% din energia eliberată în timpul respirației semințelor aflate în curs de geminare, urmărește să asigure plantei luate ca întreg o temperatură care să favorizeze răspândirea unor substanțe volatile odorante și să stimuleze insectele polenizatoare.

### **3.4.1. Respirația arborelui și a părților sale componente**

În aceleași condiții de vegetație, respirația la plantele lemnoase diferă în funcție de specie, organul luat în studiu sau vârstă. Plantele de lumină prezintă o rată a respirației mai

ridicată în raport cu cele de umbră, iar foioasele respiră mai intens decât rășinoasele, în organele aceluiasi arbore respirația înregistrează valori diferite (Burzo și colab., 2005). Deși reprezintă cea mai mică parte din masa arborelui, frunzele realizează cea mai intensă respirație, deoarece ele conțin proporția cea mai mare de țesuturi vii, cu activitate intensă. În tulpina principală și ramurile groase respirația este în general scăzută. (Parascan și colab., 2001).

### **3.4.2. Factori care influențează respirația**

Factorii care influențează respirația sunt reprezentați de *starea fiziologică a plantei* (cantitatea și natura substratului organic al respirației, activitatea enzimatică, regimul hidric intern, vârsta) și de *factorii mediului* (temperatura, lumina, concentrația oxigenului și a dioxidului de carbon din aer).

### **3.5. Rezistența la stresurile termic și hidric**

Seceta este un fenomen meteorologic care se manifestă prin precipitații puține sau lipsa lor, temperaturi ridicate, evapotranspirație mare, vânturi puternice și uscate. Ca urmare, umiditatea mediului fizic devine insuficientă pentru a satisface nevoile plantelor.

Deficitul hidric poate afecta solul (seceta edafică), mediul aerian (seceta atmosferică) sau poate cuprinde mediul fizic în totalitate (seceta mixtă). În situațiile în care deficitul de apă din plante nu este determinat de lipsa apei din sol, ci de imposibilitatea de a fi absorbită, datorită solurilor prea reci, slab aerate, cu forță mare de reținere a apei sau datorită rădăcinilor vătămate, se poate vorbi de o „secetă fiziologică”. Manifestările sunt asemănătoare cu cele produse de seceta climatică (Parascan și colab., 2001).

## **CAPITOLUL 4. SITUL DE IMPORTANȚĂ COMUNITARĂ DEALU MARE - HÂRLĂU ROSCI 0076 - PREZENTARE GENERALĂ**

### **4.1. Caracterizarea sitului**

Situl Dealu Mare – Hârlău - zonă care cuprinde și **Stațiunea de tisă Tudora**, arealul de vegetație al taxonului *Taxus baccata* L. luat în studiu - este încadrat în bioregiunea continentală, ecoregiunea Podișul Central al Moldovei, având localizarea geografică de 47° 30' 59" lat. N și 26° 44' 52" long. E. Acesta acoperă o suprafață de 25.112 ha ce se află pe teritoriul administrativ a 3 județe: județul Botoșani pe raza localităților Copălău, Corni, Cristești, Curtești, Flămânzi, Frumușica, Tudora, Vlădeni, Vorona; județul Suceava în localitatea Dolhasca și județul Iași, pe raza localităților Deleni, Hârlău, Lespezi și Sirețel (Catalogul habitatelor, speciilor și siturilor Natura 2000 în România, 2013).

#### ***4.2. Prezentare generală***

Situl se remarcă prin gradul mare de acoperire cu păduri (97%), aici întâlnindu-se corpuri de pădure cu arbori bătrâni, petice de fâgete, stejari, goruni, carpeni și frasinii seculari. Copacii bătrâni favorizează instalarea unei faune bogate. Gradul mare de umbră are ca efect crearea unor nișe ecologice cu multă umezeală, în care trăiesc diverse specii de nevertebrate sau larve ale acestora, ce constituie hrana predilectă a numeroase specii de păsări și alte vertebrate. Starea generală de conservare a corpurilor de pădure este foarte bună, iar în zonele cu arbori bătrâni impactul antropic este extrem de scăzut, fâgetele de la Humosu reprezentând un exemplu în acest sens.

#### ***4.3. Geologie/ Geomorfologie***

Situl se află în Podișul Sucevei – Dealu Mare – Hârlău. Este localizat pe versanți cu energie medie de relief, cu pante de 10 – 12°. Întreaga arie este situată în Platforma Moldovenească, fiind alcătuită la suprafață din depozite sedimentare aproape orizontale. În regiunea Dealu Mare există două nivele de calcare oolitice.

#### ***4.4. Pedologie***

Solurile din interiorul sitului fac parte din categoria podzolurilor și sunt brun agriloiluviale pseudogleizate. Argiluvisolurile cuprind solurile brune luvice și solurile brune argiloiluviale. Substratul pe care s-au format aceste soluri este constituit din luturi și argile, uneori alternante în straturi subțiri de luturi, marne, nisipuri sau pietriș. Solurile sunt de la profunde la foarte profunde, mai rar mijlociu profunde.

#### ***4.5. Hidrologie***

Rețeaua hidrografică din cadrul sitului este foarte densă. În timpul primăverii se formează pe văile din zonă, din cauza topirii zăpezilor, numeroase torente. Majoritatea acestora seacă însă în timpul verii sau au un debit scăzut. Gârla Morii și Vorona cu afluenții săi Teișu, Moscalu, Iezeru, Chișcovata, Tudora, Fundoaia, Pleșa, Tisa, Râpa Dracului, Turbățica sunt afluenți ai Siretului, iar principalul afluent al Prutului este Jijia, cu afluenții săi Miletinul și Bahluiul. De altfel, multe din pâraiele din partea sudică a sitului se varsă în Bahlui. Direcția de curgere a apelor este în general de la NV spre SE (Catalogul habitatelor, speciilor și siturilor Natura 2000 în România, 2013).

#### ***4.6. Aspecte climatologice***

Teritoriul sitului se încadrează din punct de vedere climatic în ținutul podișului împădurit al Moldovei. Clima este temperat continentală cu influențe de climat excesiv sau

continental, temperat maritim. Temperatura medie anuală este de 8-9°C, iar precipitațiile medii anuale cuprinse între 600-700 mm (Posea și colab., 1982, cf. Bîrsan și colab., 2017).

#### **4.7. Vegetația**

În sit s-au identificat un număr mare de mușchi, în total 65, majoritatea fiind caracteristici pădurilor de fag mixte din regiunile colinare ale Moldovei. Dintre speciile rare, este important de menționat *Dicranum viride*, specie de interes comunitar neinclusă în formularul standard. Flora este alcătuită în mare parte din fâget secular de tip colinar. Frecvent se mai întâlnesc carpenul și teiul argintiu și exemplare de tisă. Alte specii de arbori prezente sunt jugastrul, paltinul de câmpie, mesteacănul, cireșul, frasinul, mărul pădureț, părul pădureț, plopul tremurător, stejarul, ulmul de câmp. Vegetația ierboasă este tipică fâgetelor colinare. Stratul arbuștilor este format din sânger, alun, păducel, salba râioasă, crușân, lemn câinesc, spinul cerbului, măceș, mur de pădure, zmeur. Dintre speciile de interes comunitar prezente în sit demnă a fi amintită este o specie foarte rară de orhidee și anume *Cypripedium calceolus* L. - papucul doamnei (Catalogul habitatelor, speciilor și siturilor Natura 2000 în România, 2013).

#### **4.8. Fauna**

Fauna sitului este caracteristică regiunilor de podiș și deal. Dintre moluște gasteropode se întâlnesc melcul de livadă și limaxul. Insectele sunt bine reprezentate, arborii bătrâni constituind habitate ideale de viață pentru multe specii valoroase dintre care: gândacul nasicorn mic, calosoma mirositoare, fluturele ochi de păun mare, fluturele vârgat, croitorul mare al stejarului, rădașca, croitorul alpin. Amfibienii sunt reprezentați prin broasca râioasă de pădure, broasca roșie de munte, broasca mare de lac, brotăcelul, buhaiul de baltă cu burtă galbenă, iar dintre reptile se întâlnesc broasca țestoasă de apă, șarpele de alun, șarpele de casă, gușterul, șopârla cenușie.

Pădurile care acoperă situl reprezintă locul ideal pentru cuibărit și hrană pentru numeroase specii de păsări, cum ar fi ciocănitoarea pestriță mică, ciocănitoarea pestriță mare, ghionoaia sură, ciocănitoarea verde, ciocănitoarea de grădini, ciocănitoarea de stejar, ciocănitoarea neagră, diverse specii de pițigoii, mugurarul, țicleanul, cojoaica de pădure, mucarul sur, cinteza, corbul, privighetoarea de zăvoi, silvia cu cap negru, presura galbenă, pietrarul sur, ciocârlia de câmp, fâsa de câmp, sfrânciocul roșiatic, silvia de câmp, silvia mică, codroșul de pădure, botgrosul. În pajiștile din nordul sitului se întâlnește rar cristelul de câmp. Dintre păsările răpitoare de zi și de noapte se întâlnesc șorecarul comun, uliul găinilor, acvila țipătoare mică, viesparul, cucuveaua, ciuful de pădure, ciuvica, huhurezul



mare și huhurezul mic. Mamiferele sunt reprezentate de arici, cârțiță, chițcani, căprior, cerb, mistreț, pârș, pârș de alun, veveriță, șoarece de pădure, șoarece gulerat, pisică sălbatică, jder, bursuc, vulpe. Este prezent aici și popândăul, specie de interes comunitar (Catalogul habitatelor, speciilor și siturilor Natura 2000 în România, 2013).

#### **4.9. Rezervația de tisă Tudora, județul Botoșani**

Rezervația naturală 2.231 Pădurea Tudora (RONPA0248) este arie naturală protejată de interes național, ce corespunde categoriei a IV-a IUCN (rezervație naturală de tip forestier), declarată prin Legea nr. 5 din 6 martie 2000, care face parte din situl de importanță comunitară Dealu Mare – Hârlău ROSCI 0076. Pădurea Tudora constituie una dintre cele mai vizitate arii naturale protejate din județul Botoșani, datorită existenței, în perimetrul său a arboretului de tisă – *Taxus baccata* L., specie declarată monument al naturii.

## **CAPITOLUL 5. SPECII STUDATE - PREZENTARE GENERALĂ**

### **5.1. Taxoni ai genului *Taxus* L.**

#### **5.1.1. Încadrarea taxonomică**

Specia *Taxus baccata* aparține Clasei *Pinate* (*Pinopsida*), Ordinul *Taxales*, Familia *Taxaceae*, genul *Taxus* (Sârbu și colab., 2013). Ordinul *Taxales* este un grup mic de plante, care cuprinde 5 genuri și 20 de specii: *Amentotaxus* (4 spp.), *Austrotaxus*, *Pseudotaxus* (ambele monotipice), *Taxus* (8 spp.) și *Torreya* (6 spp.) (Biswas și. Johri, 1997) incluse într-o singură familie - *Taxaceae* (Dallimore și Jackson, 1966, cf. Dempsey și Hook, 2000). Poziția filogenetică pentru familia *Taxaceae* este una dintre cele mai vechi enigme din sistematica gimnospermelor, locul ei printre conifere fiind unul controversat (Chamberlain, 1935; Florin, 1948a, 1951; Sporne, 1965, cf. Ghimire și colab., 2014).

Date recente din literatura de specialitate internațională afirmă că genul *Taxus* este considerat extrem de dificil de delimitat între specii folosind doar trăsăturile morfologice. În consecință, taxonomiile diferă mult, de la recunoașterea unei singure specii cu subspecii și varietăți (Pilger, 1903), la recunoașterea a 24 de specii cu 55 de varietăți, după studiile recente (Spjut, 2007). Acest gen poate fi un exemplu bun de grupuri de specii pentru care ar fi revelatoare aplicarea unei metodologii mai explicite decât cea a taxonomiei intuitive, bazată pe o observare atentă a specimenelor, cum s-a practicat până acum.

Cele 24 de specii și 55 de varietăți de *Taxus* recunoscute de Spjut (2007) sunt clasificate în trei grupe (Spjut, 1998, 2000; Spjut în Hageneder 2007), dintre care două sunt originare din America de Nord:

► **Grupul *Baccata***, reprezentat de *T. canadensis* și de multe soiuri înrudite cu *T. baccata*, *T. biternata*, *T. caespitosa*, *T. cuspidata*, *T. recurvata* și *T. umbraculifera*.

► **Grupul *Wallichiana***, reprezentat de tisa nativă din Florida (*T. globosa* var. *floridana*), tisa mesoamericană (*T. globosa* var. *globosa*) și tisa din Pacific (*T. brevifolia*), inclusiv două varietăți (var. *polychaeta* și var. *reptaneta*).

► **Grupul *Sumatrana***, pare mai evoluat în cazul frunzelor, care prezintă o zonă marginală abaxială mai largă de celule epidermice diferențiate, adesea de culoare roșu lucios în speciile de ierbar. Această zonă marginală goală variază în lățime de la 8 la 36 de celule, dintre care aproape jumătate din celulele cele mai apropiate de banda stomatică pot dezvolta papile dar, de obicei, aceasta nu depășește 12 celule.

Două dintre grupurile de specii sunt în continuare divizate în două subgrupuri sau alianțe: **Grupul *Wallichiana*** include **Subgrupurile/Aliațele *Chinensis* și *Wallichiana***, iar celălalt grup - **Grupul *Baccata*** - este împărțit în două subgrupe/alianțe geografice, care se disting prin faptul că suprafața abaxială a frunzelor dintre banda stomatelor și margine este în mare parte papiloză (**Aliața *Baccata***) sau netedă (**Aliața *Cuspidata***) (Spjut 1992, 1993, 1998, 2000a,c) (<http://www.worldbotanical.com/Introduction.htm>, accesat la data de 13.04.2021).

**Grupul *Taxus baccata*** este împărțit în două alianțe de specii, pe baza datelor anatomice ale frunzelor: (1) o alianță euro-mediteraneeană *T. baccata*, posibil derivată dintr-un complex ancestral *T. contorta/wallichiana*, și (2) o alianță *T. cuspidata* din Asia de Est, care are afinități cu un complex *T. chinensis/umbraculifera*. Aceste alianțe diferă în ceea ce privește tipul de bandă stomatică, definită prin lățimea și densitatea stomatelor. Diferențele în ceea ce privește densitatea stomatelor se observă în frecvența stomatelor în interiorul și între șiruri, măsurată în general prin numărul de șiruri de stomate dintr-o bandă, în raport cu absența papilelor pe celulele marginale. În ce privește **Aliața *Baccata***, aceasta are specii cu frunze cu un număr mai mic de stomate în benzi ușor mai late - cel puțin cu 4 celule - în care benzile stomatice se extind de obicei până la 4 celule de la margini, în timp ce **Aliața *Cuspidata*** are specii cu frunze cu o densitate mai mare de stomate în benzi mai înguste, cel mai adesea delimitate de o zonă marginală cu o lățime de 8-18 celule. (<http://www.worldbotanical.com/Introduction.htm>, data accesării: 13.04.2021).

*Taxus baccata* include numeroase varietăți sau forme (Beissner 1891; Carrière 1855, 1867; Elwes și Henry 1906; Gordon 1858, 1875; Knight 1850; Krüssmann 1985; Lawson și colab., 1851; Loudon 1844; den Ouden și Boom 1965; Pilger, 1903, 1916), recunoscute mai ales în horticultură. Taxonii mai distincți au fost tratați în lucrările autorilor: Bailey (1923,

1933); Carrière (1855, 1876); Elwes și Henry (1906); Gordon (1858, 1875) și Pilger (1903, 1916). Înainte de Beissner (1891) și Pilger (1903), acestea erau adesea considerate soiuri; Rehder (în Bailey 1902, 1923, 1933) de exemplu, le-a tratat inițial ca soiuri, dar mai târziu ca "forme de grădină" (Rehder 1940, 1949). (<http://www.worldbotanical.com/Introduction.htm>, data accesării: 13.04.2021).

Marea diversitate a formelor de creștere care este evidentă în cazul tisei europene, împreună cu o gamă largă de diferențe în ceea ce privește caracteristicile anatomice ale frunzelor, indică o istorie evolutivă îndelungată a speciei *Taxus*, pentru care s-a sugerat că trăsăturile speciilor erau mai distincte în trecut decât în prezent (Spjut 2007a). Această observație este evidențiată și mai mult prin compararea tisei din zonele geografice cu o diversitate mai mare cu cele cu o diversitate mai mică.

Altă abordare (cea curentă) este, bineînțeles, genetică (analiza ADN), dar în acest caz mostra comprehensivă din toate zonele dispersate unde acest gen crește în mod natural devine un obstacol major în obținerea unor rezultate credibile. Din cauza cultivării tisei în mod extensiv și a vulnerabilității plantei la introgresiunea genetică, materialul necontaminat genetic este garantat doar la populațiile naturale izolate de orice alt taxon amintit, precum și la plantele cultivate (Farjon, 2017).

### 5.1.2. Caractere morfologice

#### Genul *Taxus* L.

Cuprinde arbori sau arbuști cu scoarța roșcată sau roșie-brună, solzoasă și muguri cu solzii imbricați. Frunzele sunt aciculare, persistente, spiralate mai mult sau mai puțin pectinate, liniare, mai mult sau mai puțin falcate, fără canale rezinifere. Florile dispuse axilar, dioice, excepțional monoice, cele masculine solitare, globuloase, pedunculate, formate din 6-14 stamine cu filamente lățite la vârf în forma de scut, fiecare cu 5-9 saci polinici concrescuți; cele femele ovoide, formate fiecare dintr-un ovul erect, cu mică îngroșare la bază, acoperit cu numeroși solzi; samânta ovoidă, lungă de 5-7 mm și lată de 5 mm, înconjurată de un înveliș roșcat (aril). Maturație anuală.

Genul cuprinde 8 specii, originare din emisfera nordică, adesea considerate ca rase geografice ale speciei *T. baccata*, dintre care la noi în cultură 4 (1 spontană).

#### *Taxus baccata* L. – tisă

**Istoric:** Arborele este relict terțiar, care apare menționat în lucrările lui Teofrast și Iuliu Cezar. În zona țării noastre săpăturile arheologice au dovedit că încă din timpuri vechi (î. Hr.) în gospodăria getică, aflată în plină epocă a lemnului, lemnul de tisă era folosit la

confecționarea uneltelor pentru arat, a vaselor pentru gospodărie, a stâlpilor de susținere pentru case, pentru obținerea de șindrilă, arcuri, săgeți și alte obiecte.

Tisa europeană sau engleză (*Taxus baccata* L.) este nativă/ originară în cea mai mare parte a habitatelor europene. Este un arbore extrem de longeviv, fiind cunoscute specimene de 5000 ani (Milner, 1992, după Benham, 2016). Cu toate acestea, având în vedere că este dificil de stabilit cu acuratețe vârsta arborelui – estimarea bazată pe inele devine nepractică la speciile cele mai bătrâne care au trunchiul scorbutos (Eckenwalder, 2009, după Benham, 2016) – opiniile legate de vârsta exactă a celor mai în vârstă specimene sunt împărțite (Thomas și Polwart, 2003).

Tisa este în mare parte dioică; deși există și exemplare de arbori monoici, aceștia sunt rari și, de obicei, au ramuri cu sexe diferite. Florile masculine sunt ca niște globule mici și verzi, crescute pe partea inferioară a lăstarilor din anul trecut, pe când cele feminine sunt flori mici și verzi, apărute în axila frunzei crescută în anul anterior. În urma polenizării eoliene iau naștere fructele false, stacojii, cu diametrul de aproximativ 7 mm, cu un aril cărnos și roșu (unica parte netoxică a arborelui (Wilson și colab., 2011), care înconjură sămânța centrală, închisă la culoare. Semințele sunt dispersate de păsări ce se hrănesc cu miezul/pulpa roșie și duc semințele mai departe. Tisa este, de asemenea, capabilă de reproducere vegetativă.

Toxicitatea organelor acestui arbore este cunoscută din Antichitate. Adevărul este că toate părțile plantei, cu excepția arilului, conțin un alcaloid numit taxină și glucozidul taxicatină. Scoarța, lemnul și semințele sunt relativ puțin toxice, în schimb frunzele reprezintă părțile cele mai toxice ale plantei. Taxina ( $C_{37}H_{51}NO_{10}$ ) a fost izolată din frunze, în anul 1836, de către Lucas; acest alcaloid are o acțiune bulbară comparabilă cu a morfinei (analgezică și narcotică). Taxicantina ( $C_{37}H_{22}O_7$ ) are gust amar și se dizolvă în apă, alcool și eter acetic. Acest glucozoid, care produce prin hidroliză glucoza și taxigenină, are o acțiune cardiacă (Zanoschi și colab., 1981).

Datorită activității farmacologice deosebite a compușilor izolați din tisă, aceasta a fost, cu precădere în trecut, exploatată pe scară largă. Din acest motiv, dar și datorită unor particularități ecologice, specia are în prezent statut de specie periclitată în diverse țări, printre care și România (Oltean și colab., 1994; Oprea, 2005), iar habitatele naturale cu tisă sunt listate în Anexa II din Directiva Habitate (Casals și colab., 2015).

### **5.1.3. Caractere anatomice**

Caracterele anatomice ale speciilor studiate sunt determinate de caracteristicile structurii lemnului (tulpinii) și ale frunzelor. Caracterele histo-anatomice ale frunzelor de la

cele mai multe conifere sunt în mare parte originale, dar și consecința adaptării speciilor respective la condițiile deosebite în care acestea trăiesc. Prin forma aciculară a frunzelor, suprafața de transpirație se reduce foarte mult, fapt avantajos pentru plante în anotimpul rece, când absorbția apei este aproape imposibilă, împiedecând pierderea sa excesivă. Pereții îngroșați ai celulelor epidermice și hipodermice, stomatele afundate în hipoderm și chiar în mezofil, acoperite cu rășină, concură, de asemenea la moderarea sau chiar oprirea transpirației. Structura mezofilului, adesea format din celule septate, este o însușire utilă pentru fotosinteză: suprafața pereților pe lângă care se dispun cloroplastele este astfel foarte mult mărită prin formarea septurilor și deci crește cantitatea de cloroplaste în fiecare celulă asimilatoare.

Pentru taxonii genului *Taxus*, o secțiune transversală a frunzei prezintă mezofilul diferențiat în țesut palisadic și țesut spongios. Canalele de rășină sunt absente (ceea ce îi distinge de conifere). Teaca fasciculului este formată dintr-un inel de celule proeminente, dispuse regulat. Fasciculul conducător este mare și aplatizat dorsiventral, parenchimul se dezvoltă între rândurile de xilem și floem; țesutul transfuzional apare în jurul fasciculului conducător, iar traheidele și o parte din parenchimul inclus sunt limitate la prelungiri în formă de aripi laterale față de xilem. Cu toate acestea, cea mai mare parte a parenchimului se extinde, de asemenea, în sens adaxial și abaxial față de fascicul. Celulele albuminoase sunt deosebit de proeminente în această regiune, cele care se află în interiorul tecii fasciculului fiind foarte mari și, de asemenea, veziculare. Stomatele sunt hipostomatice, celulele subsidiare dezvoltă extensii papilate care formează o cameră epistomală adâncă, astfel încât celulele de gardă par să se afle adânc în ea (Biswas și Johri, 1997).

Frunzele de *Taxus baccata* au formă de ac. Nu sunt prezente fibre în țesuturi și nu au putut fi identificate canale de rășină. Suprafața abaxială a frunzei are o cuticulă mai groasă decât suprafața adaxială. Parenchimul palisadic (unul până la două straturi) este prezent doar sub epiderma abaxială. În jurul fasciculelor conducătoare există numeroase traheide de transfuzie. Frunza posedă doar un singur fascicul conducător (Hamidipour și colab., 2011).

## **5.2. Specii test**

### **5.2.1. *Amaranthus retroflexus* L.**

**Descrierea speciei:** Rădăcină pivotantă; tulpină erectă, înaltă până la 100 cm, des și fin-păroasă, mai ales în partea superioară, verde, uneori roșcată.

Frunze rombice-ovate, lung pețiolate, pe fața inferioară cu nervațiuni proeminente, verzi-pal și fin păroase. Flori grupate spiciform; lacinii perigonale femele linear-cuneate sau

spatulate, alb-membranoase. Înflorire, VII – IX. Fruct, capsulă elipsoidală comprimată dehiscentă. Sămânță mică (1 mm), lenticulară.

**Agricultură:** Dăunător cultivator unde se instalează. Prin consumul biologic scade considerabil resursele de apă și elemente minerale din sol, umbrind în același timp plantele de cultură. Diminuează producția agricolă. Folosit în unele zone numai pentru hrana porcilor (Pârvu, 2005).

### **5.2.2. *Lycopersicon esculentum* Miller**

**Descrierea speciei:** Rădăcina pivotantă, ramificată, pătrunde adânc în pământ. Tulpina înaltă, de 30 – 300 cm, în funcție de varietate și soi, erectă, cu mare capacitate de lăstărire, formând copili la subsuoara frunzelor.

Tulpina formează în contact cu pământul reavăn rădăcini adventive. Frunze întrerupt-imparipenat-compuse, acoperite cu peri glandulari cu miros caracteristic. Foliule ovale, lanceolate, de diferite mărimi, cu suprafața gofrată sau netedă, dispuse alternativ. Flori galbene dispuse în racem cu aspect de ciorchine.

Polenizare autogamă, în cazuri rare polenizare alogamă entomofilă (5%). Înflorire în lunile VII-VIII. Fruct bacă cărnoasă de diferite forme și culori (galbene, roșii, roz), cu greutatea cuprinsă între 30–500 g. Semințe oval-rotunjite, turtite, acoperite cu perișori, gri sau argintii (Pârvu, 2004).

## **PARTEA a II-a – CERCETĂRI PERSONALE**

### **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR**

#### **SCOP**

Cercetările care fac subiectul prezentei teze urmăresc pe de o parte, să evidențieze câteva aspecte referitoare la biologia unor taxoni spontani și cultivați ai genului *Taxus* L., în funcție de factori specifici de influență (factori externi, factori care țin de suprafața foliară, factori interni), iar pe de altă parte să evalueze posibilul potențial alelopatic (de bioerbicid) al extractelor apoase obținute din diverse organe ale respectivilor taxoni, interpretând efectele induse de acestea, în condiții experimentale de cultivare în laborator, asupra procesului de germinație și de dezvoltare a plantulelor rezultate, la două specii de plante test: *Amaranthus retroflexus* L. (specie de buruiiană cu frunză lată) și *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia (specie de cultură).

#### **OBIECTIVE:**

- **O1** - investigații de ordin morfo-anatomic la taxonii de *tisă* studiați: determinări biometrice și analize micro-morfologice (la frunze), analize histo-anatomice (la frunze și tulpini), în vederea aprecierii gradului lor de variabilitate, ca efect al reacțiilor de adaptare a plantelor suport la condițiile specifice mediului de viață;
- **O2** - determinări de ordin fiziologic la taxonii de *tisă* luați în studiu, în corelație cu factorii specifici de influență;
- **O3** – interpretarea nivelului ritmurilor metabolice proprii ale plantelor de *tisă* aparținând taxonilor avuți în atenție pe parcursul a trei momente diferite ale ciclului fenologic propriu și analiza unor componente biochimice specifice fructelor (arilii), ca singure organe netoxice, comestibile ale plantelor;
- **O4** - determinarea compoziției chimice a uleiurilor volatile sintetizate în frunzele taxonilor genului *Taxus* spontani și cultivați studiați, aflați în momentul de creștere vegetativă intensă și identificarea prezenței la acest nivel a taxolului - compus specific genului *Taxus*, cu înaltă valoare terapeutică;
- **O5** – realizarea de extracte vegetale (apoase și alcoolice) de concentrații diferite (1 și 5%) din organe vegetative (ritidomă, frunze) și de reproducere (arili și semințe) aparținând celor trei taxoni de *tisă* avuți în atenție, aflați în momente diferite ale ciclului fenologic propriu și caracterizarea lor biochimică;
- **O6** – evaluarea, în condiții experimentale de cultivare în laborator, a modificării unor indici ai procesului de germinație și de dezvoltare a plantulelor rezultate la specii de plante test: *Amaranthus retroflexus* L. (specie ruderală cu frunză lată din culturile agricole) și *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia (specie de cultură), ca efect al tratamentelor cu extracte apoase preparate din organe vegetative și de reproducere aparținând taxonilor de *tisă* luați în studiu;
- **O7** – evaluarea posibilelor efecte antidenaturante asupra proteinelor animale produse de extractele alcoolice preparate din organe vegetative și de reproducere ale taxonilor de *tisă* studiați, aflați în momente diferite ale ciclului fenologic propriu.

## **CAPITOLUL 6. MATERIAL ȘI METODE DE LUCRU**

### **6.1. Material biologic**

Materialul biologic analizat este reprezentat de organe diferite (ritidomă, frunze, arili și semințe) recoltate de la indivizi femeli de *tisă* aparținând speciei spontane *Taxus baccata*

L. (**T1**), din Rezervația de Tisă - Pădurea Tudora, județul Botoșani (lat. 47.524909° N, long. 26.691887° E, alt. 444 m) (accesul în Rezervație a fost asigurat în baza acordului ANANP nr. 8147/26.07.2019 eliberat de către Agenția Națională pentru Aarii Naturale Protejate) și de la taxoni cultivați: *Taxus baccata* (**T2**) și *Taxus baccata* 'Robusta' (**T3**), furnizați de către Pepiniera S.C. Doropad S.R.L. Suceava cu sediul în Dorohoi, comercializați conform certificatului de calitate și conformitate eliberat la data de 31.07.2019 și cultivați într-un spațiu privat în comuna Vorniceni, județul Botoșani (lat. 47.986328° N, long. 26.663299° E, alt. 185 m).

După determinarea și autentificarea materialului vegetal de către doamna biolog dr. Irina Irimia, au fost depuse vouchere pentru taxonii selectați la Herbariul Facultății de Biologie a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, cu numere de identificare corespunzătoare: 186539 – taxonul **T1** (*Taxus baccata* L. – specia spontană), 186537 – taxonul **T2** (*Taxus baccata* -taxon cultivat), 186538 – taxonul **T3** (*Taxus baccata* 'Robusta' – taxon cultivat); pentru exemplarele cultivate a fost păstrată denumirea taxonilor conform certificatului de calitate și conformitate eliberat la data de 31.07.2019 (data achiziționării lor).

## 6.2. Model experimental

Cercetările s-au desfășurat pe două direcții: analize de teren și analize de laborator. La exemplarele avute în atenție s-au efectuat determinări ale principalelor procese fiziologice (fotosinteză, transpirație, respirație) pe teren, „in vivo” în anumite momente definitorii ale ciclului ontogenetic desfășurat pe parcursul anului calendaristic 2021, respectiv în lunile aprilie (IV), iunie (VI) și septembrie (IX). Aceste momente corespund, conform literaturii de specialitate (Robakowski și colab., 2018), sezoanelor specifice ciclului fenologic al speciei analizate: producția de strobili primăvara, creșterea vegetativă intensă vara, alocarea biomasei către rădăcini toamna. Precizăm că în perioada de repaus din timpul iernii nu au fost efectuate investigații din cauza condițiilor meteorologice specifice iernii anului 2021 în Rezervația de Tisă din pădurea Tudora (ninsori abundente, vânt puternic, strat consistent de zăpadă), care nu au permis accesul pe teren.

Pentru continuarea analizelor în laborator s-a prelevat material proaspăt de la fiecare taxon în parte, material care s-a prelucrat în spațiile de cercetare ale Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași, utilizând echipamente furnizate de Laboratorul de Biologie vegetală și de Centrul Integrat de Studii în Știința Mediului pentru Regiunea de Dezvoltare Nord-Est (CERNESIM), organizat cu fonduri obținute prin grantul Nr. 257/28.09.2010, SMIS/CNR 13984/901.



Materialul biologic (ritidomă, frunze, arili și semințe) colectat în vederea efectuării analizelor a fost folosit în stare proaspătă (frunze), recoltat în etapa de creștere vegetativă intensă pentru extracția de uleiuri volatile prin hidrodistilare; pentru celelalte analize acesta a fost supus unor operațiuni de condiționare, astfel: conservare în alcool etilic 70% (frunze) pentru histo-anatomie; refrigerare sau congelare (arili) pentru o parte din analizele biochimice; fixare termică (ritidomă, frunze, semințe), la temperatura de 60°C în etuvă cu ventilație timp de 60 de minute, pentru inactivare enzimatică, urmată de uscare la temperatura camerei, în zone cu ventilație adecvată, ferit de radiații solare directe și măcinare/transformare în pulbere, pentru obținerea extractelor alcoolice, apoase și acetone, utilizate mai departe după cum urmează:

- extractele alcoolice de concentrație 1%, respectiv 5%, pentru o evaluare calitativă spectrofotometrică sumară;
- extractele apoase de aceeași concentrații ca și cele alcoolice, pentru cercetarea, în condiții experimentale de laborator, a posibilelor lor efecte alelopatiche asupra proceselor de germinație și de dezvoltare a plantulelor nou formate, folosind semințe aparținând speciilor test *Amaranthus retroflexus* L. - (știr, buruiană cu frunză lată) și *Lycopersicon esculentum* Mill. soiul Silvia - (roșie, plantă de cultură), specii cu o germinare rapidă, stimulată de lumina mediului ambiant (Boldor și colab., 1983; Asaad și colab., 2017);
- extractele acetone, pentru separarea, identificarea și cuantificarea *taxolului* prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC).

### **6.2.1. Prepararea extractelor**

#### **Extracte alcoolice**

Au fost preparate utilizând ca extractant alcool etilic 70 %. Conform informațiilor din literatura de specialitate, extractele preparate folosind solvenți de diverse polarități (apă, alcool etilic, alcool metilic, acetone, cloroform) permit extracția din materialul vegetal atât a compușilor hidrosolubili, cât și a celor hidrofobi sau hiposolubili (Naczak, 2004). Extracția s-a realizat prin macerare, pe o perioadă de 48 ore, în tuburi Falcon din plastic închise, depozitate în spații ferite de lumină, pentru a evita fotodegradarea compușilor de constituție.

#### **Extracte apoase**

Pentru prepararea extractelor apoase din ritidomă, frunze, arili și semințe în concentrații de 1% și 5% s-au folosit câte 0.5, respectiv 2.5 grame de material vegetal pulbere

suspendat în 49.5, respectiv, 47.5 ml apă distilată. Pentru a facilita extracția compușilor bioactivi și a evita, totodată, degradarea acestora datorită temperaturii ridicate, flacoanele Erlenmeyer cu amestecul obținut (material vegetal și solvent) au fost menținute timp de 150 de minute pe baie de apă, la temperatura de 50°C. Ulterior, extractele au fost filtrate prin hârtie de filtru și conservate prin refrigerare, ferite de lumină, pentru a evita descompunerea compușilor biologic activi, până la utilizare (Lobiuc și colab., 2016).

#### **Extracte acetone**

Pentru separarea, identificarea și cuantificarea *taxolului* prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) au fost realizate extracte acetone de concentrație 99.5% conform metodei descrise de Sadeghi-aliabadi și colab. (2009).

#### **6.2.2. Obținerea uleiurilor volatile**

Extracția uleiurilor volatile s-a efectuat din material vegetal proaspăt, reprezentat de frunze (aproximativ câte 300 g material proaspăt/ probă) recoltate în perioada de creștere vegetativă intensă. Extracția s-a realizat prin hidrodistilare cu ajutorul unui extractor de tip NeoClevenger, conform metodei descrise de N. Radulović și colab. (2010); Burzo și Toma (2012); Stefanović și colab. (2016).

### **6.3. Metode și tehnici de cercetare**

#### **6.3.1. Metode de investigație în teren - Determinarea „in vivo” a intensității proceselor de fotosinteză, transpirație și respirație**

Pentru determinarea „in vivo” a parametrilor funcționali specifici la nivel foliar - rata fotosintetică (A) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), rata transpirației (E) ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) și, prin adaptare specială vizând asigurarea condițiilor de întuneric, rata de respirație (R) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), împreună cu gradul de iluminare de care beneficiază aparatul fotosintetic al plantelor (Qleaf) ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), cu nivelul temperaturii de la suprafața frunzei (tleaf) (°C), cu concentrația  $\text{CO}_2$  substomatic (Ci) (vpm) și cu conductanța stomatală a apei (gs) ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) s-a utilizat sistemul portabil de fotosinteză LCI Photosynthesis System (ADC BioScientific, 2007). Sistemul este echipat cu un analizator de gaze în infraroșu, determinările realizându-se în condițiile de mediu specifice anului 2021. Totodată, au fost calculate eficiența utilizării apei (WUE) (A/E) și raportul dintre rata de transpirație și conductanța stomatală (E/g) pentru toți taxonii investigați în fiecare moment al ciclului ontogenetic propriu, precizat anterior.

Înregistrarea parametrilor funcționali s-a efectuat în zile senine și luminoase, în intervalul 10:00 AM - 12:00 AM, pe un eșantion de 15 frunze de un an, alese aleatoriu pentru

fiecare individ analizat. Frunzele taxonilor investigați au fost închise în camera frunzei, în condiții ambientale, menținute timp de 3 minute pentru aclimatizare, apoi citirile au fost înregistrate la intervale de câte 15 secunde, timp de 3 minute. La momentul investigațiilor s-au măsurat temperatura aerului ( $T^{\circ}\text{C}$ ) și umiditatea atmosferică (RH%), folosind un termohigrometru Testo 625.

### **6.3.2. Metode de investigație în laborator**

#### *6.3.2.1. Determinări morfologice - măsurarea suprafeței foliare*

Măsurătorile morfologice s-au efectuat pe frunze proaspete. Câte 20 de frunze (ace) de pe lăstari de un an ai fiecărui taxon investigat au fost separate de lăstari și scanate cu aparatul portabil compact de determinare AM 300 ADC Bioscientific, folosit pentru determinarea cu acuratețe a suprafeței foliare (LA) ( $\text{mm}^2$ ) și a parametrilor asociați: lungime (LL) (mm) și lățime (LW) (mm), calculându-se raportul dintre acești doi parametri (LWR).

#### *6.3.2.2. Determinări micro-morfologice și histo-anatomice*

Pentru **interpretările de ordin micromorfologic** au fost realizate fotografiile ale frunzelor la microscopul electronic de baleaj din cadrul Laboratorului de Microscopie electronică al Facultății de Biologie. Astfel, probele de frunze pregătite prin metoda *air - drying* au fost examinate la microscopul electronic de scanare (Tescan Vega II SBH), prin programul VegaTC Software, realizându-se fotografiile pentru ambele suprafețe foliare (adaxială și abaxială) (Hynninen și colab., 2018).

În vederea **analizei histo-anatomice**, materialul vegetal, conservat în alcool etilic 70%, a fost prelucrat conform protocolului de lucru din Laboratorul de Morfologie și Anatomie vegetală Academician Constantin Toma al Facultății de Biologie. Preparatele obținute au fost analizate la microscopul optic (Euromex bScope BS.1153Pli), iar fotografiile au fost realizate cu ajutorul camerei încorporate, Euromex HD Ultra DC 1357.

#### *6.3.2.3. Determinări biochimice*

##### *6.3.2.3.1. Determinarea conținutului de apă și de substanță uscată*

Constă în măsurarea pierderii de apă din masa probei de analizat care are loc prin încălzirea ei la  $105^{\circ}\text{C}$  (Boldor și colab., 1983).

##### *6.3.2.3.2. Determinarea conținutului de cenușă (elemente minerale) și de substanțe organice*

Pentru estimarea cantitativă a conținutului de substanțe minerale, materialul provenit de la determinarea conținutului de substanță uscată se calcinează timp de 3 ore la  $550^{\circ}\text{C}$  (Boldor și colab., 1983), pentru a se obține cenușa.

#### *6.3.2.3.3. Determinarea conținutului de pigmenți fotoasimilatori foliari*

Cantitatea de pigmenți fotoasimilatori din frunze se extrage cu acetonă de concentrație 80 % și se citește absorbanta soluției la spectrofotometru la lungimile de undă 663 nm, 646 nm și 470 nm, față de acetonă (Boldor și colab., 1983; Sumanta și colab., 2014).

#### *6.3.2.3.4. Determinarea conținutului de pigmenți antocianici din arili*

Antocianii se extrag cu o soluție alcoolică acidulată și se măsoară absorbanta soluției la spectrofotometru, la lungimea de undă specifică, respectiv 515 nm. Reactivii utilizați sunt alcool etilic 70 % și HCl concentrat (densitate 1,19) (Artenie și Tănase, 1981).

#### *6.3.2.3.5. Determinarea conținutului de pigmenți carotenoidici din arili*

Materialul vegetal se triturează cu un amestec de sulfat de sodiu anhidru și oxid de calciu, care au rolul de a reține substanțele colorate în afară de pigmenții carotenoidici. Pentru a preveni descompunerea pigmenților carotenoidici în mediu acid, se adaugă la amestec carbonat de sodiu anhidru. Pigmenții carotenoidici se extrag prin triturare cu acetonă și preluare în eter de petrol. În extractul obținut se determină spectrofotometric conținutul de pigmenți carotenoidici din materialul de analizat (Artenie și Tănase, 1981).

#### *6.3.2.3.6. Determinarea conținutului de vitamina C din arili*

În mediu acid, vitamina C reduce fericianura de potasiu până la ferocianură de potasiu, care în prezența ionilor de fier trivalent formează ferocianura ferică sau albastrul de Berlin. Dacă în mediul de reacție sunt prezenți ioni de fluor, atunci albastrul de Berlin nu precipită și se obține o soluție de culoare albastră, a cărei intensitate se poate măsura la spectrofotometru, la o lungime de undă de 680 nm (Artenie și Tănase, 1981).

#### *6.3.2.3.7. Determinarea conținutului de polifenoli totali din extractele alcoolice*

Din extractele alcoolice inițiale de concentrație 5% s-a realizat o diluție 1:9, iar pentru determinări s-a utilizat metoda Folin-Ciocalteu (Herald și colab., 2012).

#### *6.3.2.3.8. Determinarea conținutului de flavonoide din extractele alcoolice*

Dozarea conținutului de compuși flavonoidici s-a efectuat pe extracte alcoolice diluate 1:9 prin metoda preluată din Jia și colab. (1999) și Herald și colab. (2012).

#### *6.3.2.3.9. Determinarea activității antioxidante a extractelor alcoolice*

Metoda utilizată a fost preluată din Thaipong și colab. (2006) și Herald și colab. (2012). Pentru determinări se prepară o soluție alcoolică de DPPH 60μM, iar proba de analizat se obține prin amestecarea a 0.1 ml extract vegetal diluat (1:9) cu 2.9 ml soluție

DPPH. Amestecul astfel obținut se incubează la întuneric, la temperatura camerei, timp de 3 ore. Citirea extincțiilor se efectuează la  $\lambda = 515$  nm, față de etanol.

#### *6.3.2.3.10. Evaluarea activității antidenaturante a extractelor alcoolice asupra proteinelor*

Evaluarea activității antidenaturante a extractelor vegetale alcoolice asupra proteinelor a inclus folosirea ca substrat de reacție albumina din albușul de ou. Albumina, în urma expunerii la temperaturi ridicate, se denaturează, efect ce poate fi evaluat urmărind schimbarea turbidității unei soluții de albumină.

\*  
\*   \*

Toate determinările biochimice au fost efectuate în trei repetiții/triplicat; rezultatele obținute reprezintă media aritmetică a acestora și sunt prezentate în capitolul de rezultate al lucrării sub formă de tabele sau grafice, iar valorile brute ale tuturor analizelor sunt redată în anexe în tabele numerotate și denumite conform denumirii metodelor aplicate.

#### *6.3.2.4. Evaluarea calitativă a spectrelor de absorbție a hidrosolurilor și extractelor apoase și alcoolice*

Pentru evaluarea calitativă a compoziției chimice a hidrosolurilor și a extractelor apoase și alcoolice preparate s-au determinat spectrele de absorbție UV-vis ale acestora (Baciu și colab., 2013), utilizând un spectrofotometru Beckman DU – 730, pe intervalul 190 – 700 nm. Înainte de evaluarea spectrelor de absorbție a fost necesară diluarea extractelor apoase și alcoolice de concentrație 1%, respectiv 5% (25  $\mu$ l extract + 675  $\mu$ l solvent).

#### *6.3.2.5. Determinarea compoziției chimice a uleiurilor volatile de tisă prin GC-MS*

În vederea analizei calitative a uleiurilor volatile s-a utilizat metoda cromatografiei GC-MS (gas chromatography – mass spectrometry). Probele de ulei obținute au fost diluate în hexan, cu o diluție de 100 și analizate folosind sistemul gaz cromatograf cuplat cu spectrometru de masă / Agilent Series GC/MS format din Gaz-cromatograf GC 7890B, Sistemul MS 5977A, Injector GS Sampler 80. Analizele s-au efectuat în cadrul laboratoarelor Centrului de cercetare pentru studiul calității produselor agroalimentare-HORTINVEST din cadrul Facultății de Horticultură al Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București.

#### 6.3.2.6. Identificarea taxolului prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Separarea, identificarea și cuantificarea *taxolului* din extractele acetonice de *tisă* a fost realizată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), utilizând un sistem HPIM Shimadzu Prominence (2x pompe LC20AD, autosampler SIL20AC, cuptor CT20AC, detector SPD M20A DAD) cuplat cu o coloană Chromolith HR RP - C18 cu capătul final (150 mm lungime, 4.6 mm ID). Pentru detecția HPLC a fost utilizat ca standard *taxolul* (puritate > 95%, HPLC), procurat de la firma PhytoLab (phytolab.com). Pentru detecția *taxolului* a fost folosit acetonitril ca fază mobilă A și apa pentru fază mobilă B, în raport de 40:60, conform metodei descrise de Sadeghi-aliabadi și colab. (2009). Pentru detecție a fost injectat un volum de 20 μl de probă, eluția a fost efectuată la un debit de 1 ml/min, iar *taxolul* a fost detectat la 227 nm și eluat la 17.57 minute. Datele cromatografice au fost obținute cu ajutorul programului Shimadzu LC solution Software și interpretate manual. Analizele s-au efectuat în cadrul laboratorului de Biochimie și Biologie Moleculară al Facultății de Biologie, din cadrul Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași.

#### 6.3.2.7. Condiții experimentale de testare a extractelor apoase

Pentru testarea efectelor extractelor apoase asupra procesului de germinație au fost folosite semințe de *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia - roșii, specie de cultură - achiziționate de la firma Agrosel și de știr - *Amaranthus retroflexus* L., buruiană cu frunză lată.

Sterilizarea semințelor s-a realizat în două etape: o primă etapă cu hipoclorit de sodiu 2.5% timp de 3 minute, urmată de 3 clătiri succesive cu apă distilată sterilă și a doua etapă cu apă oxigenată 3% timp de 3 minute, urmată de 3 clătiri succesive cu apă distilată sterilă.

Pentru fiecare specie au fost organizate câte două seturi de variante experimentale; fiecare variantă a constat din câte 6 eprubete cu volume egale de câte 5 ml extracte apoase de concentrații 1% și, respectiv 5% de ritidomă, frunze, arili și semințe de *tisă* și câte o eprubetă cu apă distilată (varianta martor). Extractele apoase preparate din materialul vegetal au corespuns momentelor specifice de recoltare ale acestuia (lunile IV – aprilie, VI – iunie, IX – septembrie pentru frunze și ritidome, respectiv, IX – septembrie pentru arili și semințe).

După sterilizare, semințele plantelor test (câte 15 semințe de *Amaranthus* și, respectiv, câte 10 semințe de *Lycopersicon* pentru fiecare variantă experimentală) au fost supuse procesului de imbibiție, timp de 24 de ore, în fiecare variantă de lucru. La finalul intervalului de imbibiție semințele au fost plasate pe hârtie de filtru în plăci Petri cu diametrul

de 9 cm sterilizate în prealabil în etuvă la 180° C timp de 2 ore, pentru a evita contaminarea microbiană, manevrarea materialului biologic efectuându-se la hota cu flux laminar vertical (Vertical 700 laminar flow).

Au rezultat astfel 98 variante experimentale (48 tratamente x 2 specii test + 1 martor x 2 specii test), fiecare din cele 98 variante de lucru fiind montată în repetiții de câte trei plăci. Hârtia de filtru din plăcile Petri a fost umectată la montarea experimentului cu câte 2 ml apă distilată sterilă, iar pe durata acestuia hârtia a fost umectată cu câte 1 ml apă distilată la nevoie, de câteva ori pe zi, astfel încât materialul vegetal în curs de germinare să nu sufere de uscăciune, evitându-se, totodată, înecarea sa. Plăcile Petri cu semințe au fost menținute inițial, timp de 24 ore la întuneric, în termostaț, la temperatura de 24°C și ulterior, timp de 13 zile în laborator, la temperatura camerei (aproximativ 26°C). Durata experimentului a fost de 14 zile (336 ore), inclusiv cele 24 ore de imbibare.

#### 6.3.2.7.1. Analiza indicilor de germinație

Evaluarea efectelor induse de aplicarea extractelor apoase asupra procesului de germinație la speciile test s-a realizat prin înregistrarea numărului total de semințe germinate în fiecare variantă de lucru la intervale de câte 24 ore, pe întreg parcursul experimentului. Valorile astfel obținute au fost utilizate pentru calcularea următorilor indici ai germinației, conform formulelor descrise de Boldor și colab. (1983), Chiapusio și colab. (1997) și Mominul Islam și Kato-Noguchi, (2014), rezultatele fiind calculate ca medie a valorilor obținute în triplicat pentru fiecare variantă experimentală.

#### 6.3.2.7.2. Determinări biometrice ale plantulelor nou formate

Pentru a evalua influența extractelor apoase asupra creșterii inițiale a plantulelor nou formate prin procesul de germinare a semințelor plantelor test s-au măsurat următorii parametri ai acestora: *lungimea radiclei* (mm), *lungimea hipocotilului* (mm) și *masa plantulei* (g) (Dayan și Duke, 2006). Măsurătorile au fost efectuate la 336 ore de la montarea experimentului pe câte 15 plantule de știr și 10 plantule de roșie, respectiv pe numărul maxim de plantule disponibil pentru fiecare variantă, folosind programul de lucru ImageJ-win64.

#### 6.3.3. Analiza statistică

Datele raportate pentru toți parametrii reprezintă valoarea medie  $\pm$  eroarea standard (SEM). Diferențele semnificative din punct de vedere statistic între variabile au fost evaluate cu ajutorul testelor one-way ANOVA și testul de comparații de teste multiple Tukey's utilizând GraphPad Prism 9.2.0. Diferențele semnificative între variante au fost considerate la  $p \leq 0.05$  și sunt marcate pe grafice și tabele astfel: \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \* =  $p < 0.05$ .

## CAPITOLUL 7. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 7.1. Cercetări privind biologia „in situ” și „ex situ” a unor taxoni ai genului

#### *Taxus* L.

##### 7.1.1. Modificări morfologice la nivel foliar, ca răspuns la acțiunea factorilor de mediu

Pentru a urmări modificările morfologice apărute la nivel foliar la acțiunea factorilor de mediu au fost realizate determinări macroscopice pe frunze mature de tisă care au inclus: suprafața foliară (SA), lungimea (LL), lățimea (LW) și raportul dintre lungime și lățime (LWR), iar valorile medii  $\pm$  eroarea standard a mediei (SEM) pentru fiecare taxon cercetat sunt prezentate în tabelul 7.1.

**Tabel 7.1.** Variația suprafeței foliare și a parametrilor asociați la frunzele taxonilor de *Taxus* analizați pe parcursul lunii iunie (etapa de creștere vegetativă intensă)

| Parametri analizați                               | TAXONI INVESTIGAȚI             |                                 |                                         |
|---------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
|                                                   | T1                             | T2                              | T3                                      |
|                                                   | <i>Taxus baccata</i> - spontan | <i>Taxus baccata</i> - cultivat | <i>Taxus baccata</i> ‘Robusta’ cultivat |
| Suprafața foliară (SA) mm <sup>2</sup>            | 73.35 $\pm$ 3.17<br>****       | 38.05 $\pm$ 1.51<br>****        | 50.65 $\pm$ 2.8<br>***                  |
| Lungimea frunzei (LL)(mm)                         | 27.28 $\pm$ 0.16<br>****       | 16.75 $\pm$ 0.51<br>****        | 19.84 $\pm$ 0.74<br>**                  |
| Lățimea frunzei (LW)(mm)                          | 3.36 $\pm$ 0.09<br>**          | 2.94 $\pm$ 0.08                 | 3.26 $\pm$ 0.11                         |
| Raportul dintre lungimea și lățimea frunzei (LWR) | 8.19 $\pm$ 0.24<br>****        | 5.77 $\pm$ 0.21<br>****         | 6.16 $\pm$ 0.25                         |

Fiecare valoare reprezintă media calculată a douăzeci de măsurători independente  $\pm$  SEM; numai diferențele statistice au fost marcate cu asterisc: \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.001$

Conform datelor prezentate în literatura de specialitate frunzele de tisă în formă de ac variază în lungime; de regulă, acestea ating lungimea de 16-25 mm, dar la unii arbori pot fi scurte, de 10 mm sau mai lungi, de 45 mm, iar lățimea lor obișnuită este de 2-3 mm (Hageneder, 2013). În acest context, determinările practice realizate au confirmat datele prezentate de literatura de specialitate (Dempsey și Hook, 2000; Perrin și Mitchell, 2013), evidențiind faptul că exemplarele **T1** prezintă în mod evident o mare plasticitate în ceea ce privește morfologia frunzelor, plantele care vegetează la umbră având o suprafață foliară aproape dublă față de exemplarele cultivate neumbrite **T2, T3**.



### Considerații preliminare:

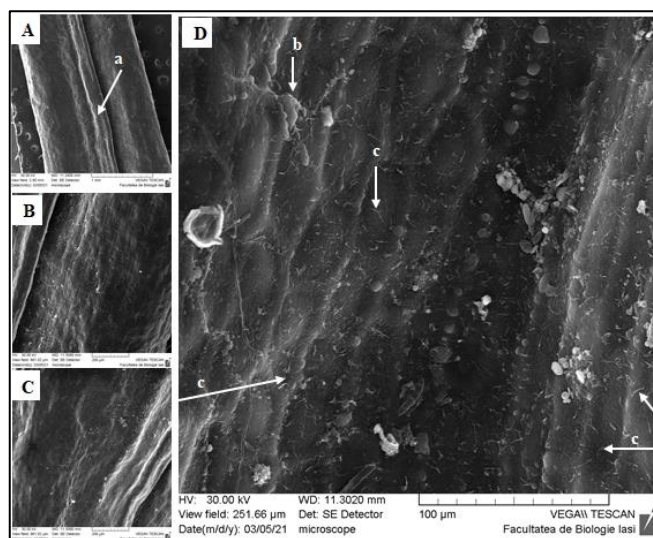
- mărirea suprafeței fotoasimilatoare pe parcursul ciclului ontogenetic este un proces important și necesar pentru derularea eficientă a proceselor metabolice în plante; rata de formare a suprafeței foliare la reprezentanții genului *Taxus* variază în corelație cu gradul de iluminare al frunzelor, nivelurile crescute de umbră având ca rezultat formarea unei mai mari suprafețe foliare;
- determinările practice realizate sunt în concordanță cu datele prezentate de literatura de specialitate referitoare la plasticitatea mare a morfologiei suprafeței aparatului foliar al exemplarelor de tisă, reliefând gradul de adaptare al exemplarelor taxonului spontan **T1** la condițiile de vegetație împreună cu diferite specii de foioase în arealul propriu, specii care modifică cantitativ și calitativ, prin coronamentul lor bogat, spectrul luminos de care dispun arborii de tisă.

### 7.1.2. Caracteristici micromorfologice și histo-anatomice ale frunzelor și tulpinilor, în funcție de acțiunea factorilor de mediu

#### 7.1.2.1 Caracteristici micromorfologice

- Micromorfologia suprafeței epidermei superioare

Celulele epidermice obișnuite sunt lungi, dreptunghiulare, inegale dimensional, cu pereții laterali relativ drepecți, fiind acoperite de o cuticulă netedă, pe care se observă rare depuneri locale filiforme de ceară epicuticulară / depuneri locale de ceară epicuticulară amorfă (foarte rar) pentru epiderma frunzei exemplarului spontan (**T1**) (Figura 7.1).



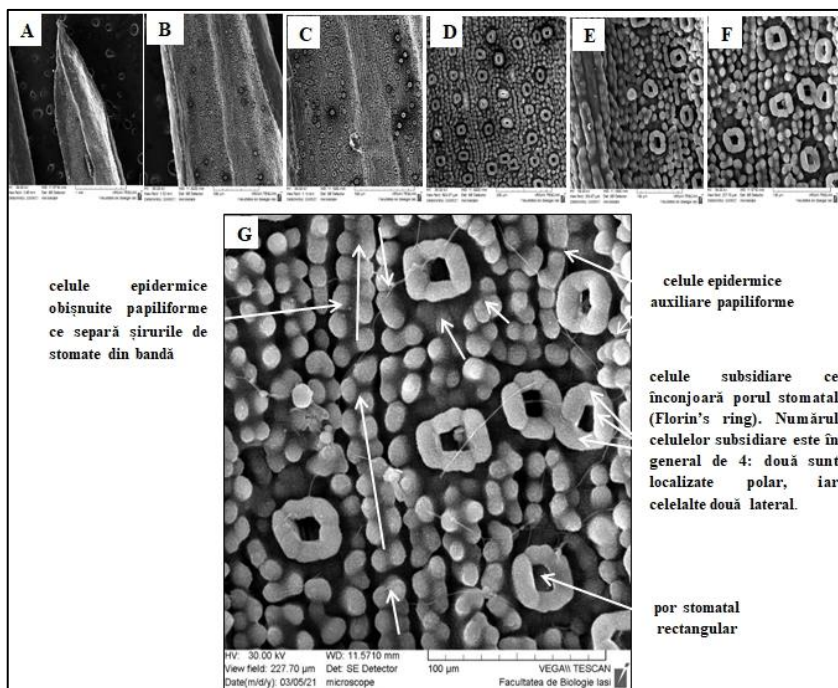
**Figura 7.1.** Micromorfologia suprafeței epidermei superioare (S.E.M.) – **T1**

A, B, C – epiderma superioară; D – epiderma superioară detaliu;  
a – nervura mediană; b – ceară epicuticulară amorfă; c – ceară epicuticulară filiformă

- Micromorfologia suprafeței epidermei inferioare

Organizarea teritorială a acestei epiderme, luând ca element de reper nervura mediană constă în prezența de o parte și de alta a acesteia a două benzi cu stomate, fiecare bandă cuprinzând aproximativ 7-8 rânduri (șiruri) de stomate. Între cele două margini ale frunzei și benzile de stomate există câte o bandă de celulele epidermice obișnuite, cuprinzând în general 5 șiruri de celule de contur dreptunghiular, alungite radiar, acoperite de o cuticulă netedă, lipsită de ceară epicuticulară.

Aparatul stomatic este format din două celule stomatice și ostiola dintre ele, celulele anexe ce flanchează fiecare câte o celulă stomatică, celulele epidermice auxiliare imediat vecine celulelor anexe, la care se adaugă celulele subsidiare ce înconjoară porul stomatal și care formează ceea ce în literatura de specialitate întâlnim ca numindu-se "inelul Florin" (*Florin's ring*). Cele două celule stomatice împreună cu cele două celule anexe se află sub nivelul extern al epidermei, fiind protejate de *Florin's ring*. Genul *Taxus* L. este definit prin benzile hipostomatice papiliforme (celulele epidermice auxiliare, celulele subsidiare) în contrast cu celulele epidermice ale nervurii mediane și cu celulele benzilor epidermice marginale (exemplarul spontan **T1**) (Figura 7.2.).



**Figura 7.2.** Micromorfologia suprafeței epidermei inferioare (S.E.M.) – T1

A, B, C – nervura mediană; D, E, F – stomate; G – stomate detaliu

### Considerații preliminare:

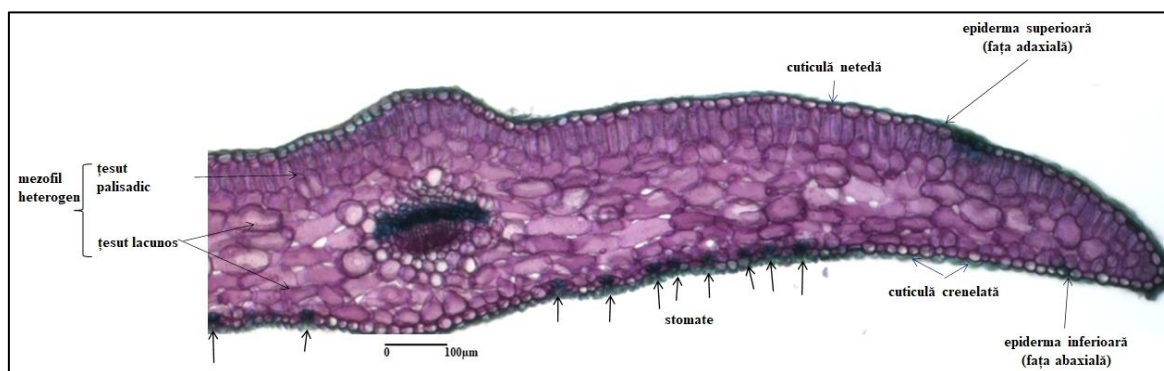
În urma investigațiilor S.E.M. asupra epidermelor (superioară și inferioară) frunzelor aparținând exemplarelor de tisă avute în atenție, putem afirma următoarele:

- micromorfologia epidermei superioare este relativ asemănătoare la toate cele trei variante analizate (**T1**, **T2** și **T3**), aceasta fiind alcătuită din celulele epidermice lungi, dreptunghiulare, inegale dimensional, cu pereții laterali drepecți și pereții externi acoperiți de o cuticulă fină, netedă, pe care se observă rare depuneri locale filiforme de ceară epicuticulară;
- organizarea epidermei inferioare a frunzei este influențată arhitectural la toți cei trei taxoni analizați de benzile de stomate situate de o parte și de alta a nervurii mediane, o dispoziție de altfel caracteristică genului *Taxus* și cu certă valoare de diagnoză micromorfologică;
- se remarcă uneori (variantele cultivate **T2** și **T3**) fenomene de asimetrie fluctuantă în ceea ce privește dispoziția structurilor lor epidermice în raport cu nervura mediană, fenomene corelate cu potențiali factori de stres.

#### 7.1.2.2. Caracteristici histo-anatomice

##### ♦ *Frunza*

La materialul vegetal analizat s-au urmărit, în secțiune transversală prin frunză, caracteristicile histo-anatomice ale epidermelor (superioară și inferioară), mezofilului și nervurii mediane (Figura 7.3.).



**Figura 7.3.** Secțiune transversală prin limbul foliar la **T1**

Epiderma superioară este unistratificată, cu celule ușor alungite radiar având pereții externi ușor mai îngroșați decât ceilalți și acoperiți de o cuticulă netedă.

Mezofilul heterogen este diferențiat în țesut palisadic unistratificat, pe alocuri bistratificat, cu celule alungite radiar, dar nu foarte înalte (acest țesut ocupă aproximativ 1/5 din grosimea mezofilului) și țesut lacunos pluristratificat (4-5 straturi de celule aplatizate tangențial, cu spații aerifere mici – meaturi – care scad dimensional de la epiderma

superioară la cea inferioară); prin urmare, limbul foliar are o structură bifacială heterofacială (dorsiventrală).

Epiderma inferioară, de asemenea unistratificată, are celule epidermice obișnuite, ale căror pereți externi sunt acoperiți de o cuticulă crenelată, iar de o parte și de alta a nervurii se observă două grupe de câte 8 stomate situate sub nivelul extern al epidermei; prin urmare, limbul foliar este hipostomatic.

Nervura mediană a frunzei este reprezentată de un singur fascicul conducător libero-lemnos, având lemnul orientat spre epiderma superioară, iar liberul spre epiderma inferioară. Lemnul este format din traheide (vase lemnoase imperfecte, caracteristice gimnospermelor în general), iar liberul este reprezentat de celule ciuruite dispuse în șiruri radiare. De o parte și de alta a fasciculului conducător se observă mici expansiuni ale parenchimului lemnos traheidal.

### **Considerații preliminare:**

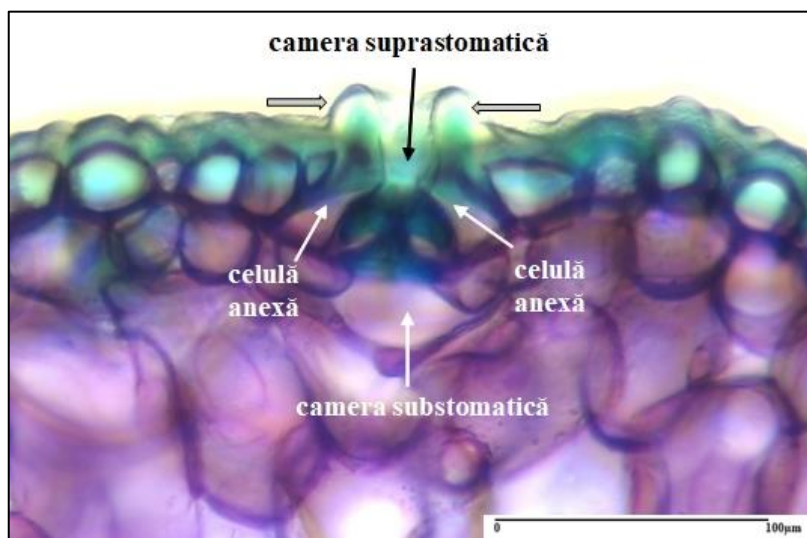
Corelând datele din literatura de specialitate cu rezultatele noastre, din punct de vedere histo-anatomic, frunza de la tisă are distincte următoarele **7 caracteristici cu valoare de diagnostic**:

- este hipostomatică, stomatele fiind dispuse în benzi în număr variabil per bandă, de o parte și de alta a nervurii;
- are o structură bifacială heterofacială (dorsiventrală);
- elasticitatea și flexibilitatea frunzei se datorează absenței hipodermei sclerenchimatice lignificate;
- canalele rezinifere lipsesc;
- nervura este reprezentată de un singur fascicul conducător libero-lemnos delimitat de o endodermă parenchimatice, ușor de observat;
- parenchimul traheidal de transfuzie este slab reprezentat și se observă cu precădere în partea laterală a fasciculului conducător, sub forma unor mici expansiuni care depășesc limitele impuse de țesutul liberian perfect suprapus peste cel lemnos;
- aspectul crenelat al cuticulei se datorează faptului că aceasta se mulează pe protuberanțele pereților externi ai celulelor epidermei inferioare (celule papiliforme).

♦ *Tulpina (ramura)*

La nivelul analizat, conturul secțiunii transversale este neregulat, cuprinzând coaste de mărimi diferite (două dintre acestea mai ample, iar altele două-trei de amplitudine mai mică) separate prin valecule de adâncime medie.

Epiderma este unistratificată, având celule mici, ușor aplatizate tangențial, cu pereții externi mai îngroșați decât ceilalți și acoperiți de o cuticulă fină, relativ subțire. Pe alocuri se observă stomate situate ușor sub nivelul extern al celulelor epidermice, având o discretă cameră suprastomatică (Figura 7.4.).



**Figura 7.4.** Stomată din epiderma ramurii de T1 (detaliu)

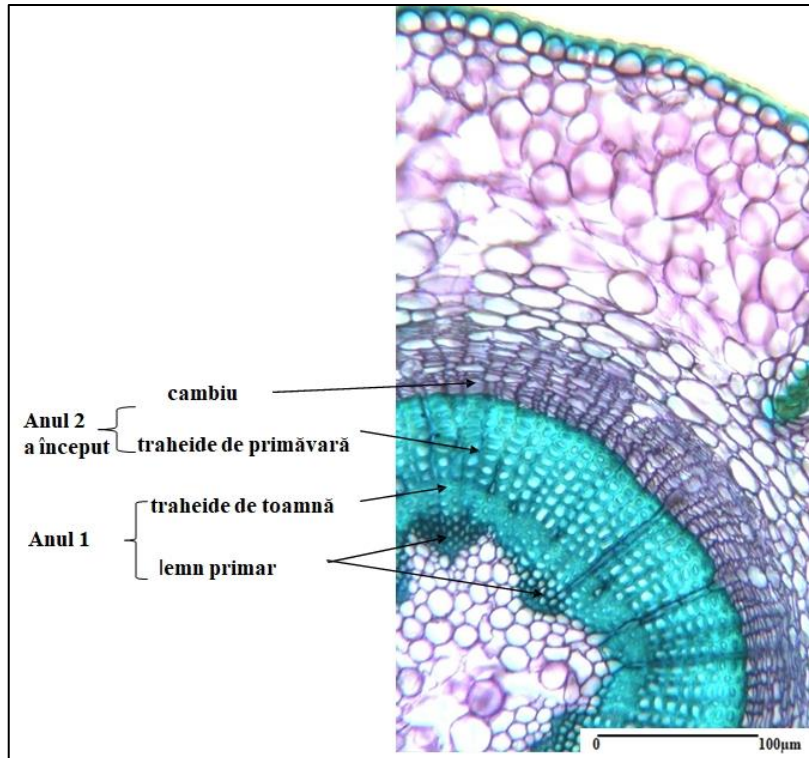
Scoarța este diferențiată în 3 subzone distincte:

- externă, unistratificată, cu celule mici, poligonale având toți pereții ușor îngroșați și lignificați;
- mijlocie, pluristratificată, cu celule mari, alungite radiar, rotunjite lăsând spații aerifere de tip meaturi între ele (pe alocuri, aceste celule apar dezorganizate, aplatizate tangențial, formând mici cavități aerifere);
- internă, unistratificată, constituind un endodermoid amilifer, continuu în jurul inelului de liber secundar.

Cilindrul central a trecut deja la structura secundară pe seama activității unui cambiu care, funcționând bifacial, a generat spre exterior un inel de liber secundar, care împinge insulele de liber primar cu elemente aplatizate, greu identificabile. Liberul (primar și secundar) este format din celule ciuruite aplatizate, dispuse în șiruri radiare. Lemnul secundar, format spre interior, este format numai din traheide (lemn homoxil) dispuse în șiruri radiare, separate pe alocuri de raze medulare uniseriate, cu celule alungite radiar, având pereții lignificați. La materialul analizat cambiu a funcționat doi ani succesivi, întrucât se

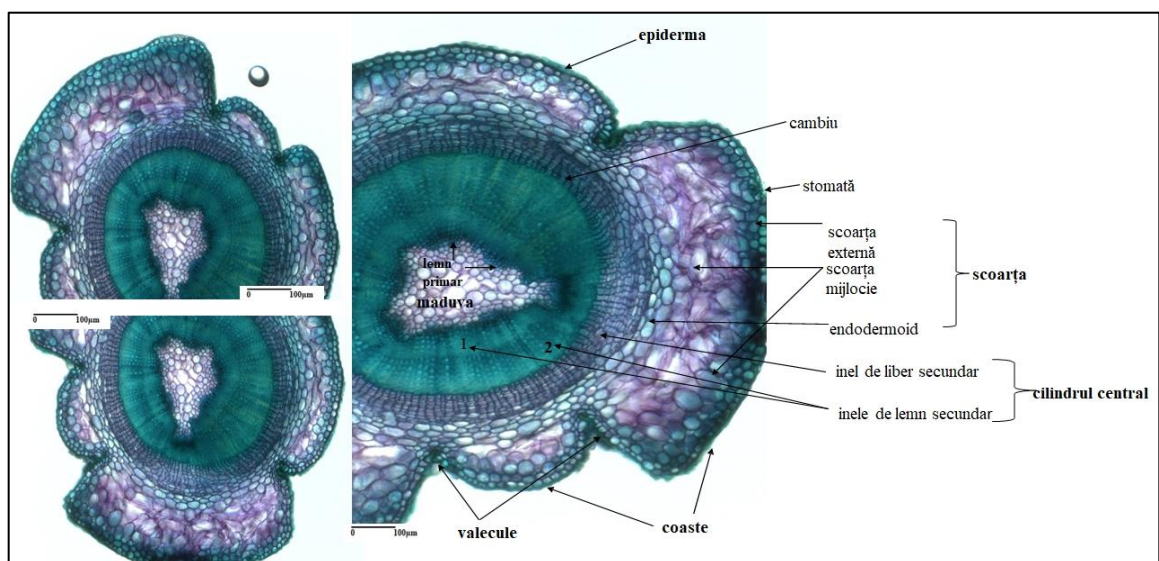


disting două inele anuale cu traheide de primăvară și traheide de toamnă-iarnă. Spre măduvă se observă mici insule de lemn primar (9-10), care proemină în parenchimul medular, cu alte cuvinte în structura primară cilindrul central a cuprins 9-10 fascicule conducătoare de tip colateral-deschis (Figura 7.5).



**Figura 7.5.** Secțiune transversală prin tulpina la T1 (sector; detaliu)

Măduva are contur trapezoidal-neregulat și este parenchimatic-meatică, cu celule rotunjite, a căror dimensiune crește de la periferie spre interior (Figura 7.6.).



**Figura 7.6.** Secțiune transversală prin tulpina la T1

### **Considerații preliminare:**

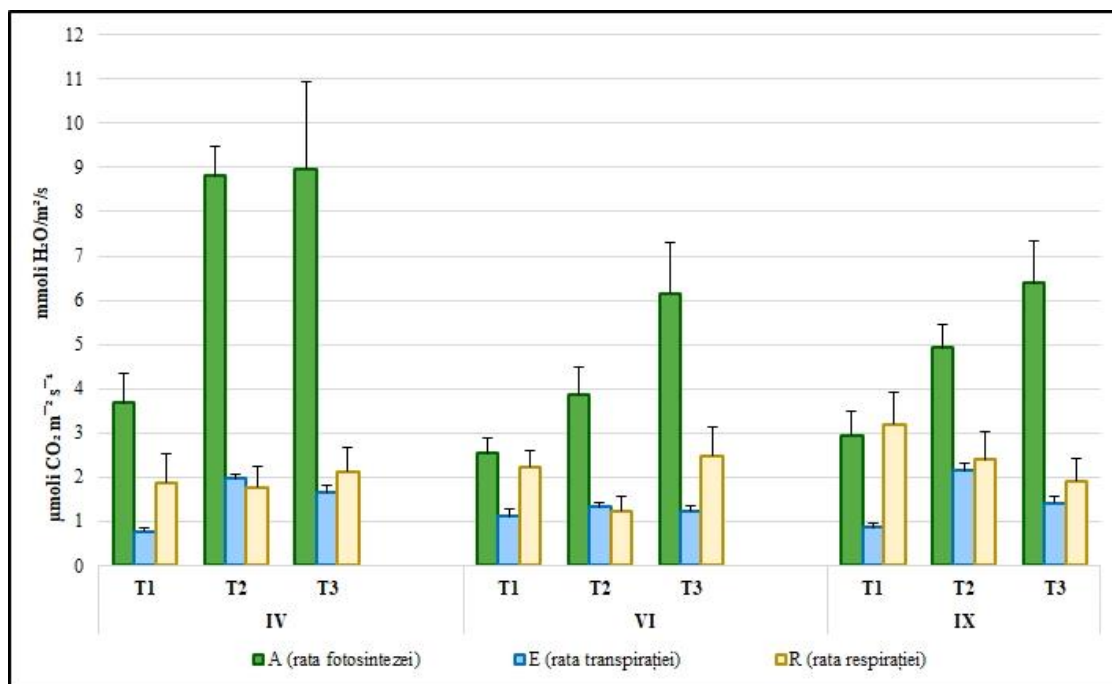
Corelând datele din literatura de specialitate cu rezultatele proprii, din punct de vedere histo-anatomic, ramurile cu vârste cuprinse între 1 și 3 ani de la tisă prezintă distincte următoarele 3 caracteristici:

- conturul neregulat (în secțiune transversală) cu 2 coaste de amplitudine mai mare, alternând cu 2-3 coaste de amplitudine mai mică la toate variantele investigate (**T1, T2 și T3**);
- dezorganizarea locală a scoarței mijlocii, cu formarea de mici cavități aerifere; în mod excepțional la varianta **T2** dezorganizarea parenchimului asimilator încă din primul an de viață al ramurii se poate datora unui aport exagerat de apă, fie prin stropire artificială, fie prin precipitații naturale sporite cantitativ într-o perioadă scurtă de timp sau unui tratament chimic aplicat împotriva fungilor/paraziților;
- evoluția corpului lemnos merge de la prezența inițială a unor rare raze medulare uniseriate către numeroase raze medulare, finalizându-se cu fragmentarea acestuia în două insule cu concavitățile față în față, de către două raze medulare secundare pluriseriate (la vârsta de 3 ani acest aspect este deja generalizat).

#### **7.1.3. Reacții fiziologice de răspuns la nivel foliar în corelație cu factori interni ai frunzei, cu factori de la suprafața frunzei, cu factori externi (de mediu)**

Fotosinteza, ca proces fiziologic, este reglată simultan de mai mulți factori externi, care țin de calitatea mediului de viață al plantelor, precum lumina, temperatura, umiditatea, disponibilitatea CO<sub>2</sub> și a altor gaze, cantitatea și calitatea nutrienților (Teskey și colab., 1995, cf. Wieser, 2007), dar și de o serie de factori interni ai acestora, care determină rata de fotosinteză ce poate fi realizată *in situ* în timpul unui sezon de vegetație la o anumită concentrație ambientală de CO<sub>2</sub> și în condiții optime de temperatură, iradiere luminoasă, deficit de presiune a vaporilor de apă și de disponibilitatea apei din sol (Larcher, 2001, cf. Wieser, 2007).

În cadrul investigațiilor efectuate asupra taxonilor luați în studiu, s-a urmărit evoluția concomitentă a celor trei procese fiziologice fundamentale (fotosinteza, transpirația și respirația) pe parcursul a trei momente definitorii ale ciclului fenologic propriu al tisei, reprezentându-se grafic evoluția acestora (Figura 7.7.).



**Figura 7.7.** Variația proceselor fiziologice fundamentale la taxonii genului *Taxus* L. pe parcursul ciclului ontogenic propriu de vegetație corespunzător anului calendaristic 2021 (IV- aprilie; VI- iunie; IX- septembrie)

### Considerații preliminare:

În urma cercetărilor efectuate pe materialul vegetal avut la dispoziție și în condițiile de vegetație/de cultivare date, putem afirma că determinările fiziologice și biochimice efectuate pe teren - „*in vivo*” și în laborator au urmărit completarea tabloului funcțional al taxonilor genului *Taxus* investigați, în corelație cu condițiile de mediu avute la dispoziție în habitatul în care aceștia vegetează în mod spontan sau sunt cultivați, pe parcursul a trei momente definitorii ale ciclului ontogenetic propriu în anul de vegetație 2021; interpretarea datelor astfel obținute ne permit să evidențiem următoarele aspecte:

- conținutul de pigmenți fotoasimilatori foliari prezintă variații cantitative în funcție de particularitățile biologice ale taxonilor investigați, aceste variații fiind determinate de bagajul informațional propriu al respectivelor organisme vegetale, de nivelul metabolic specific momentelor ontogenetice surprinse în derularea ciclului lor vital, precum și de variația factorilor microclimatici (lumina, temperatura, umiditatea atmosferică);
- gradul de hidratare și conținutul de substanță uscată foliară determinat relevă faptul că indivizii vegetali analizați desfășoară procese fiziologice fundamentale (fotosinteză, respirație, transpirație) cu o intensitate crescândă spre momentul fructificării (coacerii arililor), aceste procese urmând a le asigura, în continuare, bazele biologice de existență și supraviețuire pe parcursul fenofazelor de final ale



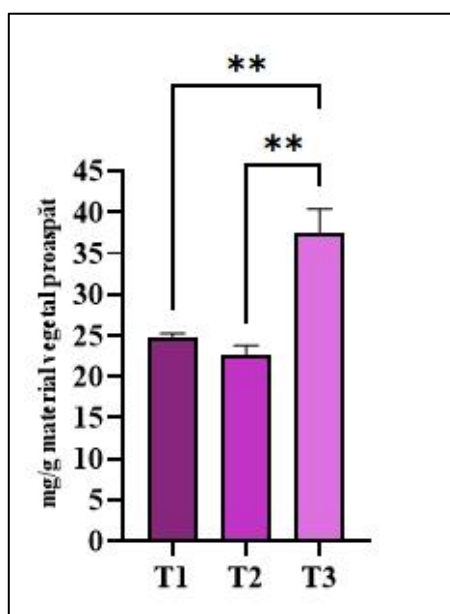
ciclului ontogenetic (de senescență), precum și rezistența, prin organele subterane, de la un an la altul de vegetație;

#### 7.1.4. Variația conținutului unor compuși biochimici din arili, ca răspuns la acțiunea factorilor de mediu

La speciile genului *Taxus* arilii de formă de formă ovală cu un diametru de aproximativ 10 mm și textură gelatinoasă, ce înconjură singura sămânță, reprezintă unica parte neotrăvitoare a plantelor (Sârbu și colab., 2013), fiind descrise frecvent ca fiind comestibile, cărnoase și bogate în energie (Cope, 1998; Herrera, 1987, cf. Schex și colab., 2021; Dumitraș și colab., 2022).

##### 7.1.4.1. Conținutul de pigmenți antocianici (antociani)

Analizele efectuate la arilii colectați de la taxonii luați în studiu (Figura 7.8.) arată că arilii colectați de la taxonul **T3** înregistrează o cantitate semnificativ mai mare de antociani, respectiv 37.45 mg/ g material proaspăt, spre deosebire de ceilalți doi taxoni investigați, care înregistrează 24.85 mg/ g material proaspăt (**T1**) și 22.70 mg/ g material proaspăt (**T2**), datele obținute practic fiind în concordanță cu literatura de specialitate consultată, care prezintă cantități de pigmenți antocianici cuprinse între 33.3 – 59.3 mg/ g material proaspăt (Tabaszewska și colab., 2021).

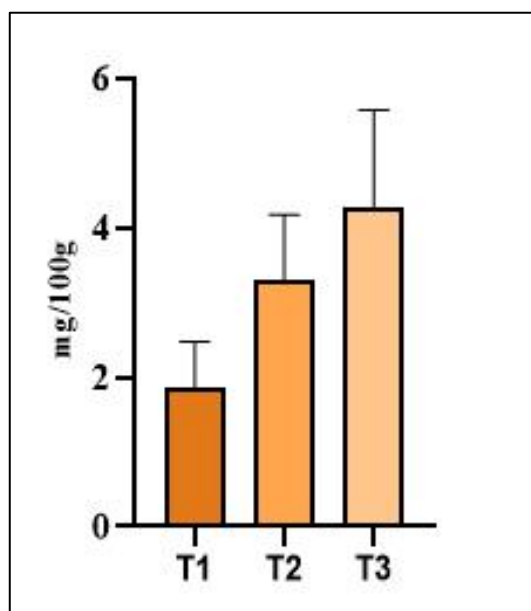


**Figura 7.8.** Variația conținutului de pigmenți antocianici / antociani din arilii taxonilor genului *Taxus* L. analizați

#### 7.1.4.2. Conținutul de pigmenți carotenoidici (caroteni)

Datele obținute practic la materialul biologic analizat (Figura 7.9.) demonstrează că arilii recoltați de la taxonul cultivat **T3** înregistrează cel mai ridicat conținut de caroteni (4.29 mg/100g material proaspăt), fiind urmat de celălalt taxon cultivat analizat (**T2**), cu un conținut de 3.30 mg /100g material proaspăt, și, în final, de taxonul spontan **T1**, cu cel mai scăzut conținut, respectiv 1.87 mg/100g material proaspăt.

Rezultatele practice astfel obținute concordă cu datele prezentate în literatura de specialitate consultată, respectiv un conținut ce variază între 3.30 – 5.42 mg /100g material proaspăt în cazul studiului realizat de către Tabaszewska și colab. (2021), care a vizat taxoni de *Taxus* din 4 localități ale Poloniei, și cu datele obținute de Dumitraș și colab. (2022) pentru arilii de tisă colectați din 3 localități diferite din Cluj – Napoca, taxonii prezentând un conținut de caroteni ce a variat între 3.37 – 3.38 mg /100g material proaspăt.



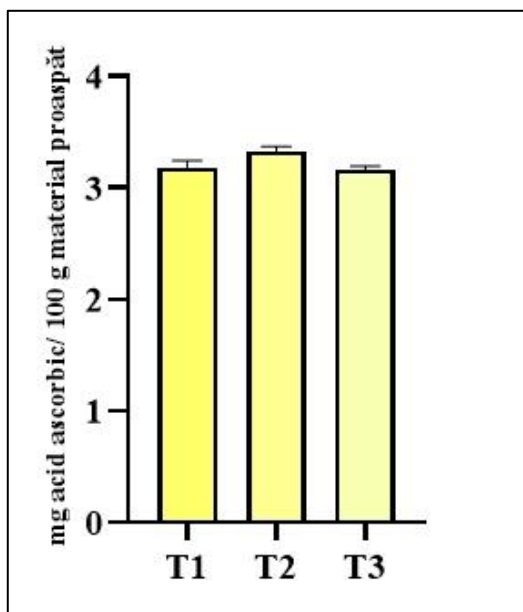
**Figura 7.9.** Variația conținutului de pigmenți carotenoidici /caroteni din arilii taxonilor genului *Taxus* L. analizați

#### 7.1.4.3. Conținutul de vitamina C

Conținutul de acid ascorbic identificat în arilii taxonilor de tisă analizați (Figura 7.10.) înregistrează aproximativ aceeași valoare la toți cei trei taxoni investigați: 3.16 mg / 100 g material proaspăt la **T3**, 3.16 mg / 100 g material proaspăt la **T1** și 3.33 mg / 100 g material proaspăt la **T2**.

Literatura de specialitate consultată comunică un conținut de acid ascorbic în arilii de tisă cuprins între 60.7 – 145 mg/ 100 g material vegetal proaspăt pentru arilii colectați din patru locații diferite din Polonia, diferențele înregistrate în legătură cu conținutul acestui compus fiind explicate ca fiind determinate, probabil, de variația diverselor condiții de

mediu, precum temperatura, disponibilitatea apei, intensitatea iluminării naturale și expunerea la acțiunea curenților de aer (vânt) (Cocco și colab., 2015, cf. Tabaszewska și colab., 2021).



**Figura 7.10.** Variația conținutului de vitamina C din arilii taxonilor genului *Taxus* L. analizați

### Considerații preliminare:

În urma investigațiilor biochimice desfășurate pe materialul vegetal (arili) colectat de la cei trei taxonii ai genului *Taxus* luați în studiu putem afirma următoarele:

- cantitatea de antociani variază semnificativ între taxoni, arilii colectați de la taxonul cultivat **T3** înregistrând cea mai mare cantitate (37.45 mg/ g material proaspăt), date care corespund valorilor comunicate în literatura de specialitate consultată;
- arilii colectați de la taxonul cultivat **T3** au prezentat și cea mai mare cantitate de caroteni, fiind urmați de arilii recoltați de la taxonii **T2** și **T1**;
- conținutului de acid ascorbic în arilii celor trei taxoni analizați a înregistrat valori sensibil egale la toți taxonii analizați;

## 7.2. Cercetări privind compoziția biochimică „in situ” și „ex situ” a unor taxoni ai genului *Taxus* L.

### 7.2.1. Compoziția biochimică a uleiurilor volatile extrase din frunze

Uleiurile volatile sunt compuși naturali volatili cu o structură complexă. Acestea sunt limpezi, rar colorate, solubile în solvenți organici, cu o densitate mai mică decât densitatea apei, liposolubile. Aceste uleiuri intervin în protecția plantelor împotriva atacurilor

erbivorelor, bacteriilor, virusurilor, fungilor și în atragerea polenizatorilor (Bakkali și colab., 2008).

Analizând datele obținute prin analiză GC/MS a uleiurilor volatile extrase prin hidrodistilare din materialul vegetal avut la dispoziție, se consideră că, prin compoziția lor chimică, uleiurile volatile prezintă importanță în diferite ramuri economice, precum industria farmaceutică, cosmetică sau agricultură.

Astfel, pentru specia spontană de tisă, **T1** a fost evidențiat un număr de 32 de compuși chimici, dintre care 31 au fost identificați și sunt prezentați în tabelul 7.3., în cazul uleiul obținut din frunzele taxonului cultivat de *Taxus baccata* L. (**T2**) au fost detectați și identificați 42 de compuși chimici, iar uleiul volatil obținut din frunzele taxonului cultivat **T3** (*Taxus baccata* ‘Robusta’) a prezentat un număr de 36 de compuși chimici.

**Tabel 7.3.** Compoziția chimică procentuală a uleiurilor volatile obținute din frunze ale taxonilor spontani și cultivați de tisă studiați, recoltate în fenofaza de creștere vegetativă intensă (iunie, 2023)

| Nr. crt. | Compusul chimic               | Formula chimică                              | Timpul de retenție (RT) | Procentaj (%) |       |      |
|----------|-------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------|---------------|-------|------|
|          |                               |                                              |                         | T1            | T2    | T3   |
| 1.       | 2-Butene-1,4-diol             | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> | 11.882                  | -             | 1.7   | -    |
| 2.       | 1-Octen-3-ol                  | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O             | 12.186                  | 1.03          | 25.61 | -    |
| 3.       | 3-Octanol                     | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O             | 13.048                  | -             | 0.21  | -    |
| 4.       | Octanol                       | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O             | 16.660                  | 1.8           | 2.73  | 0.92 |
| 5.       | Linalool                      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O            | 17.912                  | -             | 0.19  | 1.38 |
| 6.       | Nonanal                       | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O             | 18.123                  | -             | 0.42  | -    |
| 7.       | α-Terpineol                   | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O            | 21.593                  | -             | -     | 0.59 |
| 8.       | Methyl salicilat              | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> | 21.724                  | -             | 0.68  | -    |
| 9.       | Mirtenol                      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O            | 21.816                  | -             | 1.83  | 0.31 |
| 10.      | Nonan                         | C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>               | 22.038                  | -             | -     | 0.21 |
| 11.      | p-Menth-2-en-7-ol, cis        | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O            | 22.170                  | -             | 0.45  | -    |
| 12.      | Nerol                         | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O            | 23.084                  | -             | 0.91  | 0.24 |
| 13.      | p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O            | 23.810                  | -             | 4.05  | -    |
| 14.      | Geraniol                      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O            | 24.094                  | -             | 1.16  | 0.6  |
| 15.      | trans-2-Decenal               | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O            | 24.325                  | 0.64          | 1.27  | 0.65 |
| 16.      | 1-Decanol                     | C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O            | 24.784                  | 2.68          | 0.76  | 0.53 |
| 17.      | Perila alcool                 | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O            | 25.645                  | -             | 0.55  | -    |
| 18.      | Tridecan                      | C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>              | 25.713                  | 2.02          | -     | 2.02 |

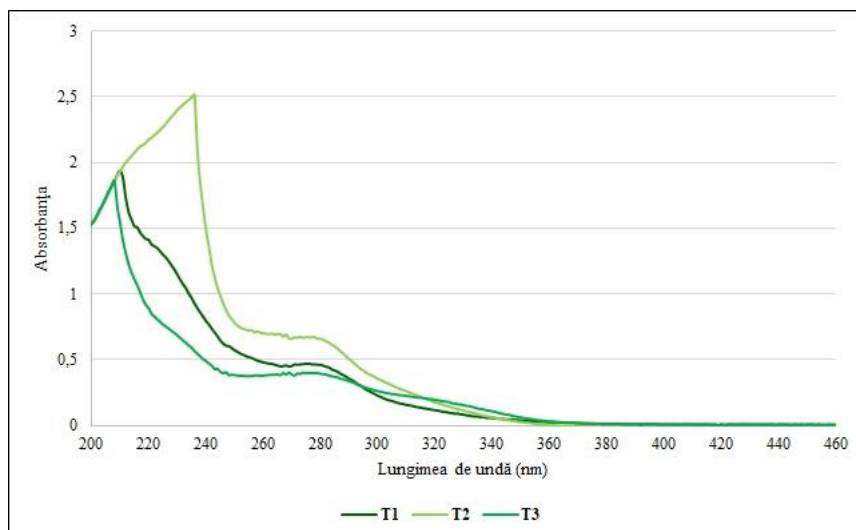
| Nr. crt. | Compusul chimic              | Formula chimică                                | Timpul de retenție (RT) | Procentaj (%) |      |       |
|----------|------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|---------------|------|-------|
|          |                              |                                                |                         | T1            | T2   | T3    |
| 19.      | Eugenol                      | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> | 27.708                  | -             | 1.1  | -     |
| 20.      | Farnesan                     | C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>                | 28.331                  | 1.25          | -    | 1.46  |
| 21.      | β-Elemen                     | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 28.862                  | -             | -    | 2.91  |
| 22.      | Tetradecan                   | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>                | 29.108                  | 3.7           | -    | 4.16  |
| 23.      | Benzene, 1,2,4-trimethyl-    | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub>                 | 29.240                  | -             | 0.71 | -     |
| 24.      | 10-Undecin-1-ol              | C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O              | 30.646                  | -             | 1.4  | -     |
| 25.      | 1,9-Decadiin                 | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>                | 30.793                  | -             | 7.92 | -     |
| 26.      | <i>Neidentificat</i>         |                                                | 31.022                  | 4.02          | -    | -     |
| 27.      | Germacren D                  | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 31.726                  | -             | 5.13 | -     |
| 28.      | α-Bergamoten                 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 32.160                  | -             | 3.36 | 3.19  |
| 29.      | α-Bergamoten                 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 32.275                  | 1.42          | -    | -     |
| 30.      | Humulen                      | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 32.474                  | -             | -    | 5.87  |
| 31.      | α-Farnesen                   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 32.562                  | -             | -    | 6.47  |
| 32.      | α-Farnesen                   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 32.566                  | 0.9           | 5.4  |       |
| 33.      | cis-α-Bisabolen              | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 33.606                  | 0.59          | 1.8  | -     |
| 34.      | Nerolidol                    | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 34.218                  | 3.02          | 0.38 | 0.55  |
| 35.      | cis-3-Hexenil benzoat        | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | 34.429                  | -             | 0.46 | -     |
| 36.      | Hexadecan                    | C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>                | 35.252                  | 0.5           | -    | -     |
| 37.      | Pentadecanal                 | C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O              | 35.664                  | 0.79          | -    | -     |
| 38.      | α-Bisabolol                  | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 37.732                  | -             | 0.33 | -     |
| 39.      | Heptadecan                   | C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>                | 38.068                  | 0.57          | -    | -     |
| 40.      | Hexadecanal                  | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O              | 38.473                  | 1.16          | -    | -     |
| 41.      | Hexahidrofarnesol            | C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O              | 38.913                  | 2.26          | -    | -     |
| 42.      | Hexahidrofarnesol            | C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O              | 38.927                  | -             | 0.4  | 1.1   |
| 43.      | Benzil benzoat               | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> | 39.847                  | -             | 0.84 | -     |
| 44.      | Octil caprilat               | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 40.196                  | -             | -    | 0.35  |
| 45.      | 1,14-Tetradecanediol         | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> | 41.173                  | 0.9           | -    | -     |
| 46.      | Hexahidrofarnesil acetona    | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O              | 41.966                  | 33.03         | 5.15 | 17.81 |
| 47.      | Salicilic acid, benzil ester | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> | 42.568                  | 0.87          | 0.93 | -     |
| 48.      | Nonadecan                    | C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>                | 43.297                  | 0.96          | -    | -     |

| Nr. crt. | Compusul chimic                        | Formula chimică                                | Timpul de retenție (RT) | Procentaj (%) |       |       |
|----------|----------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|---------------|-------|-------|
|          |                                        |                                                |                         | T1            | T2    | T3    |
| 49.      | Isophitol                              | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 44.484                  | 0.72          | -     | -     |
| 50.      | Phthalic acid, hex-3-il isobutil ester | C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> | 44.930                  | 1.4           | -     | -     |
| 51.      | Geranil- $\alpha$ -terpinen            | C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>                | 45.025                  | -             | 1.71  | -     |
| 52.      | Manoil oxid                            | C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O              | 46.123                  | -             | 10.86 | 1.46  |
| 53.      | $\alpha$ R-abietatrien                 | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub>                | 47.152                  | 3.03          | 0.53  | 1.16  |
| 54.      | Heneicosan                             | C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>                | 48.095                  | 2.52          | 0.55  | 2.96  |
| 55.      | Phitol                                 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 48.397                  | 0,97          | 0.87  | 0.49  |
| 56.      | Docosan                                | C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>                | 50.281                  | 1,92          | 0.69  | 3.63  |
| 57.      | Tricosan                               | C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>                | 52.414                  | 6,36          | 1.72  | 8.45  |
| 58.      | Tetracosan                             | C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>                | 54.469                  | 3,1           | 0.93  | 5.34  |
| 59.      | Pentacosan                             | C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>                | 56.443                  | 5,04          | 1.31  | 7.37  |
| 60.      | Hexacosan                              | C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>                | 58.342                  | 3,45          | 0.93  | 6.57  |
| 61.      | Heptacosan                             | C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>                | 60.180                  | 7,37          | 2.11  | 11.27 |
| TOTAL    |                                        |                                                |                         | 100           | 100   | 100   |

#### 7.2.1.1. Evaluarea calitativă a hidrosolilor/ hidrosolurilor

Hidrosolurile/ hidrosolii sunt compuși secundari ai hidrodistilării diferitelor părți ale plantelor aromatice, care se separă de faza de ulei volatil la sfârșitul procesului de distilare (Politi și colab., 2022). În literatura de specialitate hidrosolurile se regăsesc sub diverse denumiri, printre care: hidrolat, hidroclorat, hidroflorat, apă aromatică, apă florală, apă aromatică esențială (Rajeswara Rao, 2013; D'Amato și colab., 2018).

Pentru a se estima calitativ compoziția hidrosolurilor rezultate în urma hidrodistilării frunzelor colectate de la cei trei taxoni de tisă luați în studiu, aflați în perioada de creștere vegetativă intensă (VI), s-a efectuat o analiză spectrofotometrică a hidrosolurilor lor (Figura 7.11.); aceasta a evidențiat valori mai mari ale concentrației compușilor de constituție corespunzătoare zonei 220 – 240 nm din regiunea spectrală, zonă ce indică prezența compușilor aromatici, precum și din regiunea 260 – 280 nm, zonă corespunzătoare prezenței compușilor fenolici (Kumar, 2006; Pretsh și colab., 2009; Butnariu, 2014). Dintre cei trei taxoni de tisă analizați, specia cultivată **T2** prezintă cea mai ridicată absorbantă în special în regiunea 220 – 240 nm, deci se poate considera că hidrosolul său este cel mai concentrat în compuși aromatici.



**Figura 7.11.** Spectre de absorbție ale hidrosolurilor obținute prin hidrodistilarea frunzelor celor trei taxoni de *Taxus* analizați

### Considerații preliminare:

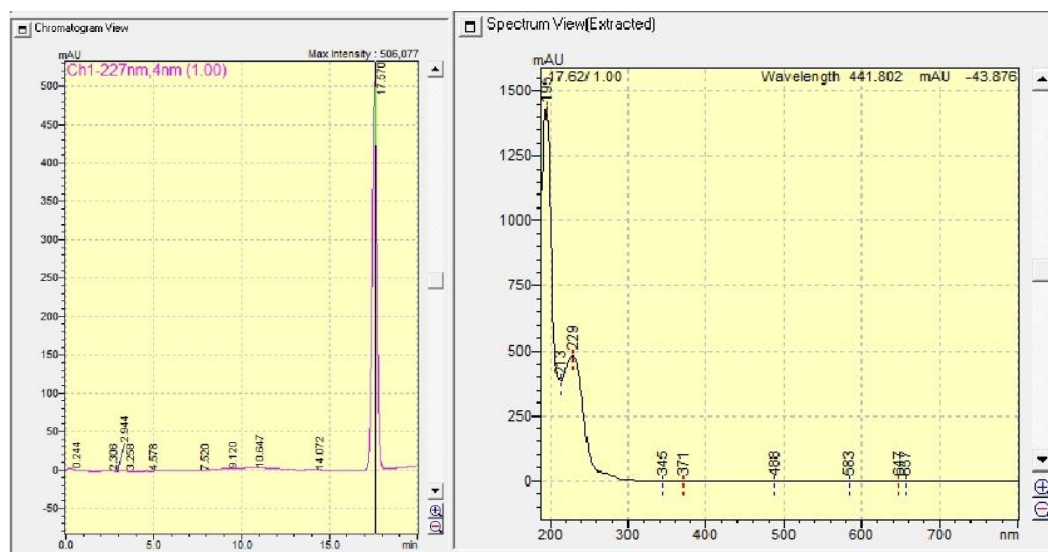
În urma analizei cantitative și calitative a uleiurilor volatile și hidrosolurilor obținute din frunzele taxonilor de *Taxus* avuți în atenție, putem desprinde următoarele:

- compoziția chimică a uleiului volatil extras din frunzele recoltate în perioada de creștere vegetativă intensă (VI) de la cei trei taxoni luați în studiu au prezentat variații calitative și cantitative:
  - uleiul extras din taxonul spontan **T1** a prezentat 31 de compuși, dintre care cea mai mare concentrație a prezentat-o hexahidrofarnesil acetona (33.03%);
  - uleiul extras din taxonul cultivat **T2** a conținut în compoziția sa 42 de compuși chimici, compusul 1-Octen-3-ol având cea mai mare concentrație (25.61%);
  - uleiul extras din taxonul cultivat **T3** a înregistrat 36 de compuși chimici în constituția sa, concentrația cea mai mare fiind atinsă, ca și în cazul taxonului spontan **T1** de hexahidrofarnesil acetona (17.81%);
- principalele grupe de compuși chimici identificate în uleiurile volatile rezultate prin hidrodistilare la taxonii de tisă avuți în studiu au fost alcanii (48.81%), alcoolii (45.34%) și hidrocarburile (31.04%).
- evaluarea calitativă a hidrosolurilor obținute prin hidrodistilare, realizată prin analiza spectrelor lor de absorbție indică prezența în compoziția acestora a compușilor aromatici, identificați în regiunea 220 – 240 nm, respectiv a compușilor fenolici, evidențiați în regiunea 260 – 280 nm a spectrelor lor de absorbție.

### 7.2.2. Identificarea și izolarea taxolului din extracte acetonice

În determinările practice realizate în cadrul prezentei teme de cercetare, au fost preparate extracte acetonice din frunzele, scoarța, semințele și arilii celor trei taxoni de *Taxus* avuți în atenție, materialul biologic fiind recoltat în perioadele fenologice specifice ciclului ontogenetic propriu.

Extractele au fost supuse analizei de identificare a taxolului prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), folosind pentru compararea rezultatelor un Standard de taxol cu timpul de retenție (RT) 17.570 și lungimea de undă 229 nm (Figura 7.12.).



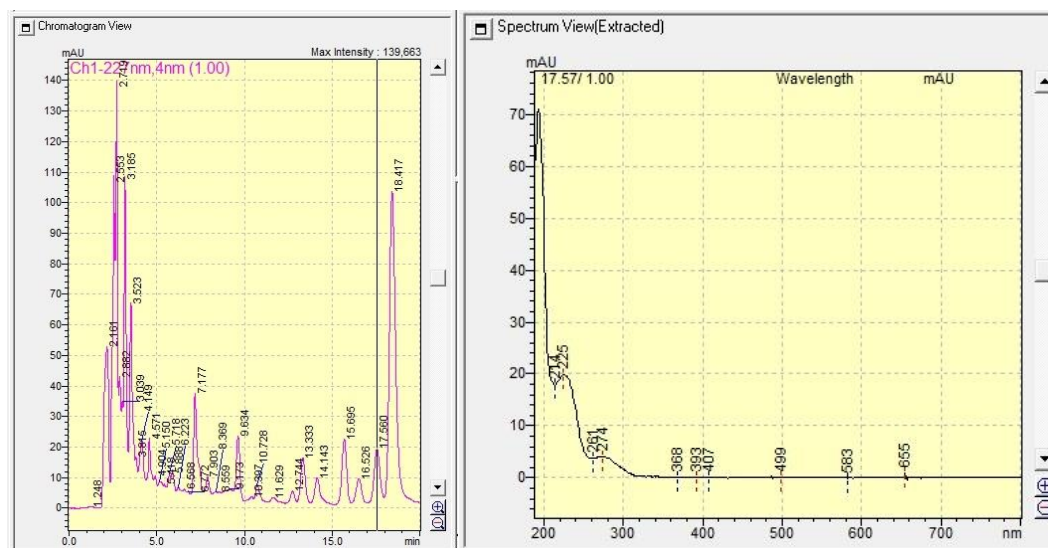
**Figura 7.12.** Cromatograma HPLC și spectrul de absorbție a taxolului utilizat ca standard de lucru (concentrația 5mg/ml; luna Mai, 2023)

Singurul rezultat valid obținut în determinările efectuate a fost pentru extractul preparat din frunzele taxonului spontan **T1**, corespunzător perioadei de formare a strobiliilor (luna aprilie); cromatograma astfel obținută a evidențiat, pe lângă taxolul identificat, corespunzător timpului de retenție 17.560 și lungimii de undă = 225 nm, prezența și a altor compuși existenți în extractul supus analizei (Figura 7.13.).

Demersul de cercetare astfel parcurs validează metoda utilizată pentru extracția, identificarea, izolarea și cuantificarea taxolului (Sadeghi-aliabadi și colab., 2009), metodă preluată din literatura de specialitate, impedimentele întâmpinate în momentul prelucrării probelor luate în lucru fiind cauzate, probabil, de gradul redus de concentrare a extractelor acetonice analizate, fapt ce impune îmbunătățirea lor la momentul reluării determinărilor, pentru a permite o detecție clară a acestui compus pe coloana de lucru a HPLC existent în Laboratorul de Biochimie al facultății noastre și un calcul corect al concentrației sale în extractele nou preparate.



Cromatograma obținută pentru extractul analizat a evidențiat pe lângă taxolul identificat la timpul de retenție 17.560 și lungimea de undă = 225 nm prezența și a altor compuși existenți în extract, (Figura 7.13.).



**Figura 7.13.** Cromatograma HPLC și spectrul de absorbție al taxolului identificat în frunzele taxonului spontan (T1) - perioada de formare a strobiliilor (VI-aprilie)

### Considerații preliminare:

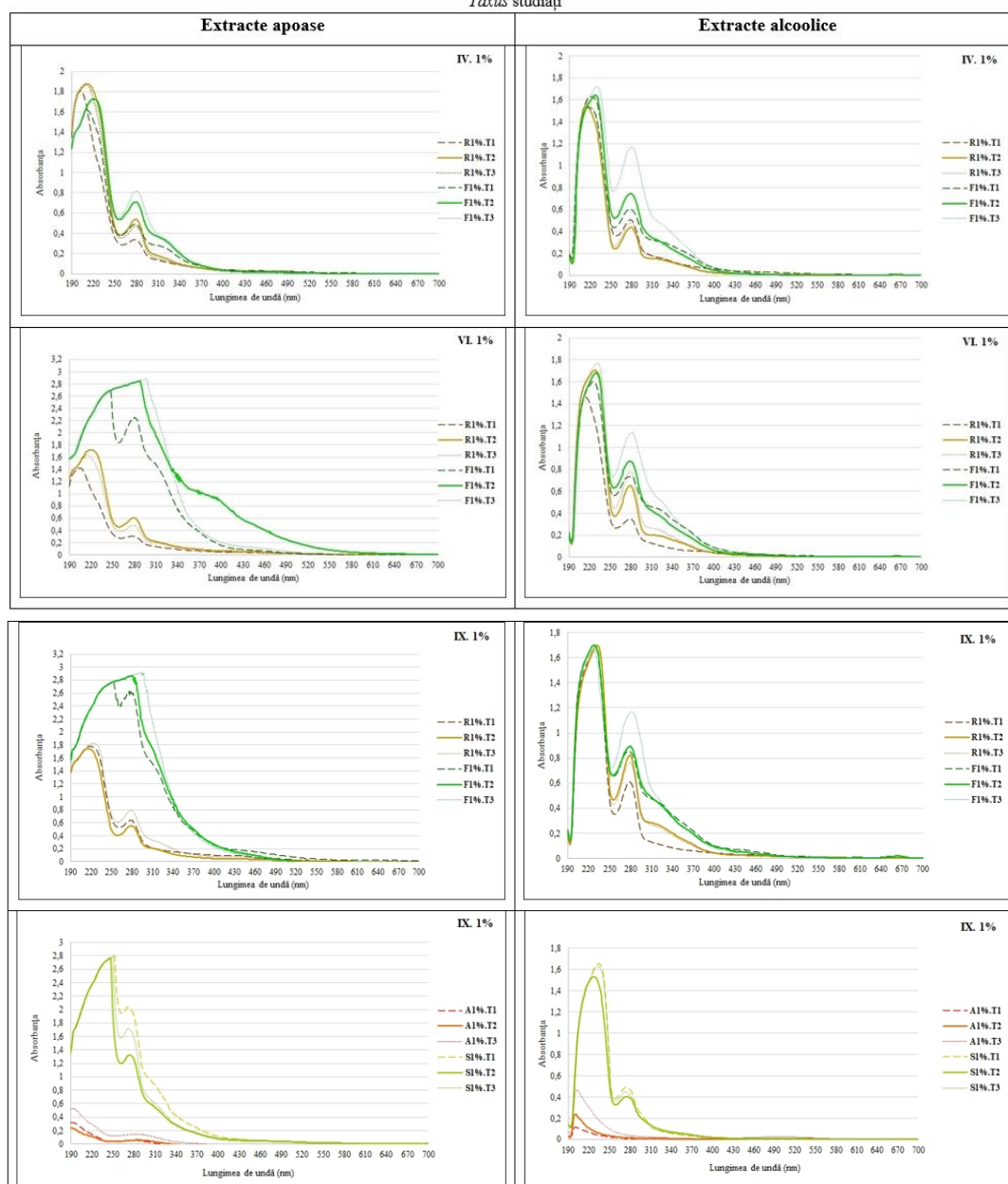
- Informațiile prezentate de literatura de specialitate precizează prezența în concentrații reduse a taxolului, compusul cu proprietăți medicinale recunoscute, în arborii de tisă care vegetează în diferite zone ale globului, inclusiv pe teritoriul României.
- Costurile de extragere și de purificare a produsului natural și cantitatea mare de material vegetal necesară ca materie primă pentru obținerea sa din organe ale arborilor de tisă, susțin utilitatea dezvoltării și perfecționării metodelor moderne de sinteză chimică a acestui compus.
- Prin rezultatul pozitiv parțial obținut, metoda de lucru aplicată pentru identificarea, izolarea și cuantificarea taxolului în materialul vegetal avut în atenție (organe vegetative și de reproducere aparținând celor trei taxoni de tisă analizați) este validă și repetabilă, în condițiile îmbunătățirii concentrației extractului vegetal de analiză, un astfel de demers de cercetare nefiind comunicat încă de literatura de specialitate românească.

### 7.3. Evaluarea calitativă, cantitativă și a posibilelor efecte ale unor extracte vegetale obținute din taxoni ai genului *Taxus* L.

#### 7.3.1. Evaluarea calitativă a extractelor obținute din organe vegetative și de reproducere

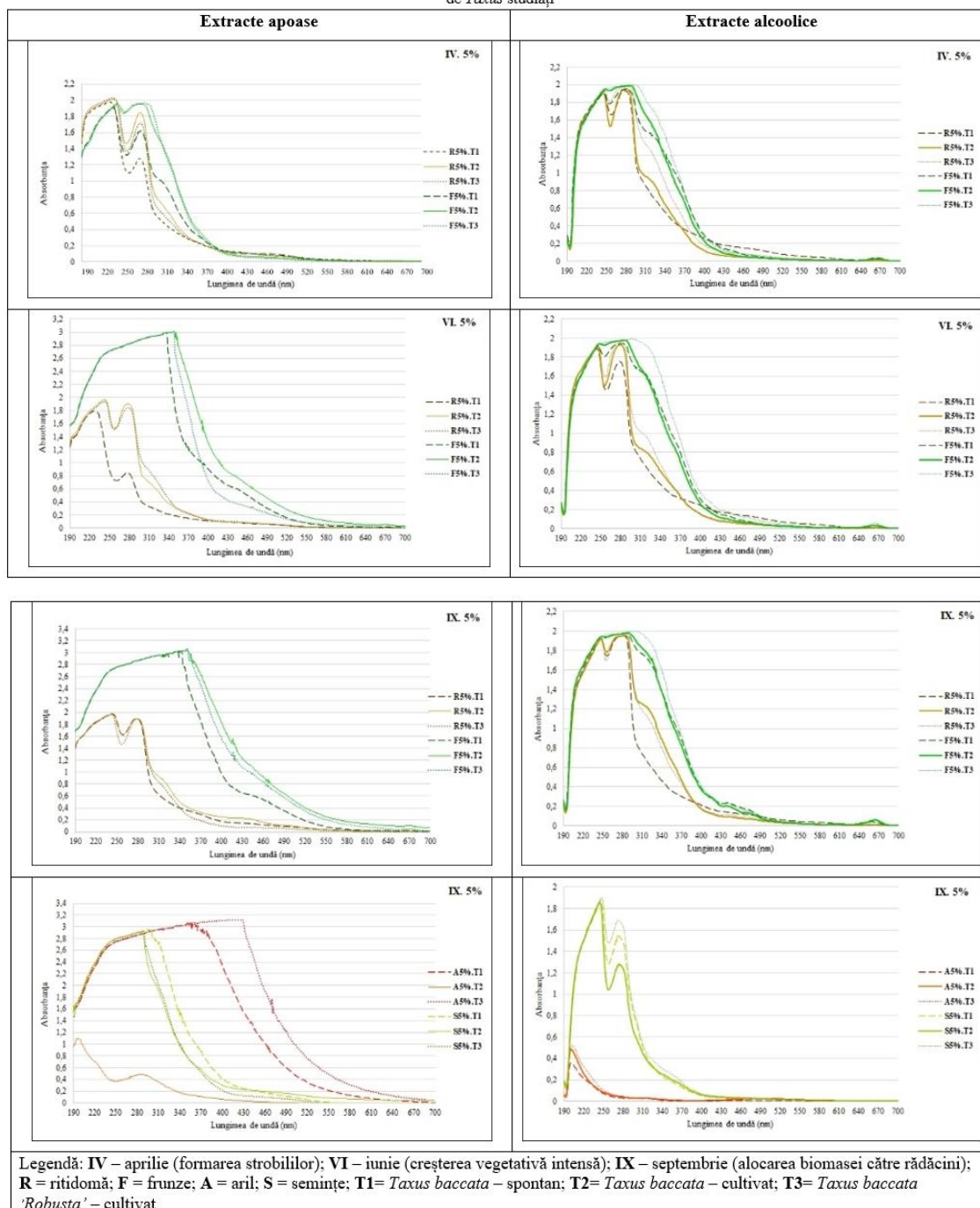
Analiza spectrofotometrică a extractelor apoase și alcoolice de tisă a fost realizată în domeniul UV-vizibil (190 – 700 nm). Valorile obținute indică prezența mai multor tipuri de compuși, cu variații în funcție de taxon, de sezon/de momentul de investigație, de organ, de tipul de extract și de concentrația acestuia (tabelele 7.5. și 7.6.).

**Tabel 7.5.** Spectre de absorbție ale extractelor alcoolice și apoase de concentrație 1% obținute din ritidomă, frunze, arili și semințe la taxonii de *Taxus* studiați



Legendă: IV – aprilie (formarea strobililor); VI – iunie (creșterea vegetativă intensă); IX – septembrie (alocarea biomasei către rădăcini); R = ritidomă; F = frunze; A = arili; S = semințe; T1= *Taxus baccata* – spontan; T2= *Taxus baccata* – cultivat; T3= *Taxus baccata* 'Robusta' – cultivat

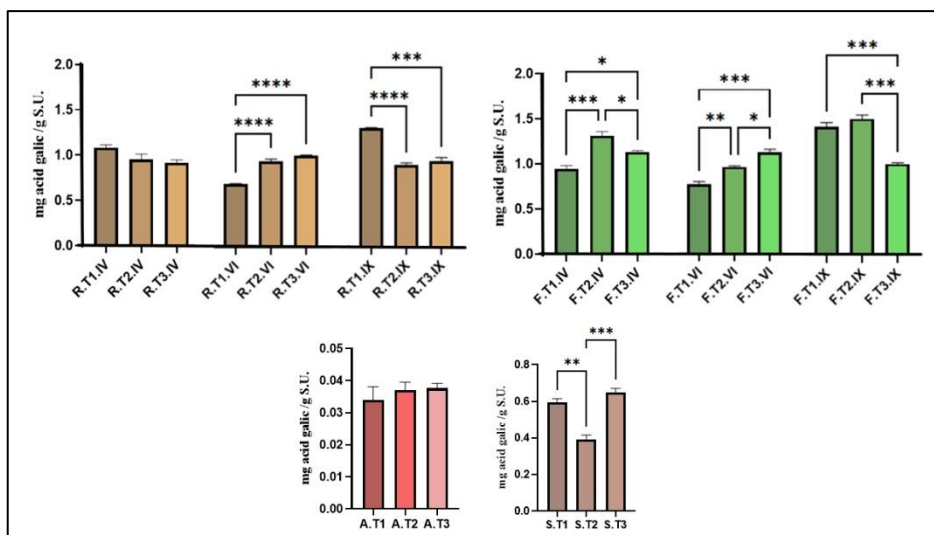
**Tabel 7.6.** Spectrele de absorbție ale extractelor alcoolice și apoase de concentrație 5% obținute din ritidomă, frunze, arili și semințe la taxonii de *Taxus* studiați



### 7.3.2. Evaluarea cantitativă a extractelor alcoolice

#### 7.3.2.1. Conținutul total de polifenoli al extractelor alcoolice

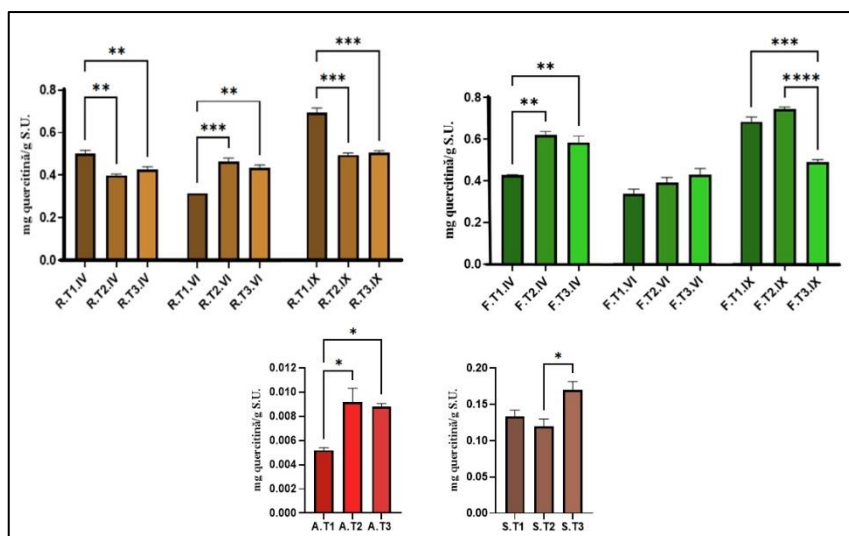
Rezultatele practice obținute pe parcursul derulării prezentului experiment privind determinarea conținutului total de polifenoli din extractele alcoolice analizate au înregistrat variații între taxoni, organe și momentele de analiză (Figura 7.14.).



**Figura 7.14.** Conținutul total de polifenoli la taxonii de *Taxus* analizați  
**R** = ritidomă; **F** = frunză; **A** = aril; **S** = semințe; **T1** = *Taxus baccata* – spontan; **T2** = *Taxus baccata* – cultivat; **T3** = *Taxus baccata* 'Robusta' – cultivat; **IV** – aprilie (formarea strobililor); **VI** – iunie (creșterea vegetativă intensă); **IX** – septembrie (alocarea biomasei către rădăcini)

#### 7.3.2.2. Conținutul total de flavonoide al extractelor alcoolice

Rezultatele practice obținute pe parcursul experimentelor derulate în cadrul prezentei teme de cercetare (Figura 7.15.) evidențiază faptul că ritidoma și frunzele de *Taxus* reprezintă organele cele mai bogate în flavonoide.



**Figura 7.15.** Conținutul total de flavonoide la taxonii de *Taxus* analizați  
**R** = ritidomă; **F** = frunză; **A** = aril; **S** = semințe; **T1** = *Taxus baccata* – spontan; **T2** = *Taxus baccata* – cultivat; **T3** = *Taxus baccata* 'Robusta' – cultivat; **IV** – aprilie (formarea strobililor); **VI** – iunie (creșterea vegetativă intensă); **IX** – septembrie (alocarea biomasei către rădăcini)

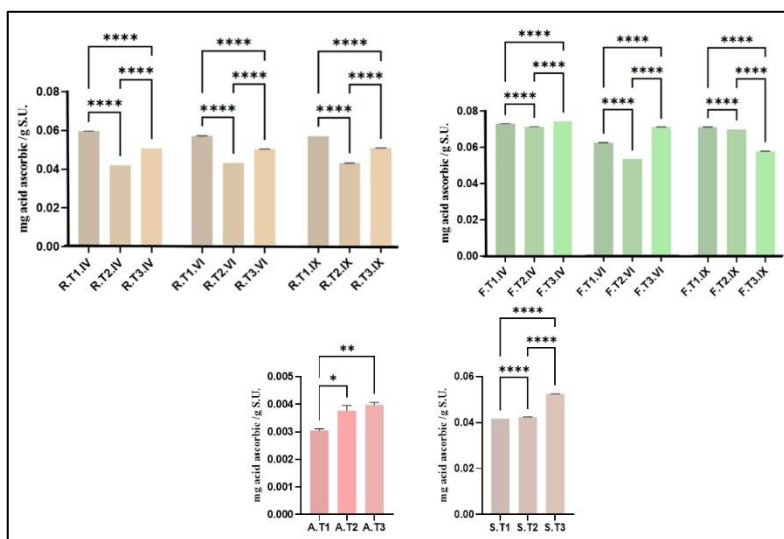
În materialul vegetal analizat cantități semnificative de astfel de compuși se găsesc pe parcursul toamnei (IX- septembrie) pentru taxonul spontan **T1** și pentru taxonul cultivat **T2**. În același timp, semințele taxonului cultivat **T3** prezintă cantități semnificativ mai

ridicate de flavonoide, comparativ cu ceilalți doi taxoni studiați, iar ariliile taxonilor cultivați **T2** și **T3** evidențiază conținuturi semnificativ mai mari, comparativ cu taxonul spontan **T1**.

### 7.3.3. Evaluarea efectelor antioxidante și antidenaturante a extractelor alcoolice

#### 7.3.3.1. Activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice

Activitatea antioxidantă și intensitatea sa în plante depind de existența diferiților compuși în respectiva specie vegetală. Activitățile antioxidante și de eliminare a radicalilor liberi realizate de compușii flavonoidici în organismele vegetale sunt atent studiate și prezentate în literatura de specialitate (Das și colab., 1993).



**Figura 7.16.** Activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice la taxonii de *Taxus* analizați  
**R** = ritidomă; **F** = frunză; **A** = aril; **S** = semințe; **T1** = *Taxus baccata* – spontan; **T2** = *Taxus baccata* – cultivat; **T3** = *Taxus baccata* 'Robusta' – cultivat; **IV** – aprilie (formarea strobililor); **VI** – iunie (creșterea vegetativă intensă); **IX** – septembrie (alocarea biomasei către rădăcini)

Datele obținute practic în cercetările realizate de noi, utilizând extracte alcoolice din diverse organe ale taxonilor de *Taxus* luați în studiu (Figura 7.16.) evidențiază cele mai ridicate valori ale activității antioxidante în cazul extractelor obținute din frunze, urmate de cele din ritidomă, din semințe și, în cele din urmă, de cele din arili.

#### 7.3.3.2. Activitatea antidenaturantă a extractelor alcoolice

Experiențele derulate pentru evaluarea posibilului efect antiinflamator al extractelor de tisă au fost exprimate ca echivalent mg/ g acid salicilic (tabelul 7.7.), scopul aplicării acestui test vizând urmărirea efectului antidenaturant al proteinelor determinat de extracte de concentrații diferite (1%, 2%, 3%, 4%, 5%) obținute din ritidomă, frunze, arili și semințe recoltate de la cei trei taxoni luați spre analiză în 3 momente definitorii ale ciclului

ontogenetic propriu al tisei și stabilirea cărui organ, a cărui taxon și în ce moment de analiză îi revin efectele mai puternice antidenaturante ale proteinelor.

**Tabel 7.7.** Activitatea antidenaturantă a extractelor alcoolice preparate din organe vegetative și de reproducere ale taxonilor de *Taxus* analizați exprimată ca echivalent mg/ g acid salicilic

| Sezon<br>PROBA | IV                       |                          |                          | VI                        |                           |                           | IX                        |                          |                          |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                | T1                       | T2                       | T3                       | T1                        | T2                        | T3                        | T1                        | T2                       | T3                       |
| <b>R. 1%</b>   | <b>0.54</b><br>±<br>0.05 | <b>0.19</b><br>±<br>0.04 | <b>0.08</b><br>±<br>0.03 | <b>0.05</b><br>±<br>0.02  | <b>1.10</b><br>±<br>0.07  | <b>0.50</b><br>±<br>0.14  | <b>4.44</b><br>±<br>1.83  | <b>1.00</b><br>±<br>0.42 | <b>1.57</b><br>±<br>0.64 |
|                | ***                      |                          |                          | *                         |                           |                           | ns                        |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>R. 2%</b>   | <b>0.99</b><br>±<br>0.03 | <b>0.26</b><br>±<br>0.11 | <b>0.12</b><br>±<br>0.08 | <b>0.29</b><br>±<br>0.03  | <b>0.51</b><br>±<br>0.10  | <b>1.08</b><br>±<br>0.16  | <b>0.34</b><br>±<br>0.13  | <b>3.18</b><br>±<br>0.41 | <b>1.33</b><br>±<br>0.05 |
|                | ***                      |                          |                          | **                        |                           |                           | ***                       |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>R. 3%</b>   | <b>1.52</b><br>±<br>0.03 | <b>0.75</b><br>±<br>0.28 | <b>0.85</b><br>±<br>0.12 | <b>0.58</b><br>±<br>0.04  | <b>0.52</b><br>±<br>0.13  | <b>1.16</b><br>±<br>0.14  | <b>1.52</b><br>±<br>0.62  | <b>5.96</b><br>±<br>0.53 | <b>1.42</b><br>±<br>0.23 |
|                | *                        |                          |                          | *                         |                           |                           | ***                       |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>R. 4%</b>   | <b>1.83</b><br>±<br>0.26 | <b>2.06</b><br>±<br>0.19 | <b>1.86</b><br>±<br>0.50 | <b>0.64</b><br>±<br>0.05  | <b>1.51</b><br>±<br>0.30  | <b>1.29</b><br>±<br>0.19  | <b>1.57</b><br>±<br>0.61  | <b>5.58</b><br>±<br>0.51 | <b>4.64</b><br>±<br>1.83 |
|                | ns                       |                          |                          | ns                        |                           |                           | ns                        |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>R. 5%</b>   | <b>2.02</b><br>±<br>0.37 | <b>2.16</b><br>±<br>0.02 | <b>2.05</b><br>±<br>0.29 | <b>0.96</b><br>±<br>0.10  | <b>4.73</b><br>±<br>1.49  | <b>2.51</b><br>±<br>0.20  | <b>3.49</b><br>±<br>1.25  | <b>7.36</b><br>±<br>0.55 | <b>3.75</b><br>±<br>0.21 |
|                | ns                       |                          |                          | ns                        |                           |                           | *                         |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>F. 1%</b>   | <b>0.26</b><br>±<br>0.29 | <b>0.08</b><br>±<br>0.11 | <b>0.24</b><br>±<br>0.09 | <b>0.34</b><br>±<br>0.16  | <b>0.36</b><br>±<br>0.15  | <b>0.78</b><br>±<br>0.17  | <b>2.08</b><br>±<br>0.26  | <b>0.10</b><br>±<br>0.10 | <b>0.09</b><br>±<br>0.15 |
|                | ns                       |                          |                          | ns                        |                           |                           | ***                       |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>F. 2%</b>   | <b>1.42</b><br>±<br>0.76 | <b>1.12</b><br>±<br>0.27 | <b>1.42</b><br>±<br>0.11 | <b>0.91</b><br>±<br>0.19  | <b>1.36</b><br>±<br>0.27  | <b>1.88</b><br>±<br>0.14  | <b>4.10</b><br>±<br>0.12  | <b>0.15</b><br>±<br>0.06 | <b>1.17</b><br>±<br>0.26 |
|                | ns                       |                          |                          | *                         |                           |                           | ****                      |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>F. 3%</b>   | <b>2.96</b><br>±<br>0.26 | <b>2.67</b><br>±<br>0.15 | <b>2.43</b><br>±<br>0.25 | <b>4.10</b><br>±<br>0.52  | <b>6.31</b><br>±<br>4.53  | <b>4.78</b><br>±<br>0.49  | <b>4.66</b><br>±<br>0.41  | <b>3.09</b><br>±<br>1.42 | <b>4.38</b><br>±<br>0.41 |
|                | ns                       |                          |                          | ns                        |                           |                           | ns                        |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>F. 4%</b>   | <b>5.09</b><br>±<br>0.68 | <b>4.93</b><br>±<br>0.05 | <b>2.90</b><br>±<br>0.32 | <b>13.03</b><br>±<br>2.14 | <b>9.22</b><br>±<br>1.15  | <b>8.42</b><br>±<br>1.50  | <b>4.83</b><br>±<br>0.23  | <b>2.88</b><br>±<br>0.30 | <b>5.17</b><br>±<br>0.63 |
|                | *                        |                          |                          | ns                        |                           |                           | *                         |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>F. 5%</b>   | <b>9.91</b><br>±<br>0.54 | <b>5.49</b><br>±<br>0.86 | <b>8.89</b><br>±<br>1.14 | <b>22.63</b><br>±<br>0.56 | <b>10.27</b><br>±<br>5.05 | <b>19.87</b><br>±<br>0.73 | <b>12.12</b><br>±<br>1.21 | <b>4.55</b><br>±<br>0.46 | <b>9.68</b><br>±<br>0.94 |
|                | *                        |                          |                          | ns                        |                           |                           | **                        |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |
| <b>A. 1%</b>   | -                        | -                        | -                        | -                         | -                         | -                         | <b>0.13</b><br>±<br>0.05  | <b>0.12</b><br>±<br>0.02 | <b>0.10</b><br>±<br>0.05 |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           | ns                        |                          |                          |
|                |                          |                          |                          |                           |                           |                           |                           |                          |                          |

**Tabel 7.7.** Activitatea antidenaturantă a extractelor alcoolice preparate din organe vegetative și de reproducere ale taxonilor de *Taxus* analizați exprimată ca echivalent mg/ g acid salicilic

|              |   |   |   |   |   |   |                          |                          |                          |
|--------------|---|---|---|---|---|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>A. 2%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>0.10</b><br>±<br>0.06 | <b>1.05</b><br>±<br>0.06 | <b>0.15</b><br>±<br>0.01 |
|              |   |   |   |   |   |   | ****                     |                          |                          |
| <b>A. 3%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>1.35</b><br>±<br>0.01 | <b>1.35</b><br>±<br>0.07 | <b>1.13</b><br>±<br>0.02 |
|              |   |   |   |   |   |   | *                        |                          |                          |
| <b>A. 4%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>1.37</b><br>±<br>0.07 | <b>1.49</b><br>±<br>1.10 | <b>1.31</b><br>±<br>0.03 |
|              |   |   |   |   |   |   | ns                       |                          |                          |
| <b>A. 5%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>1.57</b><br>±<br>0.03 | <b>1.69</b><br>±<br>0.08 | <b>1.34</b><br>±<br>0.07 |
|              |   |   |   |   |   |   | *                        |                          |                          |
| <b>S. 1%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>0.01</b><br>±<br>0.00 | <b>0.09</b><br>±<br>0.06 | <b>0.03</b><br>±<br>0.01 |
|              |   |   |   |   |   |   | ns                       |                          |                          |
| <b>S. 2%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>0.11</b><br>±<br>0.09 | <b>0.41</b><br>±<br>0.04 | <b>0.26</b><br>±<br>0.09 |
|              |   |   |   |   |   |   | ns                       |                          |                          |
| <b>S. 3%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>0.28</b><br>±<br>0.10 | <b>0.49</b><br>±<br>0.03 | <b>1.62</b><br>±<br>0.05 |
|              |   |   |   |   |   |   | ****                     |                          |                          |
| <b>S. 4%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>1.53</b><br>±<br>0.59 | <b>1.36</b><br>±<br>0.07 | <b>2.31</b><br>±<br>0.09 |
|              |   |   |   |   |   |   | ns                       |                          |                          |
| <b>S. 5%</b> | - | - | - | - | - | - | <b>2.58</b><br>±<br>0.27 | <b>1.49</b><br>±<br>0.09 | <b>4.33</b><br>±<br>0.11 |
|              |   |   |   |   |   |   | ****                     |                          |                          |

**Legendă:** IV – aprilie (formarea strobililor); VI – iunie (creșterea vegetativă intensă); IX – septembrie (alocarea biomasei către rădăcini); T1 = *Taxus baccata* – spontan; T2 = *Taxus baccata* – cultivat; T3 = *Taxus baccata* 'Robusta' – cultivat; R = ritidomă; F = frunză; A = aril; S = semințe; 1%, 2%, 3%, 4%, 5% - concentrația extractelor; diferențele statistice au fost marcate cu asterisc: \* = p<0.05; \*\* = p<0.01; \*\*\* = p<0.001; \*\*\*\* = p<0.001

### Considerații preliminare:

Ca urmare a evaluării calitative și cantitative a extractelor vegetale obținute din organele vegetative și de reproduce de la taxonii de *Taxus* avuți în atenție în trei momente definitorii ale ciclului lor fenologic, a testării posibilelor lor efecte antioxidante și a efectelor antidenaturante asupra proteinelor, putem desprinde următoarele:

- în compoziția extractelor alcoolice și apoase ale taxonilor investigați s-a evidențiat prezența compușilor fenolici, alcaloidici și a celor carotenoidici;
- conform literaturii de până la acest moment consultate, analiza și discutarea spectrelor de absorbție a acestor extracte constituie o noutate științifică cel puțin la nivel național;
- cantitatea compușilor polifenolici, flavonoidici și activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice obținute din ritidomă, frunze, arili și semințe la taxonii de tisă analizați au înregistrat ușoare variații cantitative între taxoni și momentele de analiză; în acest sens se remarcă taxonul cultivat **T2**, care prezintă cantități mai mari de compuși polifenolici și flavonoidici, comparativ cu taxonul spontan **T1**;
- cele mai ridicate valori ale activității antioxidante ale extractelor alcoolice preparate din diverse organe ale taxonilor de *Taxus* clasează, pentru extractele obținute din ritidomă, specia spontană **T1** pe primul loc, iar pentru extractele obținute din frunze, arili și semințe, taxonul cultivat **T3**, a cărui extracte preparate din aceste organe prezintă cea mai ridicată activitate antioxidantă în momentele de formare a strobililor (IV- aprilie) și de creștere vegetativă intensă (VI- iunie);
- evaluarea posibilului efect antiinflamator al extractelor alcoolice de tisă prin determinarea acțiunii antidenaturante a proteinelor animale (albumină) s-a manifestat semnificativ în cazul extractelor obținute din:
  - ritidoma taxonilor **T1** și **T2** (extracte de concentrație 1%, 2% și 3%);
  - frunzele taxonului **T1**, (extracte de concentrație 2%, 1% și 5%);
  - ariliile taxonului **T2** (extracte de concentrație 2%, 3% și 5%) ;
  - semințele taxonului **T3** (extracte de concentrație 3% și 5%).

#### **7.3.4. Evaluarea în condiții experimentale de laborator a potențialului de biocontrol a unor extracte vegetale obținute din taxoni ai genului *Taxus* L. la specii de plante test**

##### **7.3.4.1. Efecte asupra indicilor de germinație**

Extractele apoase obținute din organele taxonilor de *Taxus* luați în studiu au exercitat influențe diferite asupra indicilor de germinație analizați (procentaj de germinație, viteză de germinație, viteză acumulată de germinație, coeficient al ratei de germinație, viteză de emergență, energie germinativă, indice de vigoare) la cele două specii test, fiind constatate



influențe mai puternice în cazul semințelor de roșii - *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia (plantă de cultură), comparativ cu cele de știr - *Amaranthus retroflexus* L. (specie ruderală cu frunza lată).

Pentru ambele specii test avute în atenție, germinația semințelor a fost monitorizată pe parcursul a 336 de ore (14 zile), urmând protocolul de lucru pentru acest tip de determinare prezentat în literatura de specialitate (Yarnia și colab., 2009; Singh și colab., 2012).

#### 7.3.4.2 Efecte asupra indicilor biometrici

♦ În experimentele care au avut ca specie test știrul - *Amaranthus retroflexus* L., specie de buruiănă cu frunză lată, o parte dintre extractele apoase de *Taxus* testate au inhibat, în general, parametrii biometrici analizați. Pentru această specie influențe mai puternice au fost înregistrate în cazul aplicării tratamentelor cu extractele obținute din ritidoma și din frunzele tuturor celor trei taxoni de tisă analizați.

♦ În cazul speciei de cultură *Lycopersicon esculentum* Mill, soiul Silvia, analiza comparativă a parametrilor biometrici ce caracterizează plantulele nou formate în procesul de germinație în urma aplicării tratamentelor cu extracte apoase de ritidomă, frunze, arili și semințe obținute de la cei trei taxoni de tisă avuți în studiu ne permite să considerăm că aceștia au fost, în general, semnificativ statistic reduși, comparativ cu proba martor.

#### Considerații preliminare:

Ca urmare a cercetărilor de laborator efectuate pentru identificarea posibilelor efecte induse de aplicarea extractelor apoase obținute din organele vegetative și de reproducere aparținând exemplarelor a trei taxoni de *Taxus* (spontani și cultivați) aflați în trei momente definitorii ale ciclului fenologic, se pot desprinde următoarele:

- extractele apoase obținute din ritidoma, frunzele, ariliile și semințele taxonilor de tisă avuți în studiu, în special cele obținute din ritidomă, exercită la speciile de plante test luate în lucru efecte inhibitorii asupra parametrilor de germinație (procentajul de germinație, viteza de germinație, viteza acumulată de germinație, coeficientul ratei de germinație, viteza de emergență, energia germinativă, indicele de vigoare);
- aplicarea extractelor apoase de concentrație 5% obținute din ritidoma taxonului spontan **T1** și a taxonului cultivat **T3** inhibă semnificativ elongația rădăcinii plantulelor nou formate de *Amaranthus retroflexus* L.;

- în cazul speciei test *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia, aplicarea extractelor apoase de concentrații 1 și 5% obținute din ritidoma tuturor taxonilor de tisă luați în studiu și a extractelor de concentrație 1% preparate din frunzele taxonului cultivat T3 inhibă elogația rădăcinii noilor plantule formate;
- elongația hipocotilului plantulelor nou formate prin germinație la ambele specii de plante test analizate a fost stimulată de aplicarea extractelor apoase de concentrație 5% obținute din arilii recoltați de la toți cei trei taxoni de tisă investigați;
- semințele de *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia au prezentat o sensibilitate mai ridicată față de extractele apoase aplicate, comparativ cu semințele de *Amaranthus retroflexus* L.;

## CONSIDERAȚII FINALE

Cercetările realizate prin prezenta teză de doctorat, cu un grad sporit de interdisciplinaritate, au urmărit să evidențieze, pe de o parte, câteva aspecte referitoare la biologia unor taxoni ai genului *Taxus* L. spontani și cultivați în zona de N-E a țării, în funcție de factori specifici de influență (factori interni, factori care țin de suprafața foliară și factori externi), iar pe de altă parte să evalueze, în condiții experimentale de laborator, posibilul potențial alelopativ (de bioerbicid) al extractelor apoase de concentrații diferite obținute din organe vegetative și de reproducere ale respectivilor taxoni, prin interpretarea efectelor induse de acestea asupra procesului de germinație și de dezvoltare a plantulelor rezultate la specii de plante test din grupe diferite (buruieni și plante de cultură).

În urma cercetărilor efectuate pe materialul vegetal avut la dispoziție și în condițiile de vegetație/de cultivare date, cercetările organizate în funcție de obiectivele urmărite, reliefăm următoarele:

### **Determinările privind modificările morfologice la nivel foliar, ca răspuns la acțiunea factorilor de mediu** au evidențiat faptul că:

- suprafața foliară variază ca dimensiuni la reprezentanții genului *Taxus* în corelație cu condițiile de mediu avute la dispoziție în habitatul în care aceștia vegetează în mod spontan sau sunt cultivați, condiții reprezentate în principal de gradul de iluminare / nivelul crescut de umbră al frunzelor lor;

- rezultatele obținute practic sunt în concordanță cu datele prezentate de literatura de specialitate, subliniind faptul că exemplarele taxonului **T1**, care vegetează spontan în condițiile de umbră specifice pădurii din Rezervația Tudora prezintă, în mod evident, o mare plasticitate în ceea ce privește morfologia suprafeței foliare și a indicilor asociați acesteia, plasticitate materializată în formarea unei suprafețe foliare aproape duble, comparativ cu cea a exemplarelor cultivate **T2** și **T3**, neumbrite.

#### **Determinările privind caracteristicile micromorfologice și histo-anatomice ale frunzelor și tulpinilor, în funcție de acțiunea factorilor de mediu evidențiază:**

##### ➤ **Caracteristici micromorfologice ale frunzelor:**

- suprafața epidermei superioare a frunzelor aparținând exemplarelor celor trei taxoni de tisă spontani și cultivați analizați este aproximativ asemănătoare, iar organizarea epidermei inferioare, prin dispoziția specială a benzilor stomatice față de nervura mediană oferă specialiștilor taxonomiști un valoros caracter micromorfologic cu certă valoare de diagnoză în identificarea taxonilor genului *Taxus*;
- fenomenele de asimetrie fluctuantă observate la frunzele exemplarelor taxonilor cultivați **T2** și **T3** privind dispoziția structurilor lor epidermice în raport cu nervura mediană sunt în consens cu datele prezentate de literatura de specialitate actuală și pot fi corelate cu potențiali factori de stres ai mediului de cultivare a respectivilor taxoni.

##### ➤ **Caracteristici histo-anatomice ale aparatului foliar și ale tulpinilor (ramurilor):**

- **Asemănări ale structurii frunzelor** între taxonii analizați, care confirmă, de altfel, datele existente deja în literatura de specialitate se referă la:
  - prezența stomatelor numai în epiderma inferioară (limb hipostomatic);
  - dispunerea stomatelor în șiruri ce formează benzi de lățimi variabile (5-7-8-9 stomate) de o parte și de alta a nervurii mediane;
  - organizarea complexă a aparatului stomatic și prezența *Florin's ring*;
  - absența hipodermei sclerenchimatice lignificate;
  - absența canalelor secretoare;
  - organizarea nervurii frunzei;

- prezența discretă a parenchimului de transfuzie în părțile laterale ale fasciculului conducător al nervurii;
  - celulele epidermei inferioare sunt papiliforme.
- **Deosebiri la nivelul structurii frunzelor** între taxonii analizați, ce se încadrează, mai degrabă, în categoria *variațiilor structurale* corelate cu condițiile ecologice, deosebiri considerate ca reacții de răspuns adaptativ ale acestora la condițiile de vegetație oferite exemplarelor de tisă analizate se referă la:
- structura bifacială inegal ecvifacială, cel puțin la cele două extremități ale frunzei exemplarului **T2**, față de consacrată structură bifacială heterofacială de la frunza exemplarelor **T1** (spontan) și **T3** (cultivat), structură menționată constant și în literatura de specialitate;
  - mezofil cu țesut palisadic unistratificat, cu celule înalte la frunza exemplarului spontan **T1** și țesut palisadic bistratificat, pe alocuri tristratificat, la frunza exemplarului cultivat **T3**, cu celule joase;
  - disproporție cantitativă între liberul și lemnul fasciculelor conducătoare în favoarea celui dintâi la frunza exemplarului cultivat **T3**.
- **Tulpinile (ramurile):**
- taxonul spontan **T1** prezintă un contur neregulat al secțiunii transversale, cu coaste de mărimi diferite (două mai ample, iar altele două-trei mai mici) separate prin valecule de adâncime medie, iar epiderma unistratificată evidențiază stomate cu camere suprastomatice de dimensiuni diferite, prin intervenția pereților externi ai celulelor anexe +/- alungiți, uneori cu aspect de creastă, care proemină deasupra nivelului extern al celulelor epidermice;
  - ramurile cu vârste cuprinse între 1 și 3 ani la toți taxonii investigați (**T1**, **T2** și **T3**) prezintă în secțiune transversală contur neregulat, cu 2 coaste de amplitudine mai mare, alternând cu 2-3 coaste de amplitudine mai mică;
  - taxonul **T2** evidențiază modificări aparte de structură (dezorganizarea parenchimului asimilator încă din primul an de viață), determinate, probabil de condiții +/- favorabile de cultivare (udări succesive exagerate cantitativ, precipitații bogate în intervale scurte de timp sau tratamente chimice speciale de combatere a bolilor și dăunătorilor).

✚ **Determinările privind reacțiile fiziologice de răspuns la nivel foliar, în corelație cu factori interni ai frunzei, cu factori de la suprafața frunzei și cu factori externi (de mediu)** ne-au permis să afirmăm că:

- procesele fiziologice fundamentale (fotosinteză, transpirație, respirație) se desfășoară cu intensități diferite, în funcție de fazele fenologice specifice ciclului vital al taxonilor avuți în atenție, de factorii de la nivelul frunzelor și de condițiile climatice de care au dispus aceștia în habitatele naturale / locația de cultivare;
- conținutul de pigmenți fotoasimilatori foliari prezintă variații cantitative în funcție de particularitățile ciclului biologic al taxonilor investigați, de variația factorilor interni, a celor de la nivelul aparatului lor foliar (Qleaf, tleaf, Ci, gs), precum și a celor externi (temperatură, umiditate atmosferică) de care au dispus taxonii în mediu;
- conținutul de apă, de substanță uscată, de elemente minerale și de substanțe organice acumulate în frunzele exemplarelor aparținând taxonilor analizați înregistrează variații în funcție de genotipul lor și de momentul de investigație, demonstrând că indivizii vegetali studiați au înregistrat, pe parcursul derulării succesive a fenofazelor specifice ciclului vital propriu, niveluri metabolice strict corelate cu necesitățile lor vitale.

✚ **Determinările privind variația conținutului unor compuși biochimici din arili, ca răspuns la acțiunea factorilor de mediu** au evidențiat următoarele:

- pigmenții antocianici și carotenoidici acumulați la nivelul arililor taxonilor avuți în atenție au înregistrat variații cantitative vizibile, taxonul cultivat *Taxus baccata* 'Robusta' (T3) prezentând cele mai mari valori, pe când conținutul de vitamină C se menține aproximativ la același nivel la toți cei trei taxoni, rezultatele obținute în acest sens fiind în concordanță cu datele prezentate de literatura de specialitate consultată;
- diferențele cantitative înregistrate între compușii biochimici dozați în arilii recoltați de la taxonii de tisă spontani și cultivați avuți în atenție pot fi explicate prin specificitatea genotipurilor lor, care au permis manifestarea unor reacții adaptative specifice ale acestora la diverșii factori de mediu de care au dispus în zonele în care vegetează (Rezervația de Tisă din pădurea

Tudora, comparativ cu locația taxonilor cultivați), între care: temperatura aerului, gradul de iluminare în mediu, calitatea și umiditatea solului (disponibilitatea apei), altitudinea, expunerea la acțiunea curenților de aer (vânt).

#### Cercetările privind compoziția biochimică in situ și ex situ a unor taxoni ai genului

***Taxus L.*** au reliefat următoarele:

- compoziția chimică a uleiului volatil și a hidrosolurilor obținute prin hidrodistilare din frunzele celor trei taxoni luați în studiu recoltate în perioada de creștere vegetativă intensă (VI-iunie) au prezentat variații calitative și cantitative discutate în literatura de specialitate ca fiind dependente de specie (inclusiv factorii intrinseci fiecărui taxon), de vârsta plantei producătoare, de organul supus extracției, de condițiile climatice existente în regiunea geografică în care vegetează arborii;
- numărul componentelor uleiurilor volatile extrase din frunzele exemplarelor de tisă aparținând taxonilor luați în studiu este mai mare la taxonii cultivați (42 compuși - taxonul **T2**, respectiv 36 compuși - taxonul **T3**), în comparație cu specia spontană **T1** (31 compuși);
- evaluarea calitativă prin spectrofotometrie a hidrosolurilor obținute ca produs secundar al extragerii uleiurilor prin hidrodistilarea materialului vegetal (frunze), indică prezența compușilor aromatici, evidențiați în regiunea 220 – 240 nm, respectiv a compușilor fenolici detectați în regiunea 260 – 280 nm a spectrelor lor de absorbție, compuși care le pot conferi acestora posibile proprietăți de tip alelopativ;
- rezultatele parțial pozitive obținute în procesul de separare, identificare și cuantificare a *taxolului* din extractele acetonice de tisă prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) impun aprofundarea cercetărilor și concentrarea extractelor de lucru, astfel încât să poată fi calculată concentrația taxolului identificat în materialul vegetal; un astfel de demers științific are caracter de noutate în cercetarea pe plan național, nefiind comunicate, din ceea ce cunoaștem, până la momentul actual, rezultate în acest sens, în literatura de specialitate românească;

**✚ Evaluarea calitativă, cantitativă și a posibilelor efecte ale unor extracte vegetale obținute din taxoni ai genului *Taxus* L. ne-au permis să considerăm următoarele:**

- caracterizarea chimică a extractelor apoase și alcoolice de concentrații 1% și 5% obținute din organe diferite (ritidomă, frunze, arili și semințe) ale taxonilor de tisă studiați a evidențiat prezența compușilor fenolici, alcaloidici și a celor carotenoidici, analiza și discutarea spectrelor de absorbție a acestor extracte constituind, până la acest moment, o noutate științifică cel puțin la nivel național;
- cantitatea compușilor polifenolici, flavonoidici și activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice au înregistrat ușoare variații valorice între taxoni și momentele de analiză; în acest sens se remarcă taxonul cultivat **T2**, care prezintă cantități mai mari de compuși polifenolici și flavonoidici, comparativ cu taxonul spontan **T1**;
- cele mai ridicate valori ale activității antioxidante ordonează extractele alcoolice preparate din diverse organe ale taxonilor de *Taxus* funcție de intensitatea activității lor antioxidante astfel: extracte obținute din frunze, urmate de cele preparate din ritidomă, din semințe și, în cele din urmă, de cele obținute din arili, cu diferențe semnificative statistic între toți taxonii, în toate momentele de analiză (lunile IV, VI, IX).
- evaluarea posibilului efect antiinflamator al extractelor alcoolice de tisă prin determinarea acțiunii lor antidenaturante asupra proteinelor s-a manifestat în cazul extractelor (de concentrații diferite) obținute din: ritidoma colectată de la taxonii **T1** (spontan) și **T2** (cultivat), frunzele taxonului **T1** (spontan), ariliile taxonului **T2** (cultivat) și semințele taxonului **T3** (cultivat);

**✚ Evaluarea, în condiții experimentale de laborator, a potențialului de biocontrol a unor extracte vegetale obținute din taxoni ai genului *Taxus* L. la specii de plante test au demonstrat următoarele:**

- extractele apoase de concentrație 1%, respectiv 5% preparate din ritidoma, frunzele, semințele și ariliile celor trei taxoni de tisă luați în studiu au produs efecte inhibitorii puternice asupra germinăției semințelor plantelor test, ordonarea organelor prezentate ca sursă de extract apos fiind realizată în ordinea descrescătoare a efectelor respectivelor extracte;

- semințele de *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia au prezentat o sensibilitate mai ridicată față de extractele apoase aplicate, comparativ cu semințele de *Amaranthus retroflexus* L., fenomen evidențiat prin nivelul de modificare valorică a indicilor specifici procesului de germinație;
- elongația rădăcinii plantulelor de *Amaranthus retroflexus* L. nou formate prin germinație este inhibată semnificativ în special de extractele apoase de concentrație 5% preparate din ritidomă (taxonii **T1** și **T3**), iar la *Lycopersicon esculentum* Mill., soiul Silvia de extractele apoase de ambele concentrații obținute din ritidoma tuturor taxonilor analizați, dar și de extractele de concentrație 1% obținute din frunze (taxonul **T3**).
- elongația hipocotilului plantulelor nou formate prin germinație la ambele specii de plante test analizate a fost stimulată de aplicarea extractelor apoase de concentrație 5% obținute din arilii recoltați de la toți cei trei taxoni de tisă investigați;

✚ Efectele de tip alelopatric produse de extractele apoase obținute din organele vegetative și de reproducere aparținând celor trei taxoni de tisă avuți în atenție pot fi și trebuie continuate și completate prin mărirea numărului și diversificarea tipurilor de testări de ordin morfo-anatomic, fiziologic și biochimic la o paletă mai largă de plante țintă de interes agricol (buruieni și plante de cultură), ca etapă de cercetare importantă în munca de identificare, izolare și testare a unor compuși biologic activi cu implicații în agricultura organică (posibil potențial de bioerbicid).

✚ Prin rezolvarea scopului și obiectivelor propuse, cercetarea desfășurată a urmărit să completeze literatura de specialitate națională și nu numai, cu date obținute practic, prin experiențe pe teren și în laborator, referitoare la biologia taxonilor de *Taxus* luați în lucru, taxoni a căror potențial alelopatric este mai puțin cunoscut, în ideea sprijinirii eforturilor de conservare a speciei spontane *Taxus baccata* L., cu areale reduse la nivel național și a încurajării cultivării, în scop ornamental, a unor taxoni de tisă comercializați tot mai mult prin intermediul unor firme horticole autorizate, susținând cu argumente veridice, valoarea lor reală pentru protecție naturală a unor specii spontane și / sau cultivate importante din punct de vedere agricol.



#### **Direcții de cercetare deschise de prezenta teză:**

- standardizarea metodei de preparare (prin testarea a diferite tipuri de extractanți și tehnici de lucru) a extractelor vegetale din organe vegetative și de reproducere a taxonilor de *Taxus* spontani / cultivați în diferite zone ale țării noastre, pentru identificarea, izolarea și cuantificarea taxolului prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC).
- continuarea cercetărilor privind compoziția chimică și posibilele aplicații ale uleiurilor volatile și ale hidrosolurilor obținute prin hidrodistilare la mai multe mostre de material vegetal (organe vegetative și de reproducere) aparținând unui număr mai mare de exemplare de tisă care vegetează spontan / sunt cultivate în România, ca resurse de compuși biologic activi valoroși pentru medicină, agricultură și ecologie.
- continuarea testărilor pentru validarea rezultatelor obținute până la acest moment referitoare la posibilul efect antiinflamator / antidenaturant al proteinelor manifestat de extractele preparate din ritidoma, frunzele, arilii și semințele taxonilor de tisă luați în studiu, optimizarea și standardizarea metodei de extracție și de analiză a acestor extracte, ca sursă de compuși biologic activi cu potențial medicinal, aplicabilă la determinări similare în cazul altor mostre de material vegetal recoltate de la exemplare de tisă spontane sau cultivate în țara noastră.

#### **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. Abbas T., Ahmad A., Kamal A., Nawaz M.Y., Jamil M.A., Saeed T., Abid M.A., Ali H.H., Ateeq M., **2021**. Ways to use allelopathic potential for weed management: a review. *International Journal of Food Science and Agriculture*, 5(3):492-498. DOI: 10.26855/ijfsa.2021.09.020.
2. Abraham D., Francischini A.C., Pergo E.M., Kelmer-Bracht A.M., Ishii-Iwamoto E.L., **2003**. Effect of alpha-pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 41:985-991.
3. Adams W.W., Stewart J.J., Demmig-Adams B., **2018**. Photosynthetic modulation in response to plant activity and environment. In *The Leaf: A Platform for Performing Photosynthesis*, Adams W.W., Terashima I., (Eds.). Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 493–563.
4. Alavi S.J., Veiskarami R., Esmailzadeh O., Gadow K.V., **2020**. Analyzing the Biological and Structural Diversity of Hyrcanian Forests Dominated by *Taxus baccata* L., *Forests*, 11, 1-17. DOI: 10.3390/f11060701.

5. Arteni V., Tănase E., **1981**. Practicum de biochimie generală, *Ed. Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași*.
6. Asaad R., Reshi Z.A., Jan S., Rashid I., **2017**. Biology of *Amaranthus*. *Botanical Review*, 83:382-436. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12229-017-9194-1>
7. Babula P., Vaverkova V., Poborilova Z., Ballova L., Masarik M., Provaznik I., **2014**. Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84:78.
8. Baci A., Ranga F., Fetea F., Zăvoi S., Socaciu C., **2013**. Fingerprinting Food supplements and their botanical ingredients by coupled UV/Vis/FTIR spectrometry. *Bulletin UASVM Food Science and Technology* 70(1):8-15.
9. Bădulescu L., **2009**. *Botanica și fiziologia plantelor*. Ed. Elisavaros, Burucești, pp. 220-232.
10. Bajwa A.A., **2014**. Sustainable weed management in conservation agriculture. *Crop Prot*, 65:105–113.
11. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., **2008**. Biological effects of essential oils – a review, *Food and Chemical Toxicology*, 46:446–475. DOI:10.1016/j.fct.2007.09.106.
12. Benham S.E., Houston Durrant T., Caudullo G., de Rigo D., **2016**. *Taxus baccata* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: Ayaz S.M., de Rigo D., Caudullo G., Houston Durrant T., Mauri A., (Eds), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, pp.e015921+. <https://w3id.org/mtv/FISE-Comm/v01/e015921>.
13. Bhadoria P.B.S., **2011**. Allelopathy: A natural way towards weed management. *American Journal of Experimental Agriculture* 1(1):7-20.
14. Bîrsan, C., Mardari, C., Copoț, O., Apăștinei, L., **2017**. Development of *Taxus baccata* L. population under tree canopy in the Tudora Reservation. *Acta Oecologica Carpatica*, XI:37-50.
15. Biswas C., Johri B.M., **1997**. The Gymnosperms. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH*.
16. Boldor O., Răianu O., Trifu M., **1983**. Fiziologia plantelor (lucrări practice), *Ed. Didactică și Pedagogică*, București.
17. Burzo I., Dobrescu A., **2005**. Fiziologia plantelor. Fiziologia arbuștilor și plantelor lemnoase spontane. Vol VII. *Ed. Elisavaros*, București.
18. Burzo I., Toma C., **2012**. Țesuturile secretoare și substanțe volatile din plante. *Ed. Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași*, p.148.
19. Butnariu M., **2014**. Detection of the polyphenolic components in *Ribes nigrum* L. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(1):11-14.
20. Casals P., Camprodon J., Caritat A., Rios A.I., Guix D., Garcia-Marti X., Martin-Alcon S., Coll L. **2015**. Forest structure of Mediterranean yew (*Taxus baccata* L.) populations and neighbor effects on juvenile yew performance in the NE Iberian Peninsula. *Forest Systems* 24(3), e041. DOI:10.5424/fs/2015243-07469.
21. Catalogul habitatelor, speciilor și siturilor Natura 2000 în România **2013**, p.373.
22. Chamberlain C.J., **1935**. Gymnosperms: structure and evolution. *The University of Chicago Press*, Illinois.
23. Chiapusio G., Sánchez A.M., Reigosa M.J., González L., Pellissier F., **1997**. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on germination process? *Journal of Chemical Ecology*, 23(11):2445-2453.
24. Corbu S., Cachiță-Cosma D., **2010**. Alelopatia. *Ed. Universității din Oradea*, pp.11-166.
25. D’Amato S., Serio A., López C.C., Paparella A. **2018**. Hydrosols biological activity and potential as antimicrobials for food application. *Food Control*, 86:126-137.

26. Das B., Anjani G., Kashinatham A., Venkataiah B., Rao S., **1998**. Taxoids, lignans, and simple phenolic compounds from a sample of the needles of Himalayan *Taxus baccata*. *Natural Products Sciences*, 4(2):78 – 83.
27. Das B., Takhi M., Srinivas K.V.N.S., Yadav J.S., **1993**. Phenolics from needles of Himalayan *Taxus baccata*. *The International Journal of Plant Biochemistry in Phytochemistry*, 33(6):1489-1491.
28. Dayan F.E., Duke S.O., **2006**. Clues in the search for new herbicides. In: *Allelopathy physiological process with ecological implications*, Reigosa M.J., Pedrol N, González L. (Eds.), Ed. Springer, Dordrecht, Olanda, pp. 63-84.
29. Dayan F.E., Howell J., Widenhamer J.D., **2009**. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. *Journal of Experimental Botany*, 60(7):2107-2117.
30. Dempsey D., Hook, I., **2000**. Yew (*Taxus*) species – Chemical and morphological variations. *Pharmaceutical Biology*, 28(4):274-280.
31. Devaney J.L., Whelan P.M., Jansen A.K., **2015**. Light responses of yew (*Taxus baccata* L.); does size matter? *Trees*, 29:109-118. DOI: 10.1007/s00468-014-1095-x.
32. Duke S.O., **2010**. Allelopathy: current status of research and future of the discipline: a Commentary. *Allelopathy Journal*, 25:17–30.
33. Dumitraş D.A., Bunea A., Vodnar D.C., Hanganu D., Pall E., Cenariu M., Gal A.F., Andrei S., **2022**. Phytochemical characterization of *Taxus baccata* L. aril with emphasis on evaluation of the antiproliferative and pro-apoptotic activity of rhodoxanthin. *Antioxidants*, 11, 1039. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11061039>.
34. Durán A.G., Chinchilla N., Molinillo J.M., Macías F.A. **2018**. Influence of lipophilicity in Oacyl and O-alkyl derivatives of juglone and lawsone: a structure-activity relationship study in the search for natural herbicide models. *Pest Management Science*, 74:682.
35. Durán A.G., Chinchilla N., Molinillo J.M., Macías F.A., **2019**. Structure-activity relationship studies on naphthoquinone analogs. The search for new herbicides based on natural products. *Pest Management Science*, 75:2517.
36. Einhelling F.A., **1993**. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In: Inderjit, Dakshini KMM, Einhelling FA (eds.). *Allelopathy. Organisms, processes and applications*, pp. 97-116.
37. Ellenberg H., Weber H.E., Düll R., Wirth V., Werner W., Paulißen D., **1992**. Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. *Scr Geobotanica*, 18:3–248.
38. Erhard D., **2006**. Allelopathy in aquatic environments, In *Allelopathy physiological process with ecological implications*, Reigosa M. J., Pedrol N., González L. (Eds.), Springer, Dordrecht, Olanda, pp. 433-450.
39. Farjon A., **2017**. A handbook of the world's conifers. Vol. I, II, second edition, Ed. *Brill Leiden*, Boston.
40. Farooq M., Bajwa A.A., Cheema S.A., Cheema Z.A., **2013**. Application of allelopathy in crop production. *International Journal of Agriculture & Biology*, 15: 1367-1378.
41. Farooq M., Jabran K., Cheema Z.A., Wahid A., Siddique K.H.M., **2011**. The role of allelopathy in agricultural pest management, *Pest Management Science*, 67:493-506. DOI: 10.1002/ps.2091.
42. Florin R., **1948**. On the morphology and relationships of the *Taxaceae*. *Botanical Gazette*, 110(1):31–39. DOI:10.1086/335515.
43. Ghimire B., Lee C., Heo K., **2014**. Leaf anatomy and its implications for phylogenetic relationships in *Taxaceae* s. l. *Journal Plant Research*, 127:373-388. DOI: 10.1007/s10265-014-0625-3.

44. Głąb L., Sowiński J., Bough R., Dayan F.E., **2017**. Allelopathic potential of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in weed control: a comprehensive review. In: Sparks D.L. (ed) *Advances in Agronomy*, vol 145. Academic Press, Cambridge, pp 43–95. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.05.001>
45. Gniazdowska A., Bogatek R., **2005**. Allelopathic interactions between plants. Multi-site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(3):395-407.
46. Granéli E., Pavia H., **2006**. Allelopathy in marine ecosystems. In Reigosa M. J., Pedrol N., González L. *Allelopathy physiological process with ecological implications*. Ed. Springer, Dordrecht, Olanda, pp. 415-432.
47. Grudnicki M., **2006**. Fiziologia plantelor lemnoase, *Ed. Universității, Suceava*.
48. Hageneder F., **2013**. Yew. *Eds. Reaktion Books LTD*, London, 21-59.
49. Hamidipour A., Radjabian T., Charlet D.A., Zarrei M., **2018**. Leaf anatomical investigation of *Cupressaceae* and *Taxaceae* in Iran. *Wulfenia* 18:95-111.
50. Herald T.J., Gadgil P., Tilley M., **2012**. High-throughput microplate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 92 (11): 2326-2331.
51. Hirata K., Yoshitomi S., Dwi S., Iwabe O., Mahakhant A., Polchai J., Miyamoto K., **2003**. Bioactivities of nostocine a produced by a freshwater cyanobacterium *Nostoc spongioforme* TISTR 8165. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95: 512-517.
52. Hynninen A., Külaviir M., Kirsimäe K., **2018**. Air-drying is sufficient pre-treatment for in situ visualization of microbes on minerals with scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 146:77-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.007>.
53. Iqbal A., Fry S.C., **2012**. Potent endogenous allelopathic compounds in *Lepidium sativum* seed exudate: effects on epidermal cell growth in *Amaranthus caudatus* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 63(7):2595-2604.
54. Iszkuło G., Boratynski A., **2006**. Analysis of the relationship between photosynthetic photon flux density and natural *Taxus baccata* seedlings occurrence. *Acta Oecologica*, 29:78–84.
55. Iszkuło G., **2010**. Success and failure of endangered tree species: low temperatures and low light availability affect the survival and growth of European yew (*Taxus baccata* L) seedlings. *Polish Journal of Ecology*, 58(2):259-271.
56. Jia J.Z., Gong N.C., Du M., **1989**. Studies on the chemical constituents of *Saussurea medusa* Maxim. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 11:202–204.
57. Kostina-Bednarz M., Płonka J., Barchanska H., **2023**. Allelopathy as a source of bioherbicides: challenges and prospects for sustainable agriculture, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 22:471-504. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-023-09656-1>.
58. Kumar, S., **2006**. Spectroscopy of Organic Compounds, *Guru Nanak Dev University, Amritsar*.
59. Kumar S., Abedin M., Singh A.K., Das S., **2020**. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In: Lone R., Shuab R., Kamili A.N. (Eds) *Plant phenolics in sustainable agriculture*. Springer, Singapore, pp 517–532. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1>.
60. Li Z., Wang Q., Ruan X., Pan C., Jiang D., **2010**. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15:8933-8952.
61. Li Z.R., Nimisha A., Bai L.Y., **2019**. Allelopathy in sustainable weeds management. *Allelopathy Journal*, 48(2):109-138. DOI: <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2019-48-2-1249>.

62. Lim C.J., Lim C.K., Ee G.C.L., **2019**. Allelopathic invasive plants as phytoinhibitor bioresource material in weed control: a review. *Agriculture and Natural Resources*, 53:439-448. DOI: <https://doi.org/10.34044/j.anres.2019.53.5.01>
63. Liu Y., Zeng R., An M., Mallik A., Luo S., **2008**. Autotoxicity in agriculture and forestry. In: *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*, Zeng R.S., Mallik A.U., Luo S.M. (Ed.), Springer, pp. 283-301.
64. Lobiuc A., Cuibari R., **Frunzete M.**, Costică N., Burducea M., Ardelean M., Zamfirache M.M. **2016**. The effects of *Taxus baccata* L. aqueous extracts on germination, seedling growth and physiological parameters of test species. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 20(2):118-125.
65. Macías F.A., Durán A.G., Molinillo J.M.G., **2020**. The chemical language of plants In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 123*, Kinghorn D., Falk H., Gibbons S., Kobayashi J., Asakawa Y., Liu J.K. (Eds), Springer, 1-85.
66. Macías F.A., Mejías F.J.R., Molinillo J.M.G., **2019**. Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Pest Management Science*, 75:2413-2436. DOI:10.1002/ps.5355.
67. Macías F.A., Oliveros-Bastidas A., Marín D., Carrera C., Chinchilla N., Molinillo J.M.G., **2008**. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. *Phytochemistry Reviews*, 7:179-194. DOI:10.1007/s11101-007-9062-4.
68. Mehdizadeh M., Mushtaq W., **2019**. Biological control of weeds by allelopathic compounds from different plants: a bioherbicide approach. In: *Natural remedies for Pest, Disease and Weed Control*, Egbuna C., Sawicka B. (eds), Academic Press, Cambridge, pp 107–117. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00009-9>.
69. Mominul Islam A.K.M., Kato-Noguchi H. **2014**. Phytotoxic activity of *Ocimum tenuiflorum* extracts on germination and seedling growth of different plant species. *The Scientific World Journal*. DOI:10.1155/2014/676242.
70. Motmainna M., Juraimi A.S.B., Uddin Md.K., Asib N.B., Mominul Islam A.K.M., Hasan M., **2021**. Assessment of allelopathic compounds to develop new natural herbicides: a review. *Allelopathy Journal*, 52(1):21–40. DOI: <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2021-52-1-1305>.
71. Murariu A., **2002**. Fiziologie vegetală Vol. II., Editura Junimea, Iași.
72. Narwal S.S., **1999**. Allelopathy update, basic and applied aspects, vol 2. *Science Publishers Inc.*, New Hampshire, pp 200–254.
73. Narwal S.S., **2006**. Allelopathy in ecological sustainable agriculture. In *Allelopathy - a physiological proces with ecological implications*, Reigosa M. J., Pedrol N., González L. (eds), Ed. Springer, Dordrecht, Olanda, pp. 537-564.
74. Nimbal C.I., Yerkes C.N., Weston L.A., Weller S.C., **1996**. Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 54(2):73-83.
75. Oltean M., Negrean G., Popescu A., Roman N., Dihoru G., Sanda V., Mihailescu S., **1994**. Lista Roșie a plantelor superioare din Romania. Studii, sinteze, documentații de ecologie, *Institutul de Biologie*, București, 1:1-52.
76. Oprea A., **2005**. Lista critică a plantelor vasculare din România, *Ed. Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași*, p. 27.
77. Pallardy S.G., **2008**. Physiology of woody plants, third edition, *Elsevier*, pp.107-167; 325-366.
78. Parascan D., Danciu M., **2001**. Fiziologia plantelor lemnoase, *Ed. “Pentru viață”*, Brașov.

79. Parmar V.S., Jha A., **1998**. Chemical constituents of *Taxus* species. *Studies in Natural Products Chemistry*, 20:79 – 134.
80. Pârnu C., **2004**. Enciclopedia plantelor. Plante din flora României. Vol. III. *Ed. Tehnica*, Bucuresti, pp. 795-796; 813.
81. Pârnu C., **2005**. Enciclopedia plantelor. Plante din flora României. Vol. IV. *Ed. Tehnica*, Bucuresti, pp. 255-262; 620-621.
82. Perrin P.M., Mitchell F.J.G., **2013**. Effects of shade on growth, biomass allocation, and leaf morphology in European yew (*Taxus baccata* L.). *European Journal of Forest Research*, 132(2):211-218.
83. Politi M., Ferrante C., Menghini L., Angelini P., Flores G.A., Muscatello B., Braca A., De Leo M., **2022**. Hydrosols from *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, and *Cupressus sempervirens*: Phytochemical analysis and bioactivity evaluation. *Plants*, 11, 349. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11030349>.
84. Pretsch E., Bühlmann P., Badertscher M., **2009**. Structure determination of organic compounds, Tables of spectral data, *Springer -Verlag Berlin Heidelberg*.
85. Radulović N., Blagojević P., Palić R., Zlatković B., **2010**. Chemical composition of the essential oil hydrodistilled from Serbian *Taxus baccata* L., *Journal of Essential Oil Research*, 22(5):458-461. DOI:10.1080/10412905.2010.9700371.
86. Rajeswara Rao, B.R. **2013**. Hydrosols and water-soluble essential oils: medicinal and biological properties. Recent progress in medicinal plants. *Essential oils I*, 36, 119-140.
87. Reigosa M., Games A.S., Ferreira A.G., Barghetti F. **2013**. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 27(4):629-646.
88. Reigosa M.J., González L., **2006**. *Forest ecosystems and allelopathy*. In *Allelopathy: a physiological proces with ecological implications*, Reigosa M. J., Pedrol N., González L.(eds.) Springer, Dordrecht, Olanda, pp. 451-464.
89. Reigosa M.J., Souto X.C., González L., **1999**. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation* 28: 83 – 88.
90. Rice E.L. **1984**. *Allelopathy*, Second Edition. Academic press, Inc., pp. 356-360.
91. Rietveld W.J., **1983**. Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of Chemical Ecology*, 9:295.
92. Rimando A.M., Dayan F.E., Czarnata M.A., Weston L.A., Duke S.O., **1998**. A new photosystem II electron transfer inhibitor from *Sorghum bicolor* L. *Journal of Natural Products*, 61: 927-930.
93. Rizvi S.J.H., Haque H., Singh V.K., Rizvi V., **1992**. A discipline called allelopathy. In *Allelopathy. Basic and applied aspects*, Rizvi S.J.H., Rizvi V. (Eds.), Chapman & Hall, pp. 1-10.
94. Robakowski P., Pers-Kamczyc E., Ratajczak E., Thomas P. A., Ye Z-P., Rabska M., Iszkulo G., **2018**. Photochemistry and Antioxidative Capacity of Female and Male *Taxus baccata* L. Acclimated to Different Nutritional Environments. *Frontiers in Plant Science*, 9:742. DOI: 10.3389/fpls.2018.00742.
95. Sadeghi-aliabadi H., Asghari G., Mostafavi S.A., Esmaeili A., **2009**. Solvent optimization on taxol extraction from *Taxus baccata* L., using HPLC and LC-MS. *DARU*, 17(3):192-198.
96. Sârbu I., Ștefan N., Oprea A., **2013**. Plante vasculare din România. Determinator de teren. *Ed. Victor B Victor*, pp.52, 168, 684.
97. Scavo A., Restuccia A., Mauromicale G., **2018**. Allelopathy: principiles and basic aspects for agroecosystem control. In *Sustainable Agriculture Reviews, Ecology for Agriculture*, Gaba S., Smith B., Lichtfouse E. (Eds), Springer, vol. 28, pp 47-101.



98. Scavo A., Mauromicale G., **2021**. Crop allelopathy for sustainable weed management in agroecosystems: knowing the present with a view to the future. *Agronomy*, 11:2104. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11112104>.
99. Schex R., Lieb V.M., Schweiggert R., Steingass C.B., **2021**. Carotenoid profiles of red – and yellow-colored arils of cultivars of *Taxus baccata* L. and *Taxus x media* Rehder. *Phytochemistry*, 186:112741.
100. Schlesinger W.H., Jasechko S., **2014**. Transpiration in the global water cycle. *Agricultural and Forest Meteorology*, 189–190:115–117. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2014.01.011>.
101. Singh J., Divaker Sastry E.V., Singh V., **2012**. Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during seed germination stage. *Physiol Mol Biol Plants*, 18(1):45-50.
102. Sinkkonen A., **2006**. Ecological relationships and allelopathy. In *Allelopathy physiological process with ecological implications*, Reigosa M. J., Pedrol N., González L.(eds.), Ed. Springer, Dordrecht, Olanda, pp. 373-393.
103. Soltys D., Krasuska U., Bogatek R., Gniazdowska A., **2013**. Allelochemicals as bioherbicides – Present and perspectives. In: *Herbicides – Current research and case studies in use*. Price A. Kelton J. (Eds.), Ed. Intech, Croatia, pp. 517-542.
104. Spjut R.W., **2007**. Taxonomy and nomenclature of *Taxus* (Taxaceae). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 1(1): 203–289.
105. Spjut R.W., **2007a**. A phytogeographical analysis of *Taxus* (Taxaceae) based on leaf anatomical characters. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 1(1), 291–332.
106. Spjut R.W., **2007b**. Taxonomy and nomenclature of *Taxus* (Taxaceae). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 1(1), 203–289.
107. Stefanović M., Ristić M., Popović Z., Matić R., Nikolić B., Vidaković V., Petković D.O., Bojović S., **2016**. Chemical composition and interpopulation variability of essential oils of *Taxus baccata* L. from Serbia, *Chemistry Biodiversity*, 1-36. DOI: 10.1111/cbdv.201500326.
108. Sumanta N., Haque C. I., Nishika J., Suprakash R., **2014**. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Science*, 4(9):63-69.
109. Sunulahpašić A., Čekić S., Golijan J., Hamidović S., **2017**. The ecological role of interactions between plants in agroecosystems. *Agro-knowledge Journal*, 18(4):293-305. DOI: <https://doi.org/10.7251/AGREN1704293S>.
110. Tabaszewska M., Antoniewska A., Rutkowska J., Skoczylas Ł., Słupski J., Skoczzeń-Słupska R., **2021**. Bioactive components, volatile profile and in vitro antioxidative properties of *Taxus baccata* L. red aril, *Molecules*, 26:4474, DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26154474>.
111. Terzi I., Kocaçalışkan I., Benlioğlu O., Solak K., **2003**. Effects of juglone on growth of cucumber seedlings with respect to physiological and anatomical parameters. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25:353.
112. Teskey R.O., Sheriff D.W., Hollinger D.Y., Thomas R.B., **1995**. External and internal factors regulating photosynthesis In *Resource physiology of conifers*, Smith W., Hinckley T. M., (Eds.), Academic Press, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 105-140.
113. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Hawkins Byrne D., **2006**. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7):669–675. DOI:10.1016/j.jfca.2006.01.003.

114. Thomas P.A., Polwart A., **2003**. *Taxus baccata* L. *Journal of Ecology*, 91:489-524.
115. Walker G.W., Kookana R.S., Smith N.E., Kah M., Doolette C.L., Reeves P.T., Lovell W., Anderson D.J., Turney T.W., Navarro D.A., **2018**. Ecological risk assessment of nano-enabled pesticides: a perspective on problem formulation. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 66(26):6480-6486. DOI:10.1021/acs.jafc.7b02373.
116. Weir T.L., Park S.W., Vivanco J.M., **2004**. Biochemical and physiological mechanism mediated by allelochemicals. *Current Opinions in Plant Biology*, 7(4):472-479.
117. Wieser G., **2007**. Limitation by an Insufficient Carbon Assimilation and Allocation. In *Trees at their Limit*, Wieser G., Tausz M., (Eds.), Springer, 79-129.
118. Yarnia M., Khorshidi M.B., Tabrizi E.F.M., **2009**. Allelopathic effects of sorghum extracts on *Amaranthus retroflexus* seed germination and growth. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(3&4):770-774.
119. Yin H.-M., Yang M.-H., Li P.-L., Yu X.-L., Xiong H., Xu Q.-Y., Zou F.-L., Chen Y., Dai W.-H., Jiang Y., Li Y.-L., **2022**. Seasonality of photosynthetic physiology and leaf anatomy in three different *Quercus* L. section *Cyclobalanopsis* seedlings of *Quercus chungii*, *Quercus gilva*, and *Quercus glauca* in the Subtropical region of South China. *Forests*, 13:2067. DOI: [10.3390/f13122067](https://doi.org/10.3390/f13122067).
120. Zanoschi V., Turenschi E., Toma M., **1981**. Plante toxice din România, *Ed. Ceres*, București, pp. 48-49.
121. Zhao L.X., Wang Z.X., Zou Y.L., Gao S., Fu Y., Ye F., **2021**. Phenoxypyridine derivatives containing natural product coumarins with allelopathy as novel and promising proporphyrin IX oxidase-inhibiting herbicides: Design, synthesis and biological activity study. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 177:104897. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104897.
122. <http://www.worldbotanical.com/Introduction.htm>
123. <http://www.worldbotanical.com/Nomenclature.htm#nomenclature>

## ANEXE