

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

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Efecte biologice induse de tratamente cu extracte de *Colchicum autumnale* L. la taxoni ai genului *Ocimum* L., în condiții experimentale de cultivare**

**Conducător de doctorat:**

**Profesor Emerit Dr. Zamfirache Maria-Magdalena**

**Student-doctorand:**

**Moroșan Ioana-Claudia**

**Iași**

**2025**

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista prescurtărilor.....                                                                         | 4  |
| Cuvinte cheie: .....                                                                              | 5  |
| INTRODUCERE .....                                                                                 | 6  |
| SCOP ȘI OBIECTIVE .....                                                                           | 8  |
| 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII FENOMENULUI DE ALELOPATIE .....                                  | 9  |
| 1.1. Determinarea potențialului alelopatic al unei specii.....                                    | 10 |
| 1.2. Variante experimentale în studiul alelopatiei .....                                          | 11 |
| 1.3. Indici ai răspunsurilor plantelor la stresul alelopatic.....                                 | 14 |
| 1.4. Limitări în studiul experimental al alelopatiei.....                                         | 16 |
| 2. ASPECTE DESCRIPTIVE ALE MATERIALULUI VEGETAL UTILIZAT.....                                     | 18 |
| 2.1. Aspecte descriptive ale speciei <i>Colchicum autumnale</i> L. ....                           | 18 |
| 2.1.1. Încadrarea taxonomică a speciei <i>Colchicum autumnale</i> L. ....                         | 18 |
| 2.1.2. Elemente descriptive ale speciei <i>Colchicum autumnale</i> L. ....                        | 18 |
| 2.1.3. Elemente de ecologie ale speciei <i>Colchicum autumnale</i> L. ....                        | 20 |
| 2.1.4. Elemente descriptive ale materialului vegetal utilizat în prepararea extractelor .....     | 21 |
| 2.1.5. Profilul biochimic al speciei <i>Colchicum autumnale</i> L. ....                           | 24 |
| 2.2. Colchicina și efectele cunoscute asupra organismelor vegetale.....                           | 26 |
| 2.2.1. Colchicina – Istoricul cercetărilor .....                                                  | 26 |
| 2.2.2. Colchicina – Structură chimică, biosinteză, stereoizomeri.....                             | 28 |
| 2.2.3. Colchicina – Origine naturală.....                                                         | 30 |
| 2.2.4. Colchicina - Efecte la nivel celular.....                                                  | 33 |
| 2.2.5. Colchicina - Efecte la nivel morfologic.....                                               | 35 |
| 2.2.6. Colchicina - Efecte la nivel fiziologic și biochimic .....                                 | 37 |
| 2.3. Aspecte descriptive ale speciei-test ( <i>Ocimum basilicum</i> L.).....                      | 39 |
| 2.3.1. Încadrarea taxonomică a speciei <i>O. basilicum</i> L. ....                                | 39 |
| 2.3.2. Elemente descriptive ale speciei <i>O. basilicum</i> L. ....                               | 39 |
| 2.3.3. Elemente privind cultivarea și cerințele ecologice ale speciei <i>O. basilicum</i> L. .... | 42 |
| 2.3.4. Elemente descriptive ale materialului vegetal test ( <i>O. basilicum</i> L.).....          | 43 |
| 3. MATERIALE ȘI METODE.....                                                                       | 45 |
| 3.1. Cercetări preliminare .....                                                                  | 45 |
| 3.1.1. Tratarea soiurilor speciei-test cu colchicină .....                                        | 45 |
| 3.1.2. Tratarea soiurilor speciei-test cu extracte metanolice de <i>C. autumnale</i> L.....       | 54 |
| 3.2. Cercetări ulterioare .....                                                                   | 61 |

|                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1. Prepararea extractelor alcoolice și apoase din materialul vegetal colectat (plante ale speciei <i>C. autumnale</i> L.).....                                                              | 61  |
| 3.2.2. Dozarea, separarea și cuantificarea conținutului și determinarea activității antioxidante a extractelor din materialul vegetal colectat (plante ale speciei <i>C. autumnale</i> L.)..... | 63  |
| 3.2.3. Teste genetice și fiziologice asupra soiurilor speciei-test ( <i>O. basilicum</i> L.).....                                                                                               | 67  |
| 3.2.4. Schematizarea tratamentelor cu extracte alcoolice și apoase din organe vegetative și de reproducere ale plantelor speciei <i>C. autumnale</i> L. ....                                    | 69  |
| 3.2.5. Evaluarea efectelor induse de tratamente în semințele test ( <i>O. basilicum</i> L.).....                                                                                                | 72  |
| 3.2.6. Evaluarea efectelor induse de tratamente în plantulele test ( <i>O. basilicum</i> L.).....                                                                                               | 72  |
| 3.2.7. Analize statistice.....                                                                                                                                                                  | 76  |
| 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....                                                                                                                                                                  | 78  |
| 4.1. Rezultate preliminare.....                                                                                                                                                                 | 78  |
| 4.1.1. Tratarea soiurilor speciei-test cu colchicină .....                                                                                                                                      | 78  |
| 4.1.2. Tratarea soiurilor speciei-test cu extracte metanolice de <i>Colchicum autumnale</i> L... ..                                                                                             | 97  |
| 4.2. Rezultate ulterioare.....                                                                                                                                                                  | 109 |
| 4.2.1. Caracterizarea extractelor alcoolice și apoase preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de <i>C. autumnale</i> L. ....                                            | 109 |
| 4.2.2. Teste genetice și fiziologice asupra soiurilor speciei test ( <i>O. basilicum</i> L.) .....                                                                                              | 117 |
| 4.2.3. Tratarea soiurilor speciei-test cu extracte alcoolice și apoase din organe vegetative și de reproducere ale plantelor speciei <i>C. autumnale</i> L. ....                                | 125 |
| 4.3. Discuții .....                                                                                                                                                                             | 255 |
| 4.3.1. Strategii alelopatice ale plantelor aparținând speciei <i>C. autumnale</i> L. ....                                                                                                       | 255 |
| 4.3.2. Efecte ale extractelor preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de <i>C. autumnale</i> L. asupra semințelor de <i>O. basilicum</i> L. ....                        | 256 |
| 4.3.3. Efecte ale extractelor preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de <i>C. autumnale</i> L. asupra plantulelor de <i>O. basilicum</i> L. ....                       | 260 |
| 4.4. Alte observații .....                                                                                                                                                                      | 266 |
| CONSIDERAȚII FINALE .....                                                                                                                                                                       | 269 |
| BIBLIOGRAFIE .....                                                                                                                                                                              | 273 |

**Cuvinte cheie:** alelopatie, brândușă de toamnă, colchicină, busuioc, germinație, anomalii morfo-anatomice, procese fiziologice, pigmenți asimilatori, polifenoli, flavonoide, activitate antioxidantă

## Introducere

Alelopatia este un fenomen ecologic prin care plantele își asigură un avantaj competitiv prin căi biochimice, în care metaboliții secundari pe care îi produc influențează creșterea și dezvoltarea altor organisme în mod inhibitor sau stimulator, proprietăți ce le conferă un potențial deosebit în rezolvarea unor probleme din agricultură (Macías et al., 2007; Duke, 2015; Amist, Li și Bai, 2019).

Contaminarea mediului prin utilizarea excesivă a erbicidelor și pesticidelor sintetice în agricultură, aflată în continuă creștere din cauza rezistenței dobândite a buruienilor față de compușii sintetici presupuși toxici sau inhibitori și distrugerea plantelor de cultură de către dăunători sau inhibarea dezvoltării acestora prin competiția cu plante invazive sunt doar câteva dintre problemele actuale din agricultură (Amist, Li și Bai, 2019). Printre posibilele soluții la aceste probleme se numără și compușii alelopatici de origine vegetală care, spre deosebire de compușii sintetici, sunt molecule solubile în apă și mai puțin toxice; în plus, prezintă un timp de înjumătățire relativ scurt și, prin urmare, sunt mai siguri pentru mediu (Ma et al., 2006).

Până în prezent, alelopatia a fost studiată din punctul de vedere al aplicațiilor clasice bazate pe gestionarea buruienilor din culturi pentru obținerea erbicidelor naturale și a dăunătorilor și agenților patogeni pentru obținerea pesticidelor naturale (Farooq et al., 2011). Cu toate acestea, alelopatia își poate găsi aplicativitate și ca mijloc de stimulare a rezistenței plantelor de cultură, prin valorificarea proprietăților unor metaboliți secundari (Ali et al., 2019).

Compușii alelopatici pot influența compoziția, structura și dinamica comunităților de plante native și cultivate prin exercitarea unor efecte biologice asupra plantelor, inhibând sau stimulând anumite procese fiziologice și biochimice, precum rata de germinație, procesele de fotosinteză, respirație, activitatea enzimatică (Inderjit, Weston și Duke, 2005).

Există metaboliți secundari alelopatici cu efecte asupra microtubulilor, considerați și compuși anti-mitotici, datorită faptului că induc dereglarea ciclului celular. Un astfel de compus este colchicina, extrasă de obicei din *Colchicum autumnale* L. și utilizată în cercetare și în creșterea plantelor pentru alterarea nivelului de ploidie în organismele vegetale, datorită proprietății sale de a inhiba polimerizarea tubulinei, formarea fusului de

diviziune și, implicit, diviziunea celulară (Paul, Halder și Jha, 2013). Utilizarea acestui compus sau a unor extracte ce conțin acest compus în studiile experimentale de alelopatie ar putea oferi o mai bună perspectivă asupra acestui fenomen biologic.

Cunoașterea modului de acțiune sau a efectelor unui compus prezintă o importanță deosebită în studiile de alelopatie, pentru că astfel proprietățile alelopatice ale unui compus pot fi demonstrate experimental, prin dezvoltarea și aplicarea unei metodologii de monitorizare a unui parametru asociat în mod specific cu modul de acțiune al compusului într-o manieră dependentă de doză (Duke, 2015).

Mai mult, utilizarea compușilor alelopatici precum colchicina în agricultură ar putea avea un impact pozitiv asupra plantelor-test, concretizat prin creșterea biomasei, rezistenței la dăunători, în competiții interspecifice și în condiții de mediu nefavorabile sau de stres sau/și producției de metaboliți secundari (Iannicelli et al., 2020; Manzoor et al., 2019).

În contextul celor discutate, lucrarea de față propune un studiu experimental ce cuprinde explorarea unor moduri diferite de abordare în ceea ce privește aplicabilitatea alelopatiei în cultivarea plantelor, prin dezvoltarea unei metodologii experimentale de studiu a efectelor alelopatice de utilizare a unor metode diferite de tratament cu extracte vegetale alcoolice și apoase de *Colchicum autumnale* L., valorificând proprietățile anti-mitotice ale unor compuși alelopatici din extracte (colchicina și compușii săi derivați) și a unor metode explorative de observație și analiză a efectelor biologice induse de acești compuși în plantele test, reprezentate de două soiuri de *Ocimum basilicum* L. Acest studiu urmărește, în același timp, să analizeze variațiile cantitative ale conținutului de metaboliți secundari cu activitate biologică în diferite organe ale speciei *C. autumnale* în stadiile de înflorire, creștere și fructificare, pentru a oferi o perspectivă asupra mecanismelor defensive și de adaptare a unei specii cu potențial alelopativ în cursul ciclului său ontogenetic la condițiile de mediu.

## Scop și obiective

Scopul cercetărilor a fost de a analiza și evalua efectele biologice ale extractelor vegetale preparate din organe ale plantelor speciei *Colchicum autumnale* L. asupra unor taxoni ai genului *Ocimum* L., pentru a determina nivelul lor de fitotoxicitate și posibilul potențial alelopativ și de aplicare a acestora ca tratamente biologice în agricultura unor plante de interes.

Obiectivele ce au fost urmărite în cadrul cercetărilor sunt:

1. Caracterizarea extractelor alcoolice și apoase cu posibil potențial alelopativ preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L. recoltate din flora spontană a României.
2. Testarea variantelor de tratament (extracte alcoolice și apoase preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L.) și a metodelor de aplicare a acestora organismelor vegetale test (taxoni ai genului *Ocimum* L.), în vederea determinării nivelului lor de fitotoxicitate.
3. Analiza parametrilor morfologici, anatomici, biochimici și fiziologici ai organismelor vegetale test (taxoni ai genului *Ocimum* L.) supuse tratamentelor cu extracte alcoolice și apoase de *C. autumnale* L., pentru determinarea efectelor stimulative sau inhibitoare induse de acestea.
4. Compararea rezultatelor privind răspunsurile organismelor vegetale test la tratamentele cu extracte alcoolice, față de extractele apoase obținute din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L.
5. Determinarea posibilului potențial alelopativ a extractelor obținute din diferite organe ale plantelor de *C. autumnale* L. și de aplicare a acestora ca tratamente biologice în agricultura ecologică la plante de interes economic (ornamental, medicinal și culinar).

## **Stadiul actual al cunoașterii fenomenului de alelopatie**

Studiile experimentale asupra fenomenului de alelopatie pornesc de la stabilirea potențialului alelopativ al unei specii prin determinarea metaboliților secundari pe care îi produce și a efectelor induse de acestea în organismele țintă (Duke, 2015). Cercetătorii au dezvoltat de-a lungul timpului diverse variante experimentale pentru a studia acest fenomen, cum ar fi creșterea semințelor speciei receptoare pe reziduuri de țesut vegetal din planta donatoare sau tratarea semințelor plantei receptoare cu extracte din planta donatoare (Keech et al., 2005; Lau et al., 2008; Wurst et al., 2010), creșterea concomitentă a plantelor donatoare și receptoare (Fujii et al., 2007; Dayan et al., 2009), sau creșterea plantei receptoare în solul în care a fost cultivată planta donatoare (Duke, 2015).

Cercetările din domeniul alelopatiei din ultimii 10 ani au demonstrat faptul că expunerea unui organism vegetal la compuși alelopatici induce stres oxidativ prin acumularea de specii reactive de oxigen în celule (Gniazdowska et al., 2015), ce poate rezulta în apoptoză prin activarea proteazelor, mecanism prin care planta își sacrifică țesuturile afectate pentru ca țesuturile sănătoase să poată supraviețui, procese ce duc treptat la modificări la nivel morfologic și anatomic, concretizate prin inhibarea creșterii și dezvoltării (Araniti et al., 2018; Šoln, Klemenčič și Dolenc Koce, 2022). Astfel, parametrii morfometrici, morfologici și anatomici sunt importanți de urmărit în studiile de alelopatie pentru că pot oferi indicii cu privire la modul de acțiune și efectele compușilor alelopatici studiați.

Compușii alelopatici pot afecta procesele fiziologice ale plantelor prin alterarea proteinelor implicate în procesul de fotosinteză și structuriile cloroplastelor, ce poate duce la reducerea conținutului de pigmenți fotosintetici, scăderea ratei de transfer de electroni, a conductanței stomatale, și a ratei procesului de transpirație (Yu et al., 2003; Wu et al., 2004; Yu et al., 2006; Bakhshayeshan-Agdam et al., 2020). Astfel, sunt importante de urmărit variațiile în conținutul de pigmenți asimilatori atunci când se studiază efectele unor compuși alelopatici asupra plantelor. Scăderea conținutului de clorofilă și de carotenoizi în frunze ca răspuns al plantelor la stresul alelopativ poate fi rezultatul unui dezechilibru în homeostazia celulară (Singh și Sunaina, 2014).

Un alt parametru important de urmărit pentru determinarea efectelor compușilor alelopatici în plantele test este cantitatea de polifenoli, fiind indici biochimici

importanți în determinarea nivelului de stres din organismul vegetal studiat, funcționând prin inhibarea speciilor reactive de oxigen (Agati și Tattini, 2010; Li et al., 2014). Flavonoidele, o clasă de polifenoli implicate în procesele de germinație a semințelor, de creștere și dezvoltare, protejează plantele de stresul oxidativ (Pollastri și Tattini, 2011; Agati et al., 2012). Astfel, o creștere în conținutul de compuși fenolici poate indica un nivel crescut de stres alelopativ în organismul vegetal studiat.

Utilizarea extractelor din organele unei specii cu potențial alelopativ asupra semințelor și meristemelor plantulelor speciei-test reprezintă o strategie în vederea amplificării efectelor alelopatiche ale speciei donatoare, astfel încât acestea să fie observabile și cuantificabile în specia receptoare, fiind aplicate tratamente pe termen scurt, conform recomandărilor cercetătorilor care au aprofundat studiile de alelopatie (Ciniglia et al., 2015; Tucker Serniak, 2016; Yan et al., 2016; Araniti et al., 2018; Šoln, Klemenčič și Dolenc Koce, 2022).

Semințele și plantulele, fiind organisme mai sensibile decât plantele mature la schimbările din mediu sau la factori de stres (Dolenc Koce și Šoln, 2018), reprezintă organisme-test ideale atunci când se urmărește studierea efectelor alelopatiche pentru că prezintă răspunsuri cuantificabile prin calcularea unor indici de germinație și creștere, iar meristemele reprezintă țesuturi încă nediferențiate, cu activitate metabolică intensă, dar și foarte sensibile la condiții de stres sau la acțiunea unor compuși cu activitate biologică, cum este colchicina.

Cu toate acestea, potențialele interacțiuni antagonice sau sinergice cu alți compuși din sol, stadiul de creștere și starea fiziologică a plantei receptoare, microbiota solului (în special a rizosferei), umiditatea solului, temperatura acestuia și alți factori (sau variabile) complică identificarea capacităților alelopatiche ale plantelor (Duke, 2015).

Densitatea de plantare a speciilor receptoare poate influența, de asemenea, rezultatul în ceea ce privește determinarea prezenței fenomenului de alelopatie. Orice efect al unui compus alelopativ se poate diminua dacă densitatea de plantare a speciei receptoare crește, pentru că există mai puțină cantitate de fitotoxine per plantă receptoare. O altă limitare a studiului alelopatiei este că planta care produce presupusul compus alelopativ poate produce cantități suficiente numai atunci când este în prezența unei anumite specii de plante vizate (Duke, 2015).

## Aspecte descriptive ale materialului vegetal utilizat

*Colchicum autumnale* L. (familia Colchicaceae), deși este o specie de plantă toxică, este utilizată în cercetare și în medicină ca sursă de colchicină, însă conține și alți metaboliți secundari cu proprietăți alelopatici, cum ar fi compușii polifenolici.

*Colchicum autumnale* L. - luată în studiu pentru determinarea posibilului său potențial alelopatic față de specii de plante de interes economic (în cazul de față, ornamental, culinar și medicinal) aplicabil în tratamente biologice în agricultura ecologică - prezintă un ciclu ontogenetic neobișnuit, a cărui cunoaștere este importantă pentru stabilirea momentului de colectare a materialului vegetal din teren destinat analizelor; acesta începe cu stadiul de înflorire, derulat în perioada de toamnă (lunile septembrie-octombrie), urmat de perioada de iarnă, în care fructul este retras în sol de către rădăcinile contractile, fiind astfel protejat de temperaturile scăzute. În perioada de primăvară (lunile martie-mai) planta este cea mai activă din punct de vedere fotosintetic, iar fructele încep să apară deasupra solului, înconjurată de frunze. Urmează, pe parcursul lunii iulie, perioada de maturare a fructelor, apoi perioada de inactivitate (luna august) (Jung et al., 2011).

Davoodi et al. (2021) au identificat prezența alcaloizilor, compușilor fenolici, taninurilor, flavonoidelor, cumarinelor, saponinelor, terpenoidelor, steroizilor și glicozidelor în conținutul extractelor alcoolice de *C. autumnale* L.

Colchicina, utilizată în cercetare și în creșterea plantelor pentru creșterea cantității de material genetic în organismele vegetale datorită proprietăților sale anti-mitotice cunoscute (Paul, Halder și Jha, 2013), poate fi considerată și compus alelopatic, pentru că induce efecte la nivel celular, precum anomalii cromozomiale (aglomerarea, condensarea și adezivitatea cromozomilor) (Udofia et al., 2024), dar și la nivel morfologic și fiziologic. Aceste efecte se pot concretiza prin inhibarea germinației și creșterii plantulelor unor specii expuse la anumite doze pe o perioadă de timp determinată (Mangena, 2021; Zhuo et al., 2021; Manzoor et al., 2023; Zeinullina et al., 2023), sau prin creșterea biomasei sau dimensiunii unor organe la alte specii (Niazian și Nalousi, 2020). Colchicina poate afecta indirect procesele fiziologice ale plantelor, cum ar fi regimul hidric sau capacitatea fotosintetizantă, prin inducerea unor modificări morfologice precum creșterea dimensiunii stomatelor pe suprafața foliară, concomitent cu reducerea densității acestora (Grouh et al., 2011; Sadhukhan et al., 2014; Gao et al., 2017). Pe de altă parte, acest compus poate stimula

biosinteza de metaboliți secundari de interes farmaceutic în plante, precum alcaloizii, fenolii și compușii antocianici (Dewitte, Van Laere și Van Huylenbroeck, 2012; Mostafa și Alhamd, 2016; Al-Jubouri și Alqaisi, 2023).

*Ocimum basilicum* L. (busuiocul), ales ca specie-test, este o plantă ierbacee erectă, anuală, cu tulpina tetramuchiata, fiind încadrată din punct de vedere taxonomic în familia Lamiaceae.

Soiul ‘Italiano Classico’, comercializat și sub numele de ‘Genovese’, este un soi de busuioc dulce cu frunze ovale ce se pliază ușor către interior, foarte aromat, ce se poate cultiva în sere, ghivece sau în câmp deschis. În cazul în care se dorește cultivarea acestui soi în spațiu deschis (câmp), este recomandată semănarea în perioada cuprinsă între lunile martie și septembrie, iar recoltarea plantelor mature se poate realiza din luna mai până în luna decembrie. În spațiile închise, furnizorul (Unisem S.A. Iași) recomandă semănarea în perioada cuprinsă în lunile noiembrie-februarie, iar recoltarea plantelor se poate face din luna ianuarie până în luna iunie, în funcție de stadiul de creștere al acestora.

Soiul ‘Aromat de Buzău’ este un soi de busuioc românesc obținut de către echipa de cercetare din cadrul SCDL Buzău care, conform specificațiilor furnizorului, este un soi semitardiv, ce se ramifică puternic, cu marginile frunzelor ușor dințate, având o aromă specifică, mentolată și fiind rezistent la bolile și dăunătorii specifici. Se recomandă ca plantele aparținând acestui soi să fie cultivate în seră, solar sau ghivece plasate într-un spațiu interior dacă se dorește cultivarea pe tot parcursul anului, sau în câmp atunci când se înființează culturi prin răsad în lunile martie-aprilie.

## Materiale și metode

### 1. Cercetări preliminare

#### *Tratarea materialului vegetal test cu colchicină*

În cadrul acestui studiu au fost testate diferite metode de tratament cu o gamă predeterminată de concentrații de colchicină sub formă de soluții apoase (Tabel 1) și determinate efectele biologice induse în plantele supuse tratamentelor, pentru a înțelege mai bine influența colchicinei asupra celulelor vegetale *in vivo*.

#### *Schematizarea tratamentelor cu soluții apoase de colchicină*

Aplicarea tratamentului cu colchicină asupra plantelor test a fost realizată prin patru metode proiectate conform literaturii de specialitate (Omidbaigi et al., 2010; Manzoor et al., 2019; Iannicelli et al., 2020). Materialul vegetal test utilizat în acest este sunt reprezentat de două soiuri ale speciei *Ocimum basilicum* L.: ‘Aromat de Buzău’ și ‘Italiano Classico’.

1. Prima metodă de aplicare a tratamentului cu colchicină a constat în imersarea unui număr de 30 de semințe în triplicat (90 de semințe per variantă de tratament cu extract) în diferite concentrații de colchicină (conform Tabelului 1), după care au fost distribuite în plăci Petri (Figura 1) și menținute în termostată la 20°C sau 25°C la un regim de iluminare de 17 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Semințele germinate au fost numărate zilnic, la interval de 24 de ore, la final fiind calculați indicii de germinație (conform formulelor prezentate în Tabelul 2), iar preplantulele rezultate au fost măsurate, pentru a le determina indicele de vigoare.

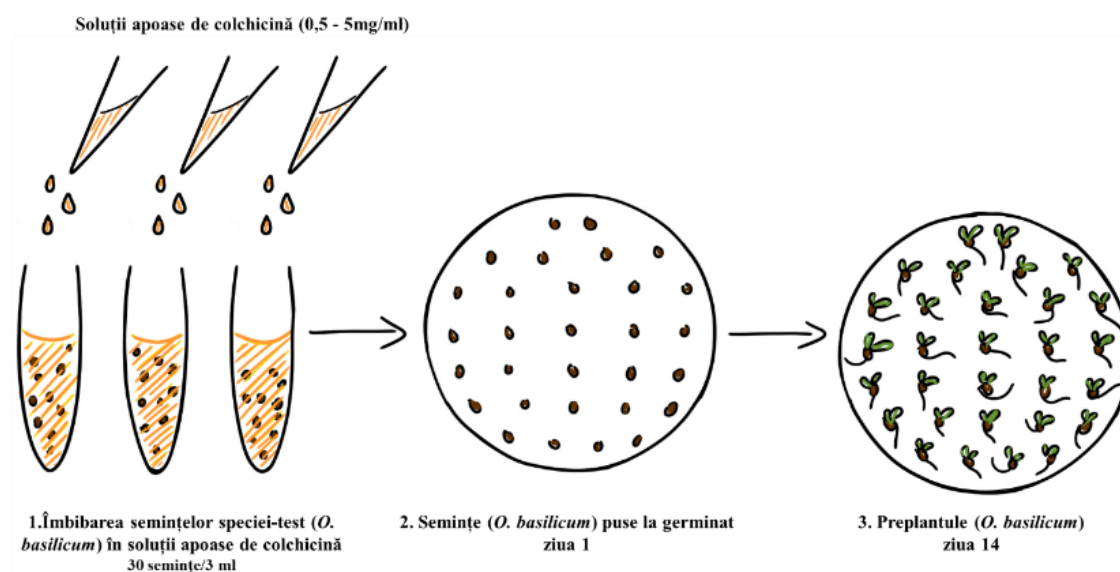


Figura 1. Schematizarea tratamentului cu soluții apoase de colchicină (0,5 – 5 mg/ml) asupra semințelor de *O. basilicum* L. (original)

2. Metoda nr. 2 de aplicare a tratamentului cu colchicină a constat în picurarea soluțiilor de colchicină de diferite concentrații (conform Tabelului 1) asupra preplantulelor de *O. basilicum* L. distribuite în plăci Petri (Figura 2), fiecare placă având un număr de 30 de preplantule în triplicat (3 plăci Petri pentru fiecare variantă experimentală). După 6, respectiv 12 ore, preplantulele au fost clătite și redistribuite în plăci Petri conform distribuției inițiale și păstrate în termostaț la 20°C sau 25°C la un regim de iluminare de 17 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

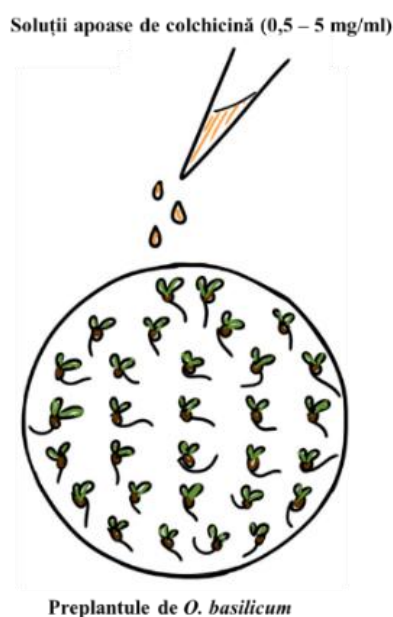
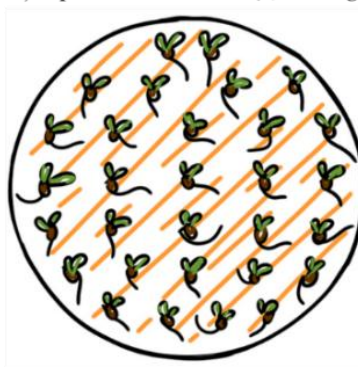


Figura 2. Schematizarea tratamentului cu soluții apoase de colchicină (0,5 – 5 mg/ml) asupra preplantulelor de *O. basilicum* L. (original)

3. Metoda nr. 3 de aplicare a tratamentului cu colchicină a constat în imersarea radiculelor preplantulelor de *O. basilicum* L. distribuite în plăci Petri (Figura 3) în soluții apoase de colchicină de diferite concentrații (conform Tabelului 1), fiecare placă având un număr de 30 de preplantule în triplicat (3 plăci Petri pentru fiecare variantă experimentală). După 6, respectiv 12 ore, preplantulele au fost clătite și redistribuite în plăci Petri conform distribuției inițiale și păstrate în termostaț la 20°C sau 25°C la un regim de iluminare de 17 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Soluții apoase de colchicină (0,5 – 5 mg/ml)



Preplantule de *O. basilicum*

Figura 3. Schematizarea tratamentului cu soluții apoase de colchicină (0,5 – 5 mg/ml) asupra preplantulelor de *O. basilicum* L. (original)

4. Metoda nr. 4 de tratament a constat în așezarea unor biluțe de vată (cu diametrul de aproximativ 2 mm) pe apexurile caulinare ale plantulelor test cultivate în prealabil în ghivece în sol Compo Sana (turbă și perlit), începând cu ziua 15 de la plantare și îmbibarea lor cu câte 100  $\mu\text{l}$  de soluții apoase de colchicină de diferite concentrații (conform Tabelului 1) pe zi, timp de 3 zile consecutive (Figura 4). Plantulele au fost crescute la un regim de iluminare de 17 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Analizele indicilor morfologici, anatomici, fiziologici și biochimici ai plantulelor tratate au fost efectuate la 93 zile de la plantare (75 de zile de la momentul de aplicare a tratamentului).

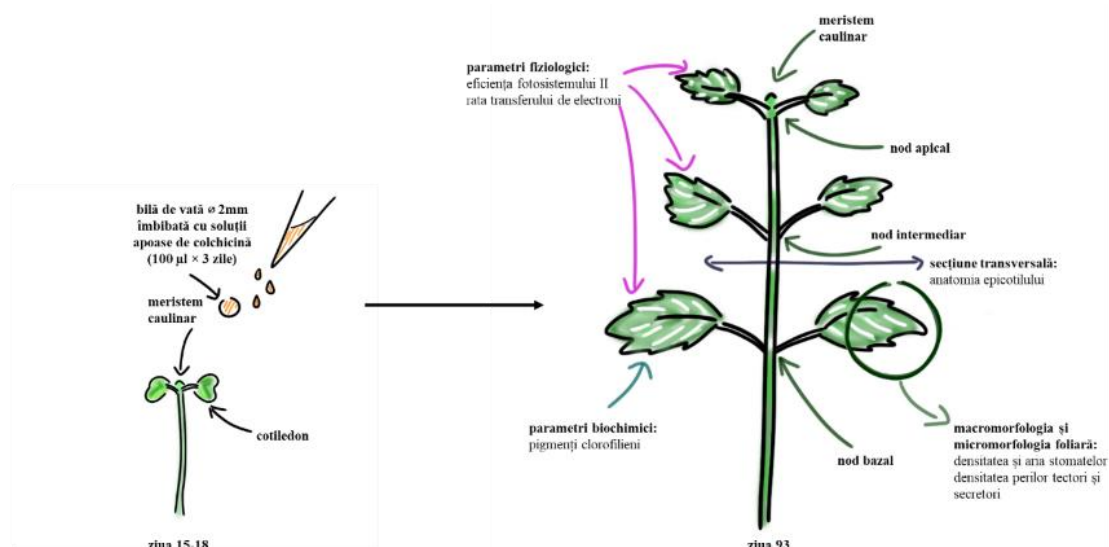


Figura 4. Schematizarea tratamentului cu soluții apoase de colchicină (0,5 – 5 mg/ml) asupra plantulelor de *O. basilicum* L. (original)

Tabel 1. Metodele de tratament cu colchicină aplicate pe diferite organe și țesuturi ale indivizilor de *O. basilicum* L. soiurile 'Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău'

| Metoda de tratament                                         |                  | 1                                                     | 2                     | 3                      | 4                                        |
|-------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------------------|
|                                                             |                  | imbibiție                                             | picurare              | imersare               | imbibiție                                |
| Țesutul sau organul vizat                                   |                  | semințe                                               | apexul caulinar       | apexul radicular       | apexul caulinar                          |
| Nr. de semințe/plantule                                     |                  | 30 x 3                                                | 10 x 3                | 10 x 3                 | 15                                       |
| Nr. total de semințe/plantule                               |                  | 540                                                   | 150                   | 150                    | 90                                       |
| Concentrațiile de colchicină utilizate în tratament (mg/ml) |                  | 0,5; 1; 2; 3; 5                                       |                       |                        |                                          |
| Timp de expunere (ore)                                      |                  | 24                                                    | 6; 12                 | 6; 12                  | 72                                       |
| Volumul de soluție de colchicină utilizat (μl)              |                  | 2000 (per variantă experimentală)                     | 100 (per preplantulă) | 2000 (per placă Petri) | 100 x 3 zile (per bilă de vată/plantulă) |
| Momentul aplicării tratamentului (ziua)                     |                  | 0                                                     | 6                     | 6                      | 18                                       |
| Condiții creștere                                           | Iluminare        | 17 ore/zi;<br>50 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> |                       |                        |                                          |
|                                                             | Temperatură (°C) | 20; 25                                                | 20±2                  |                        |                                          |
| Metoda de referință                                         |                  | Omidbaigi et al., 2010                                |                       |                        |                                          |

*Evaluarea efectelor colchicinei asupra germinației semințelor speciei test (O. basilicum L.)*

Conform metodei de aplicare a tratamentului soluții apoase de colchicină pe semințele de *O. basilicum* L. - soiurile ‘Aromat de Buzău’ și ‘Italiano Classico’, semințele germinate au fost numărate zilnic, la interval de 24 de ore, iar indicii de germinație au fost calculați utilizând formulele prezentate în Tabelul 2.

Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

Tabel 2. Formulele utilizate în calculul indicilor de germinație la semințele soiurilor de *O. basilicum* L., după tratamentul cu soluții apoase de colchicină

| Indice de germinație                       | Formula de calcul                     | Referință                                                                     |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| FGP (Germinația Procentuală Finală)        | $FGP = \frac{n}{N} \times 100$        | Bezini et al., 2019                                                           |
| GI (Indicele de Germinație)                | $GI = \sum(n/d)$                      | Islam și Kato-Noguchi, 2014; Bezini et al., 2019, după Salehzade et al., 2009 |
| SE (Viteza de Emergență)                   | $SE = \frac{n_i \times 100}{n_f}$     | Islam și Kato-Noguchi, 2014, după Islam et al., 2009                          |
| MGT (Timpul Mediu de Germinație)           | $MGT = \frac{\sum(n \times d)}{n_f}$  | Bezini et al., 2019, după Akinci și Akinci, 2010                              |
| MDG (Germinația Medie Zilnică)             | $MDG = \frac{n_f}{D}$                 | Bezini et al., 2019, după Almaghrabi et al., 2014                             |
| GE (Energia Germinativă)                   | $GE = \frac{\%FG}{n_f}$               | Islam și Kato-Noguchi, 2014, după Ruan, Xue și Tylkowska, 2002                |
| SVI (Indicele de Vigoare a Preplantulelor) | $SVI = \frac{L (mm) \times FGP}{100}$ | Islam și Kato-Noguchi, 2014, după Islam, Anuar și Yaakob, 2009                |

Legendă: n = numărul de semințe germinate în ziua x ( $n_i$  = prima germinație;  $n_f$  = ultima germinație sau germinația finală); d = ziua x; N = numărul total de semințe; D = numărul total de zile; %FG = procentajul primei germinații; L (mm) = lungimea preplantulelor la finalul testului de germinație.

*Evaluarea efectelor colchicinei asupra preplantulelor speciei test (O. basilicum L.)*

Preplantulele speciei-test (*O. basilicum* L.) tratate prin picurare și imersare cu soluții apoase de colchicină de diferite concentrații (0,5 – 5 mg/ml) care au supraviețuit

tratamentelor au fost transferate în ghivece cu sol Compo Sana (turbă și perlit) și menținute la un regim de iluminare de 17 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , însă s-a constatat faptul că preplantulele tratate prin picurare au murit la scurt timp după transplantare, la fel ca și în cazul celor tratate prin imersare, dintre care majoritatea au prezentat necroze la nivelul radiculelor și cotiledoanelor.

*Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) tratate pe apexul caulinar*

*Evaluarea la nivel morfologic*

#### *a. Morfologie*

Aspectele de ordin morfologic și diferențele observate între indivizii de *Ocimum basilicum* L. supuși tratamentului au fost înregistrate prin fotografiere cu camera telefonului Xiaomi Mi A1 camera (12 MP, f/2.2, 26mm (wide), 1/2.9", 1.25 $\mu\text{m}$ , PDAF). Fotografiile realizate asupra plantulelor din variantele experimentale de tratament au fost comparate cu fotografiile cu indivizii din varianta control.

#### *b. Micromorfologie*

În vederea observării și fotografierii elementelor de ordin micrometric au fost alese la întâmplare câte 2 frunze inserate la nodul bazal de la câte 3 indivizi diferiți din fiecare variantă experimentală și din acestea au fost selectate fragmente ce s-au introdus cu penseta în tuburi Eppendorf. Materialul vegetal a fost fixat în băi succesive de acetonă. Materialul fixat a fost uscat la punct critic cu  $\text{CO}_2$  și metalizat ulterior cu particule de Au într-un metalizor. În cele din urmă, materialul a fost analizat la microscopul electronic de baleiaj Vega Tescan II SBH din cadrul Facultății de Biologie a Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, prin programul VegaTC Software, realizându-se fotografii pentru ambele suprafețe foliare (adaxială și abaxială).

Imaginile obținute au fost analizate vizual, iar măsurătorile pentru indicii urmăriți: aria stomatală, densitatea stomatelor, a perilor tectori și secretori per  $\text{mm}^2$  de suprafață foliară. Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) la nivel anatomic*

Fragmente proaspete de epicotil recoltate de la câte 3 indivizi din fiecare variantă test au fost selectate și fixate în etanol 70%, în vederea efectuării secțiunilor și examinării acestora la microscopul optic.

Materialul vegetal a fost secționat transversal, folosind microtomul de mână și briciul botanic. Secțiunile au fost apoi colorate prin metoda dublei colorații, cu verde iod și roșu Rutheniu. Secțiunile colorate au fost așezate pe o lamă pe o picătură de glicero-gelatină preîncălzită, peste care a fost așezată lamela și au fost lăsate să se usuce. Secțiunile din epicotile de *O. basilicum* L. au fost observate la microscopul optic Euromex bScope și fotografiate cu camera microscopului și cu camera telefonului Xiaomi Mi A1 (12 MP, f/2.2, 26mm (wide), ½.9”, 1.25μm, PDAF), folosind ocularul 10x al microscopului. Fotografiile realizate asupra secțiunilor prin epicotilele plantulelor din variantele experimentale de tratament au fost comparate cu fotografiile cu secțiunile epicotilelor plantulelor din varianta control.

#### *Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) la nivel fiziologic*

Eficiența fotosistemului II (YPSII) și rata transportului de electroni (ETR) au fost măsurate cu aparatul Hansatech Ltd. PAM Fluorometer ([www.hansatech-instruments.com](http://www.hansatech-instruments.com)) pentru un număr de câte 5 frunze de la 5 indivizi diferiți din fiecare variantă experimentală, la 93 de zile de la plantare (75 de zile de la ultima zi de aplicare a tratamentului), după expunerea plantulelor timp de 30 de minute la întuneric. Datele salvate în memoria aparatului Hansatech Ltd. PAM Fluorometer au fost importate în programul Parview32 și analizate în GraphPad Prism 9.5.1. Din valorile obținute au fost calculate mediile ± erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) la nivel biochimic*

Pentru analize biochimice privind conținutul de pigmenți asimilatori este necesară realizarea de extracte vegetale de frunze, în triplicat, pentru fiecare variantă experimentală de *Ocimum basilicum* L. luată în studiu. Astfel, a fost selectat material

vegetal de la câte 3 indivizi diferiți din fiecare variantă de tratament și cântărit la balanța electronică. După cântărire, materialul a fost mojarat cu nisip de cuarț și dizolvat în etanol 95%, apoi centrifugat.

Pigmenții asimilatori au fost analizați conform metodei lui Sumanta et al. (2014), care presupune măsurarea absorbanțelor soluțiilor de pigmenți clorofilieni la 3 lungimi de undă diferite: 646, 664 și 470 nm la spectrofotometru Shimadzu - UV mini-1240 (www.shimadzu.eu). Cantitatea de clorofilă a (Ch-a), clorofilă b (Ch-b) și pigmenți carotenoizi (Cx+c) a fost cuantificată conform formulelor din articolul de referință, prezentate mai jos:

$$Ch - a = 13,36 \times A_{663} - 5,19 \times A_{646};$$

$$Ch - b = 27,43 \times A_{646} - 8,12 \times A_{663};$$

$$Cx + c = (1000 \times A_{470} - 2,13 \times Ch - a - 97,63 \times Ch - b) / 209;$$

$$Ch - a \text{ (mg/g)} = Ch - a / m.$$

Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Analyze statistic*

Analizele statistice au fost efectuate în GraphPad Prism versiunea 9.5.1, utilizând ANOVA bifactorial (considerând soiul factor calitativ) și testul de comparații post-hoc Dunnett și Tukey pentru indici morfologici: dimensiunea stomatelor, densitatea stomatelor, densitatea perilor tectori și secretori (pe ambele suprafețe foliare ale plantulelor tratate cu soluții apoase de colchicină), biochimici: conținutul de clorofilă a, b și carotenoizi și indici fiziologici: eficiența fotosistemului II și rata de transport al electronilor. Pentru indicii de germinare s-au aplicat ANOVA bifactorial (considerând soiul factor calitativ) și testul Tukey de comparații multiple. Valorile reprezentate în grafice și tabele sunt mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor, iar rezultatele testelor Dunnett și Tukey sunt marcate cu litere diferite.

#### ***Tratarea soiurilor speciei-test cu extracte metanolice de C. autumnale L.***

În scopul determinării potențialului efect alelopativ indus de compuși biologic activi prezenți în organele plantelor de *Colchicum autumnale* L. asupra altor organisme vegetale au fost preparate 2 extracte alcoolice din bulbii și din florile de brândușă de toamnă și au

fost alese 2 soiuri de busuioc - *Ocimum basilicum* L. : *O. basilicum* ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’ ca soiuri test pentru analiza efectelor astfel induse de tratamentele cu extracte.

*Prepararea extractelor metanolice din materialul vegetal colectat (plante ale speciei C. autumnale L.)*

Materialul vegetal constituit din bulbii și florile de *C. autumnale* L. a fost fixat la etuvă la o temperatură de 65°C, apoi uscat la întuneric timp de 7 zile și măcinat într-un grinder electric până la obținerea unei pulberi, utilizată în extracție.

Extracția a fost realizată într-un aparat Soxhlet în metanol absolut, folosind 5 g de pulbere din fiecare organ, după metoda lui Franz și Koehler (1992) (descrisă în Alali et al., 2004). Extracția s-a efectuat până când solventul din camera de extracție a fost limpede (5 - 6 cicluri sau 1 - 1,5 cicluri/oră pentru bulbi și 17-18 cicluri sau 2 - 3 cicluri/oră pentru flori), apoi metanolul a fost evaporat într-un evaporator rotativ (IKA RV3 Eco, Germany) și redizolvat în 50 ml de metanol de concentrație 70% pentru a reduce nivelul de toxicitate a metanolului.

*Dozarea, separarea și cuantificarea conținutului și determinarea activității antioxidante a extractelor din materialul vegetal colectat (plante ale speciei C. autumnale L.)*

Cuantificarea colchicinei din extracte a fost efectuată prin RP-HPLC, conform metodei descrise de Alali et al. (2004).

*Schematizarea tratamentelor cu extracte metanolice din materialul vegetal colectat (plante ale speciei C. autumnale L.)*

Cele două extracte au fost utilizate în tratamente, aplicate ca atare sau diluate cu apă distilată (1:1) pe semințe (metoda 1 de tratament prezentată în Tabelul 1) și pe apexurile caulinare ale plantulelor (metoda 4 de tratament prezentată în Tabelul 1) de *O. basilicum* L. soiurile ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’ cultivate în ghivece. Au fost preparate trei variante control ( $C_0$  = H<sub>2</sub>O distilată,  $C_1$  = MeOH 35%,  $C_2$  = MeOH 70%) în funcție de concentrația de metanol din extracte și diluții.

1. Prima metodă de tratament a constat în aplicarea extractelor pe semințe de *O. basilicum* L. distribuite în vase Petri. Tratamentul s-a aplicat prin îmbibarea hârtiei de filtru cu câte 2 ml extract nediluat sau diluat 1:1 (20 semințe/placă Petri x 3 replicare pentru fiecare variantă de tratament) (Figura 5). Semințele au fost incubate în termostată la o temperatură de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , la un regim de iluminare de 17 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , timp de 14 zile, fiind udate o dată la două zile cu apă distilată.

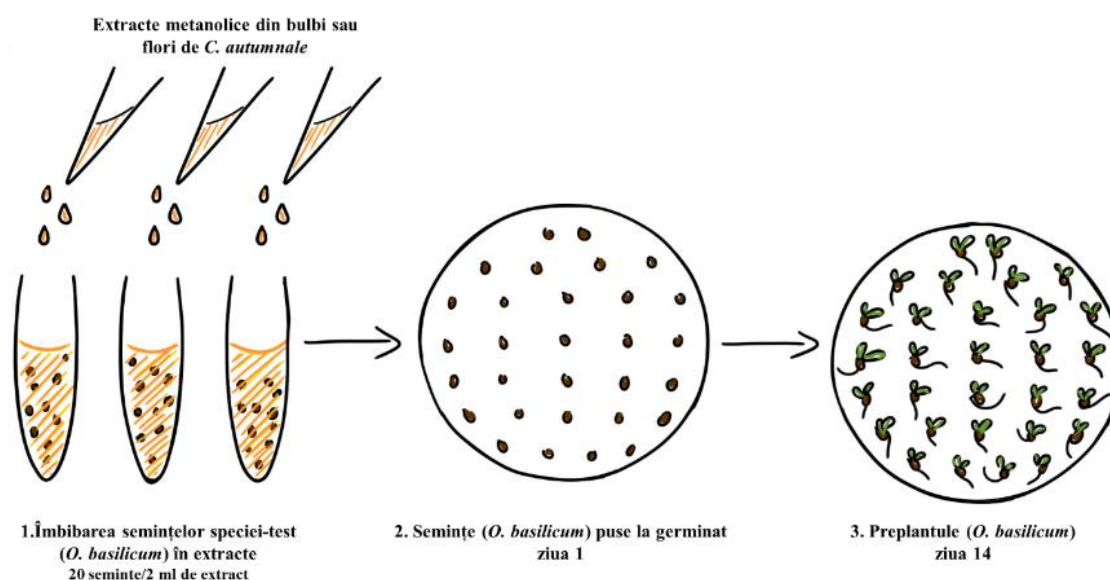


Figura 5. Schematizarea tratamentului cu extracte metanolice din bulbi sau flori de *C. autumnale* L. asupra semințelor de *O. basilicum* L. (original)

2. A doua metodă a fost realizată prin aplicarea tratamentului pe plantule de busuioc în ziua 18 după plantare în ghivece, prin îmbibarea bilelor de vată aplicate pe apexurile caulinare cu 100  $\mu\text{l}$  de extract pe zi, timp de trei zile consecutive (Figura 6). Plantulele au fost păstrate în ghivece cu pământ Compo Sana (turbă + perlit) la  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  și menținute la un regim de iluminare de 17 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  și au fost udate o dată la trei zile cu apă distilată. Experimentul a durat 93 de zile (75 de zile de monitorizare a dezvoltării plantulelor), iar plantulele tratate au fost analizate la sfârșitul experimentului.

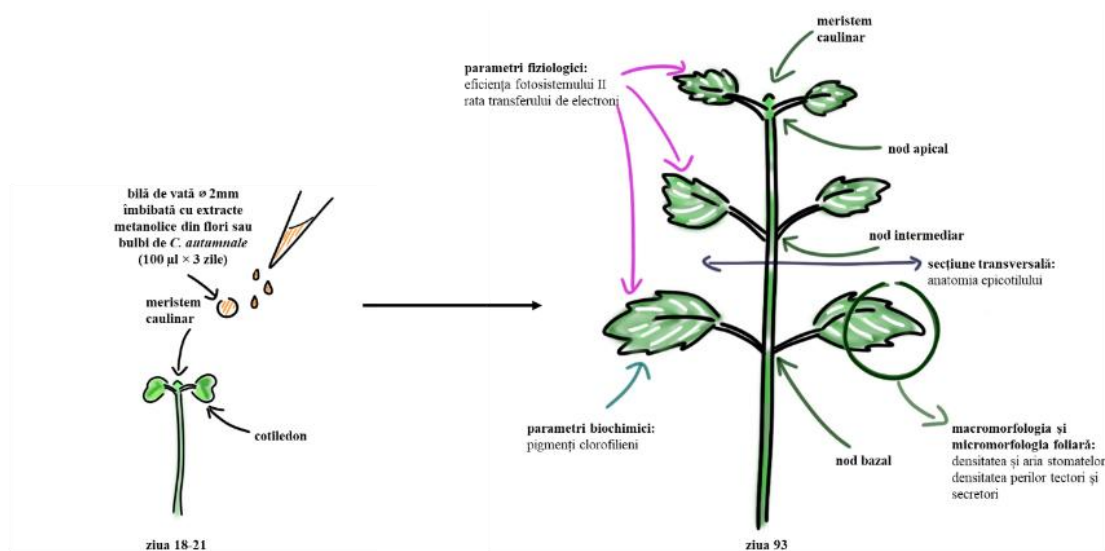


Figura 6. Schematizarea tratamentului cu extracte metanolice din bulbi sau flori de *C. autumnale* L. asupra plantulelor de *O. basilicum* L. tratate pe apexurile caulinare (original)

### *Evaluarea efectelor extractelor metanolice din materialul vegetal colectat (plante ale speciei C. autumnale L.) asupra germinației semințelor speciei test (O. basilicum L.)*

Conform metodei de aplicare a tratamentului soluții apoase de colchicină pe semințele de *O. basilicum* L. - soiurile ‘Aromat de Buzău’ și ‘Italiano Classico’, semințele germinate au fost numărate zilnic, la interval de 24 de ore.

Indicele de germinație procentuală finală (FGP) a fost calculat conform formulei prezentate de Bezini et al. (2019):  $FGP = n/N \times 100$ , în care n reprezintă numărul de semințe germinate la sfârșitul testului și N este numărul total de semințe utilizat pentru fiecare variantă experimentală.

### *Evaluarea efectelor extractelor metanolice din materialul vegetal colectat (plante ale speciei C. autumnale L.) asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) tratate pe apexul caulinar*

### *Evaluarea efectelor extractelor asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) la nivel morfologic*

#### *a. Morfologie*

Aspectele de ordin morfologic și diferențele observate între indivizii de *Ocimum basilicum* L. supuși tratamentului au fost înregistrate prin fotografiere cu camera telefonului Xiaomi Mi A1 camera (12 MP, f/2.2, 26mm (wide), 1/2.9", 1.25µm, PDAF). Fotografiile

realizate asupra plantulelor din variantele experimentale de tratament au fost comparate cu fotografiile cu indivizii din varianta control.

#### *b. Micromorfologie*

În vederea observării și fotografierii elementelor de ordin micrometric a fost utilizată metoda descrisă în subcapitolul 3.1.1.4. Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) tratate pe apexul caular - 3.1.1.4.1. Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel morfologic - b. Micromorfologie.

Imaginile obținute au fost analizate vizual, iar măsurătorile pentru indicii urmăriți: aria stomatală, densitatea stomatelor, a perilor tectori și secretori per mm<sup>2</sup> de suprafață foliară. Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Evaluarea efectelor extractelor asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) la nivel anatomic*

Secțiunile prin epicotilele plantulelor de *O. basilicum* L. tratate cu extracte metanolice din bulbi sau flori de *C. autumnale* L. pe apexul caular au fost realizate conform metodei descrise în subcapitolul: Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel anatomic.

Secțiunile din epicotile de *O. basilicum* L. tratate cu extracte de *C. autumnale* L. au fost observate la microscopul optic Euromex bScope și fotografiate cu camera microscopului și cu camera telefonului Xiaomi Mi A1 (12 MP, f/2.2, 26mm (wide), 1/2.9", 1.25μm, PDAF). Fotografiile realizate asupra secțiunilor prin epicotilele plantulelor din variantele experimentale de tratament au fost comparate cu fotografiile cu secțiunile epicotilelor plantulelor din varianta control.

#### *Evaluarea efectelor extractelor asupra plantulelor speciei test (O. basilicum L.) la nivel fiziologic*

Eficiența fotosistemului II (YPSII) și rata transportului de electroni (ETR) au fost măsurate cu aparatul Hansatech Ltd. PAM Fluorometer ([www.hansatech-instruments.com](http://www.hansatech-instruments.com)) conform metodei descrise în subcapitolul: Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel fiziologic.

Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel biochimic*

Conținutul de pigmenți asimilatori a fost determinat conform metodei lui Sumanta et al. (2014), descrisă în subcapitolul: Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel biochimic.

Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Analyze statistice*

Analizele statistice au fost efectuate în GraphPad Prism versiunea 9.5.1, utilizând ANOVA bifactorial (considerând soiul factor calitativ) și testul Tukey de comparații multiple pentru indicii de germinație ai semințelor și indicii morfologici (dimensiunea stomatelor, densitatea stomatelor, densitatea perilor tectori și secretori pe ambele suprafețe foliare), biochimici (conținutul de clorofilă a, b și carotenoizi) și fiziologici (eficiența fotosistemului II și rata de transport al electronilor) ai plantulelor de *O. basilicum* L. tratate cu extracte metanolice din bulbi sau flori de *C. autumnale* L. Valorile reprezentate în grafice și tabele sunt mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor, iar rezultatele testului Tukey al comparațiilor multiple sunt marcate cu litere diferite.

## 2. Cercetări ulterioare

*Prepararea extractelor alcoolice și apoase din materialul vegetal colectat (plante ale speciei C. autumnale L.*

Pentru prepararea extractelor vegetale a fost utilizat material vegetal (organe vegetative și de reproducere) recoltat de la plante de *C. autumnale* L. dintr-o pajiște din zona Voroneț, jud. Suceava, în trei faze ale ciclului ontogenetic: bulbi, frunze și fructe în faza de creștere sau vegetativă ce corespunde perioadei de primăvară, frunze și fructe în faza de fructificare în timpul verii, și bulbi și flori în faza de înflorire ce corespunde perioadei de toamnă (Figura 7). Pentru fiecare perioadă în care a fost colectat materialul vegetal utilizat în obținerea extractelor, a fost depus un individ de *C. autumnale* L. ca voucher la Herbarul Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași. Materialul vegetal colectat a fost fixat la etuvă la 65°C timp de 12 ore pentru a opri reacțiile enzimaticе, apoi a fost uscat la întuneric, la temperatura camerei (23±2°C), timp de 7 zile, după care a fost măcinat până la obținerea unei pulberi fine.

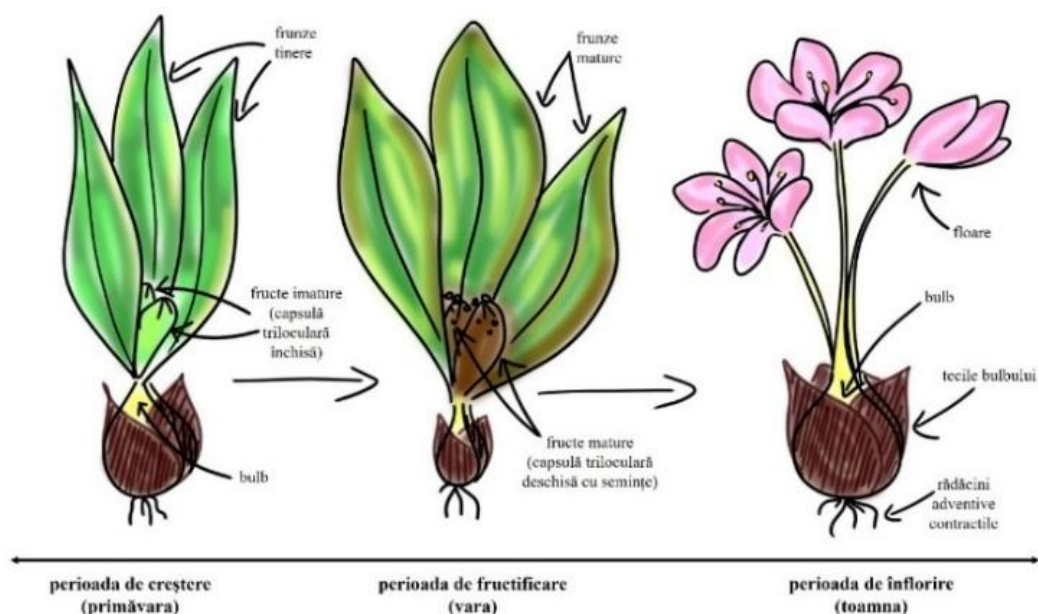


Figura 7. Reprezentarea schematică a ciclului ontogenetic al plantelor speciei *C. autumnale* L. (original)

*Prepararea extractelor alcoolice și apoase din organe de C. autumnale L.*

Extracetele alcoolice au fost preparate cu un aparat Soxhlet, prin extragerea a câte 5g material vegetal din fiecare organ colectat în metanol absolut (metodă adaptată după

Rocchetti et al., 2019). Solventul a fost apoi evaporat la sec, prin utilizarea unui rotaevaporator, iar extractul uscat obținut a fost redizolvat în etanol de concentrație 70%.

Extracțele apoase au fost preparate prin infuzia a câte 5g de material vegetal din fiecare organ colectat în apă distilată timp de 24 de ore la temperatura de 25°C, după care au fost filtrate prin hârtie de filtru. Solventul a fost apoi evaporat la sec prin utilizarea unui liofilizator și fiecare extract uscat obținut a fost redizolvat în 50 ml de apă distilată.

În final, au fost obținute 8 extracțe alcoolice și 8 extracțe apoase apoase, ce corespund organelor de *C. autumnale* L. din care s-a realizat extracția.

#### *Dozarea, separarea și cuantificarea conținutului și determinarea activității antioxidante a extracțelor din materialul vegetal colectat (plante ale speciei C. autumnale L.)*

Determinarea compușilor și cuantificarea concentrației acestora în extracțele de *C. autumnale* L. a fost realizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță în fază inversă (RP-HPLC) conform metodei utilizate de Alali et al. (2004). Cuantificarea concentrației colchicinei, colchiceinei, demecolcinei și apigeninei în extracțele alcoolice și apoase de *C. autumnale* L. s-a realizat în funcție de aria vârfurilor detectate, și a fost calculată conform curbelor etalon.

Determinarea conținutului de polifenoli totali și de flavonoide și activitatea antioxidantă a extracțelor alcoolice și apoase preparate din organe de *C. autumnale* L. s-a realizat prin utilizarea metodelor de lucru conform Herald et al. (2012).

#### *Materialul vegetal test (O. basilicum L.)*

Semințele de *Ocimum basilicum* L. soiurile ‘Italiano Classico’ (nr. lot 0318-00) și ‘Aromat de Buzău’ (nr. lot 9BZ1321-9BZ01/0BZ01A) au fost procurate din surse comerciale (Unisem S.A. Iași, respectiv, S.C.D.L. Buzău), iar 100 de semințe din fiecare lot au fost depuse la Herbarul Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași.

### *Teste genetice și fiziologice asupra soiurilor speciei-test (O. basilicum L.)*

În vederea anticipării unor eventuale diferențe a răspunsurilor preplantulelor și plantulelor-test ce aparțin unor soiuri diferite la tratamentele cu extracte de *C. autumnale* L. au fost efectuate analize asupra numărului de cromozomi ai plantelor de *O. basilicum* L. soiul ‘Italiano Classico’, respectiv ‘Aromat de Buzău’ prin testarea a 2 soluții de tratament: colchicină de concentrație 0,2% (conform metodei utilizate de Căpraru și Băra, 2007) și 8-hidroxicchinolină 0,002 M (conform metodei utilizate de Truță și Zamfirache, 2013), cu diferiți timpi de expunere. Preparatele au fost realizate prin metoda Squash și spălate prin băi succesive de etanol și xilen, și fixate cu balsam de Canada. Preparatele permanente finale au fost observate la microscopul optic Nikon Eclipse E600 și fotografiate cu camera Nikon E950, la obiectivul 100x, utilizând ulei de imersie.

Pentru a determina nivelul de toxicitate al etanolului (utilizat în prepararea extractelor alcoolice de *C. autumnale* L.) asupra germinației semințelor de busuioc a fost efectuat un test de viabilitate, conform metodei descrise de Boldor, Raianu și Trifu (1983).

Pentru a determina cantitatea de extract îmbibat în semințe a fost realizat un test de imbibiție prin metoda gravimetrică.

### *Schematizarea tratamentelor cu extracte alcoolice și apoase din organe vegetative și de reproducere ale plantelor speciei C. autumnale L.*

Aplicarea tratamentului cu extracte din organe de *C. autumnale* L. asupra plantelor test a fost realizată prin două metode proiectate conform literaturii de specialitate, ce prezintă metode de tratament cu colchicină asupra unor specii de plante în diferite stadii de dezvoltare (Omidbaigi et al., 2010; Manzoor et al., 2019; Iannicelli et al., 2020).

Semințele și plantulele test utilizate în acest studiu sunt reprezentate de două soiuri ale speciei *Ocimum basilicum* L.: ‘Aromat de Buzău’ și ‘Italiano Classico’.

1a. Prima metodă de aplicare a tratamentului cu extracte alcoolice a constat în prepararea a câte 3 diluții pentru fiecare extract în parte (1:1, 1:2, 1:3) cu apă distilată. Un număr de 90 de semințe per variantă de tratament au fost ținute la îmbibat în extractele diluate timp de 30 de minute, după care au fost distribuite în plăci Petri (Figura 8).

1b. Metoda de aplicare a tratamentului cu extracte apoase a constat în tratarea semințelor de *O. basilicum* L. cu extracte nediluate și diluate (1:1 și 1:2) cu apă distilată.

Câte 90 de semințe per variantă de tratament cu extract au fost ținute la îmbibat în extractele nediluate sau diluate timp de 24 de ore, după care au fost distribuite în plăci Petri (Figura 8).

După aplicarea tratamentului, semințele au fost puse la germinat timp de 14 zile, fiind menținute la 25°C la un regim de iluminare de 18 ore pe zi, cu intensitatea luminoasă de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Semințele germinate au fost numărate zilnic, la interval de 24 de ore, la final fiind calculați indicii de germinație, iar preplantulele rezultate au fost măsurate, pentru a le determina indicele de vigoare (SVI).

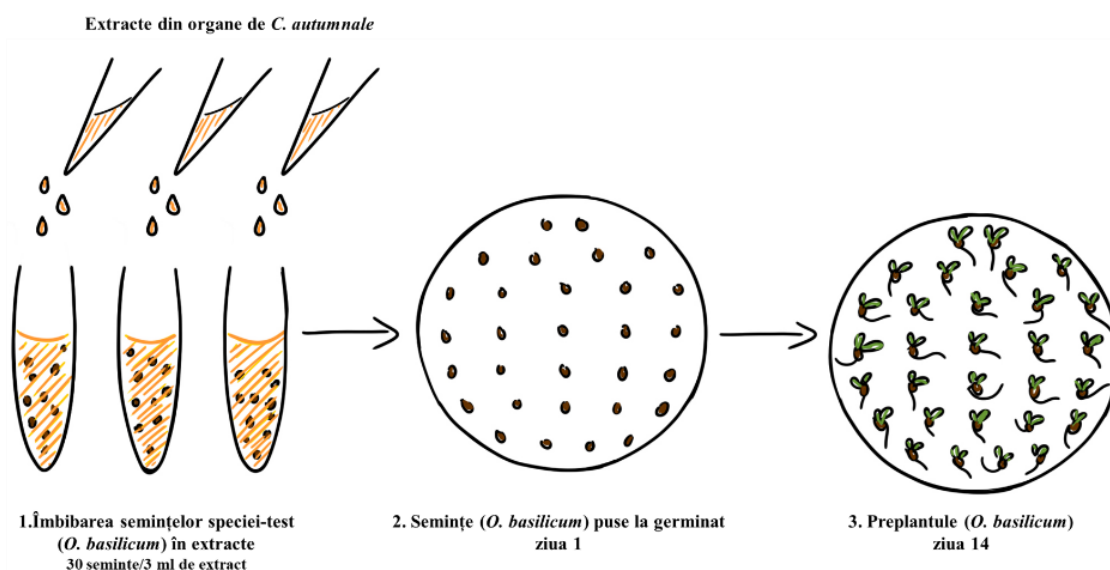


Figura 8. Schema de tratament cu extracte alcoolice și apoase din organe de *C. autumnale* L. asupra semințelor de *O. basilicum* L. (soiurile ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’) (original)

2. A doua metodă de tratament a constat în așezarea unor biluțe de vată (cu diametrul de aproximativ 2 mm) pe apexurile caulinare ale plantulelor test cultivate în prealabil în ghivece, începând cu ziua 15 de la plantare și îmbibarea lor cu câte 100  $\mu\text{l}$  de extract (alcoolic sau apos) pe zi, timp de 3 zile consecutive (Figura 9). Analizele indicilor morfologici și anatomici ai plantulelor tratate au fost efectuate la 90 zile de la plantare (72 de zile de la momentul de aplicare a tratamentului), cu excepția înălțimii epicotilului, care a fost măsurată la 60, 75 și 90 de zile de la plantare (42, 57 și 72 de zile de la tratament). Analizele biochimice și fiziologice au fost efectuate la 75 de zile de la plantare (57 de zile de la momentul de aplicare a tratamentului).

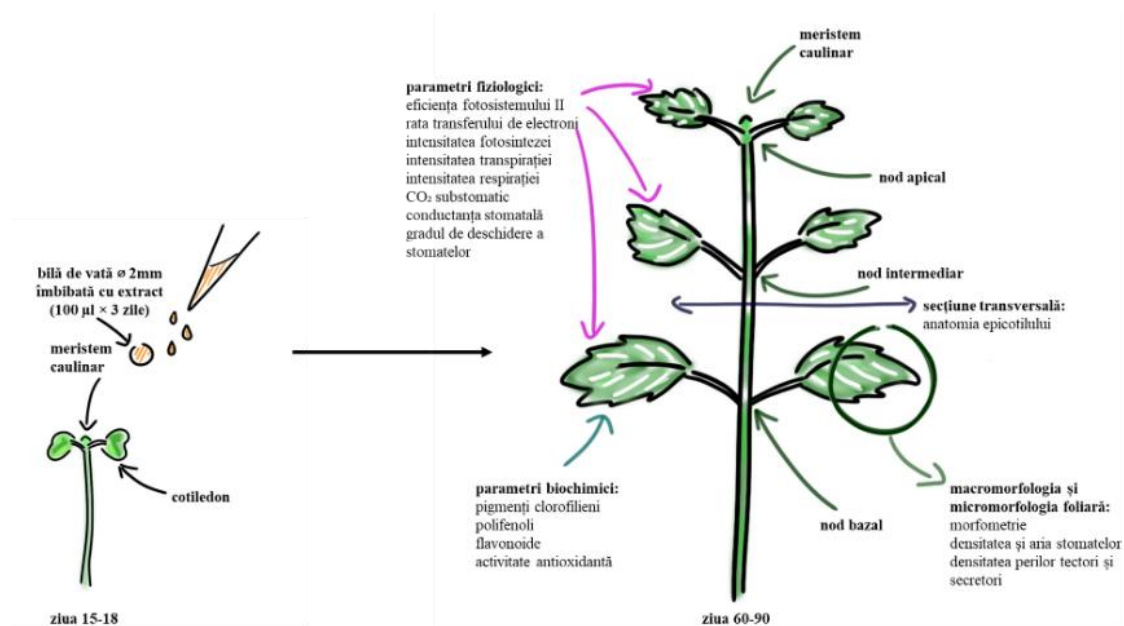


Figura 9. Schema de tratament cu extracte alcoolice și apoase din organe de *C. autumnale* L. asupra apexurilor caulinare ale plantulelor de *O. basilicum* L. (soiurile 'Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău') (original)

#### *Evaluarea efectelor induse de tratamente în semințele test (O. basilicum L.)*

Conform metodei de aplicare a tratamentului cu extracte de *C. autumnale* L. pe semințele plantelor rest de *O. basilicum* L. - soiurile 'Aromat de Buzău' și 'Italiano Classico', semințele germinate au fost numărate zilnic, la interval de 24 de ore, iar indicii de germinație au fost calculați utilizând formulele prezentate în Tabelul 3.2. Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Evaluarea efectelor induse de tratamente în plantulele test (O. basilicum L.)*

De-a lungul studiilor efectuate pe plantulele de busuioc, a apărut contaminarea cu dăunători din cauza solului utilizat în cultivarea acestor plantule. S-a încercat pe cât posibil selectarea și utilizarea plantulelor aparent sănătoase în analizele la nivel morfologic, anatomic, fiziologic și biochimic, dar și aceste plantule, după observațiile morfologiei frunzelor și anatomiei epicotilului la microscopul electronic, respectiv, microscopul optic, s-au dovedit a fi afectate de dăunători. Dăunătorii ce au afectat plantulele de *O. basilicum* L. au fost identificați ca specii de tripsi (Tizanoptere) și de fungi (Ascomycetae).

*Evaluarea efectelor induse de extractele de C. autumnale L. în plantulele test de O. basilicum L. tratate pe apexul caular la nivel morfologic*

#### *a. Morfologie*

Aspectele de ordin morfologic și diferențele observate între indivizii de *Ocimum basilicum* L. supuși tratamentului au fost înregistrate prin fotografiere cu camera telefonului Motorola One Zoom (48 MP, f/1.7, 1/2.0", 0.8μm, PDAF, OIS).

Lungimea epicotilelor tuturor plantulelor a fost măsurată în 3 stadii de dezvoltare al plantulelor de *O. basilicum* L. (momentul 0 - momentul aplicării tratamentului, momentul 1 - 42 zile zile de la aplicarea tratamentului, momentul 2 - 57 zile zile de la aplicarea tratamentului, momentul 3 - 72 zile de la aplicarea tratamentului) cu o riglă gradată. Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

Suprafața foliară a fost măsurată pe fotografii cu ajutorul programului ImageJ pe frunzele plantulelor de *O. basilicum* L., la 90 de zile de plantare (72 zile de la ultima zi de aplicare a tratamentului) pentru frunzele de la fiecare etaj foliar (inferior, mediu sau intermediar, superior sau apical) măsurând aria suprafeței foliare pentru câte 5 frunze din fiecare etaj foliar (de la 5 plantule din fiecare variantă experimentală). Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *b. Micromorfologie*

În vederea observării și fotografierii elementelor de ordin micrometric a fost aplicată metoda descrisă în subcapitolul Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) tratate pe apexul caular - Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel morfologic - b. Micromorfologie.

Materialul a fost analizat la microscopul electronic de baleiaj Vega Tescan II SBH din cadrul Facultății de Biologie a Universității “Alexandru Ioan Cuza” din Iași, prin programul VegaTC Software, realizându-se fotografii pentru ambele suprafețe foliare (adaxială și abaxială).

Imaginile obținute au fost analizate vizual, iar măsurătorile pentru indicii urmăriți: aria stomatală, densitatea stomatelor, a perilor tectori și secretori per mm<sup>2</sup> de suprafață foliară, precum și gradul de deschidere a stomatelor (suma ariilor ostiolelor pe mm<sup>2</sup> de suprafață foliară), s-au realizat utilizând programul ImageJ; valorile obținute pentru ultimul indice morfologic analizat (gradul de deschidere al stomatelor) au fost corelate cu valorile indicilor fiziologici corespunzători determinați: intensitatea proceselor de fotosinteză, transpirație, respirație, conținutul de CO<sub>2</sub> substomatic și conductanța stomatală. Din valorile obținute au fost calculate mediile ± erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

*Evaluarea efectelor induse de extractele de C. autumnale L. în plantulele test de O. basilicum L. tratate pe apexul caular la nivel anatomic*

Secțiunile prin epicotilele plantulelor de *O. basilicum* L. tratate cu extracte alcoolice și apoase din organe vegetative și de reproducere ale plantelor speciei *C. autumnale* L. pe apexul caular au fost realizate conform metodei descrise în subcapitolul Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel anatomic.

Secțiunile colorate au fost așezate pe o lamă pe o picătură de glicero-gelatină preîncălzită, peste care a fost așezată lamela și au fost lăsate să se usuce.

Secțiunile din epicotile de *O. basilicum* L. tratate cu extracte apoase și alcoolice din organe vegetative și de reproducere ale plantelor speciei *C. autumnale* L. au fost observate la microscopul optic Euromex bScope și fotografiate cu camera microscopului și cu camera telefonului Motorola One Zoom (48 MP, f/1.7, 1/2.0", 0.8μm, PDAF, OIS), folosind ocularele 5x, 10x, 20x și 40x ale microscopului.

*Evaluarea efectelor induse de extractele de C. autumnale L. în plantulele test de O. basilicum L. tratate pe apexul caular la nivel fiziologic*

În urma aplicării tratamentului asupra apexurilor caulinare ale plantulelor de busuioc a fost determinat gradul de deschidere a stomatelor pentru fiecare suprafață foliară analizată prin calcularea suprafeței totale a ostiolelor deschise de pe 1 mm<sup>2</sup>, concomitent cu determinarea procentajului de stomate deschise în câmpul analizat, pe fotografiile

materialului vegetal obținute la microscopul electronic de baleiaj. Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

De asemenea, au fost analizați următorii indici fiziologici: intensitatea proceselor de fotosinteză, respirație și transpirație, conductanța stomatală și cantitatea de CO<sub>2</sub> substomatic cu aparatul ADC Bioscientific LCi – compact portable photosynthesis unit ([www.adc.co.uk](http://www.adc.co.uk)). Pentru determinarea intensității procesului de respirație a fost modificată metoda standard de determinare a intensității fotosintezei cu aparatul ADC Bioscientific LCi prin acoperirea camereri de lucru, pe parcursul realizării măsurătorilor, cu un material închis la culoare, care împiedică pătrunderea luminii la suprafața frunzelor.

Eficiența fotosistemului II (YPSII) și rata transportului de electroni (ETR) au fost măsurate cu aparatul Hansatech Ltd. PAM Fluorometer ([www.hansatech-instruments.com](http://www.hansatech-instruments.com)), conform metodei detaliate în subcapitolul Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel fiziologic.

Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

#### *Evaluarea efectelor induse de extractele de C. autumnale L. în plantulele test de O. basilicum L. tratate pe apexul caular la nivel biochimic*

Analizele la nivel biochimic au fost efectuate la 75 de zile de la plantare (57 zile de la tratament), pentru a identifica eventuale variații ale conținutului de pigmenți asimilatori, polifenoli, flavonoide și ale activității antioxidante a plantulelor de *Ocimum basilicum* L. induse de tratamentele cu extracte alcoolice și apoase de *Colchicum autumnale* L.

#### *Conținutul de pigmenți asimilatori*

Conținutul de pigmenți asimilatori a fost determinat conform metodei lui Sumanta et al. (2014), descrisă în subcapitolul Evaluarea efectelor colchicinei asupra plantulelor speciei test (*O. basilicum* L.) la nivel biochimic. Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

### *Conținutul de polifenoli*

Pentru determinarea conținutului de polifenoli totali a fost utilizată metoda de lucru conform Herald et al. (2012), după metoda descrisă de Singleton și Rossi (1965), cu adaptări, descrisă în subcapitolul Dozarea, separarea și cuantificarea conținutului și determinarea activității antioxidante a extractelor din materialul vegetal colectat (plante ale speciei *C. autumnale* L.). Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

### *Conținutul de flavonoide*

Conținutul de flavonoide a fost determinat prin metoda colorimetrică pe bază de clorură de aluminiu utilizată de Herald et al., 2012, cf. Zhishen, Mengcheng și Jianming (1999), cu adaptări, detaliată în subcapitolul Dozarea, separarea și cuantificarea conținutului și determinarea activității antioxidante a extractelor din materialul vegetal colectat (plante ale speciei *C. autumnale* L.). Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

### *Activitatea antioxidantă*

Activitatea antioxidantă a extractelor din frunzele plantulelor de *O. basilicum* L. după tratamentul cu extracte de *C. autumnale* L. a fost determinată prin metoda utilizată de Herald et al. (2012), după Thaipong et al. (2006) și Brand-Williams, Cuvelier și Berset (1995), cu adaptări, detaliată în subcapitolul Dozarea, separarea și cuantificarea conținutului și determinarea activității antioxidante a extractelor din materialul vegetal colectat (plante ale speciei *C. autumnale* L.). Din valorile obținute au fost calculate mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor pentru fiecare variantă experimentală.

### *Analize statistice*

Pentru interpretarea rezultatelor obținute din analiza indicilor de germinație, a indicilor fiziologici și biochimici a fost aplicat testul statistic ANOVA bifactorial (considerând soiul factor calitativ), testul Tukey pentru comparații multiple (post-hoc) și coeficientul de corelație Pearson în programul GraphPad Prism 9.5.1.

Valorile prezentate în grafice și tabele reprezintă mediile  $\pm$  erorile standard ale mediilor. Diferențele semnificative au fost marcate în grafice și tabele cu litere diferite (pentru  $p < 0,05$ ). Acolo unde nu există marcaje (cu litere), diferențele între rezultate nu au fost semnificative din punct de vedere statistic.

Coeficientul de corelație Pearson a fost determinat pentru compararea rezultatelor analizelor biochimice ale extractelor (comparând extractele alcoolice cu cele apoase), compararea răspunsurilor celor două soiuri de busuioc la tratamente (răspunsurile plantelor din soiuri diferite tratate cu același extract) și prin compararea efectelor extractelor alcoolice cu efectele extractelor apoase asupra fiecărui soi de busuioc studiat (au fost comparați indicii de germinație ai preplantulelor de busuioc din cele 2 soiuri studiate la tratamentul cu același extract alcoolic sau apos), cu excepția indicilor de germinație pentru că extractele utilizate în tratamentele asupra semințelor au avut diluții diferite.

## Rezultate și discuții

### 1. Rezultate preliminare

Studiile preliminare s-au concentrat pe monitorizarea efectelor colchicinei, compusul alelopativ principal extras din plantele speciei *Colchicum autumnale* L., utilizând diferite metode de tratament cu colchicină asupra semințelor, preplantulelor și plantulelor a două soiuri de *Ocimum basilicum* L.: ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’, pentru a determina și compara efectele biologice induse asupra plantelor test. În studiilor preliminare au fost testate diferite metode de tratament cu o gamă predeterminată de concentrații de 0,5 - 5 mg/ml colchicină sub formă de soluții apoase și determinate efectele biologice induse în plantele supuse tratamentelor, pentru a înțelege mai bine influența colchicinei asupra celulelor plantelor *in vivo* (Moroșan et al., 2023).

Metodele de tratament care au fost aplicate cu succes au fost cele asupra semințelor, prin imbițiție în soluții apoase de colchicină și cele aplicate pe apexurile caulinare ale plantulelor, pe când tratamentele aplicate prin picurare și prin imersie a preplantulelor în soluțiile de colchicină au rezultat în necroza țesuturilor sau moartea preplantulelor. Rezultatele arată că tratamentul cu colchicină nu afectează semnificativ parametrii de germinație a semințelor, cu excepția indicelui de vigoare, inhibând creșterea preplantulelor (Figura 10).

De asemenea, tratamentul cu colchicină aplicat pe apexurile caulinare ale plantulelor de busuioc nu afectează semnificativ eficiența fotosintetică și conținutul de pigmenți asimilatori, însă exercită un impact semnificativ asupra unor indici morfo-anatomici, concretizați prin devierea nervurilor și a marginilor limbului foliar (Figura 11), apariția celulelor heteromorfe și lignificarea slabă a xilemului în structura epicotilului (Figura 12), apariția unor stomate și celule epidermice heteromorfe și alungirea perilor tectori pe suprafețele foliare examinate, observații ce pot fi interpretate ca posibile consecințe ale stresului chimic indus de tratamentul cu colchicină.

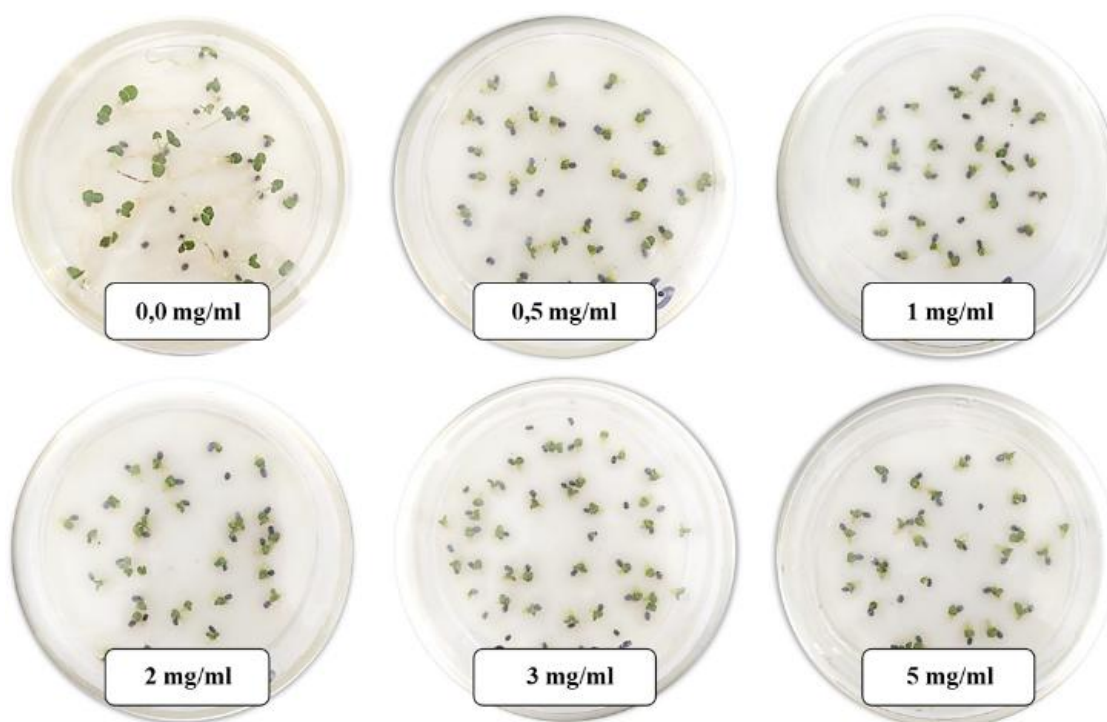


Figura 10. Aspectul preplantulelor de *Ocimum basilicum* L. la 14 zile după tratamentul cu diferite concentrații de colchicină

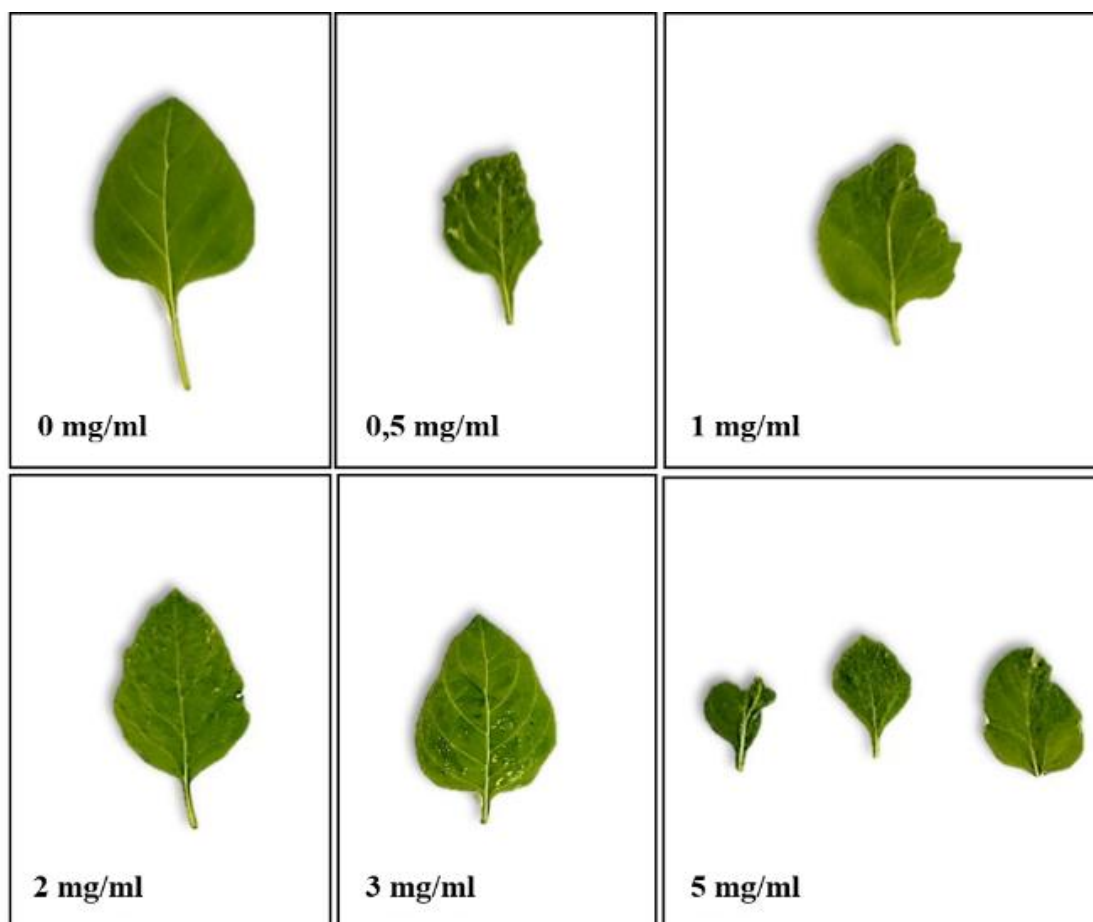


Figura 11. Variații ale morfologiei foliare la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu colchicină pe apexul caular

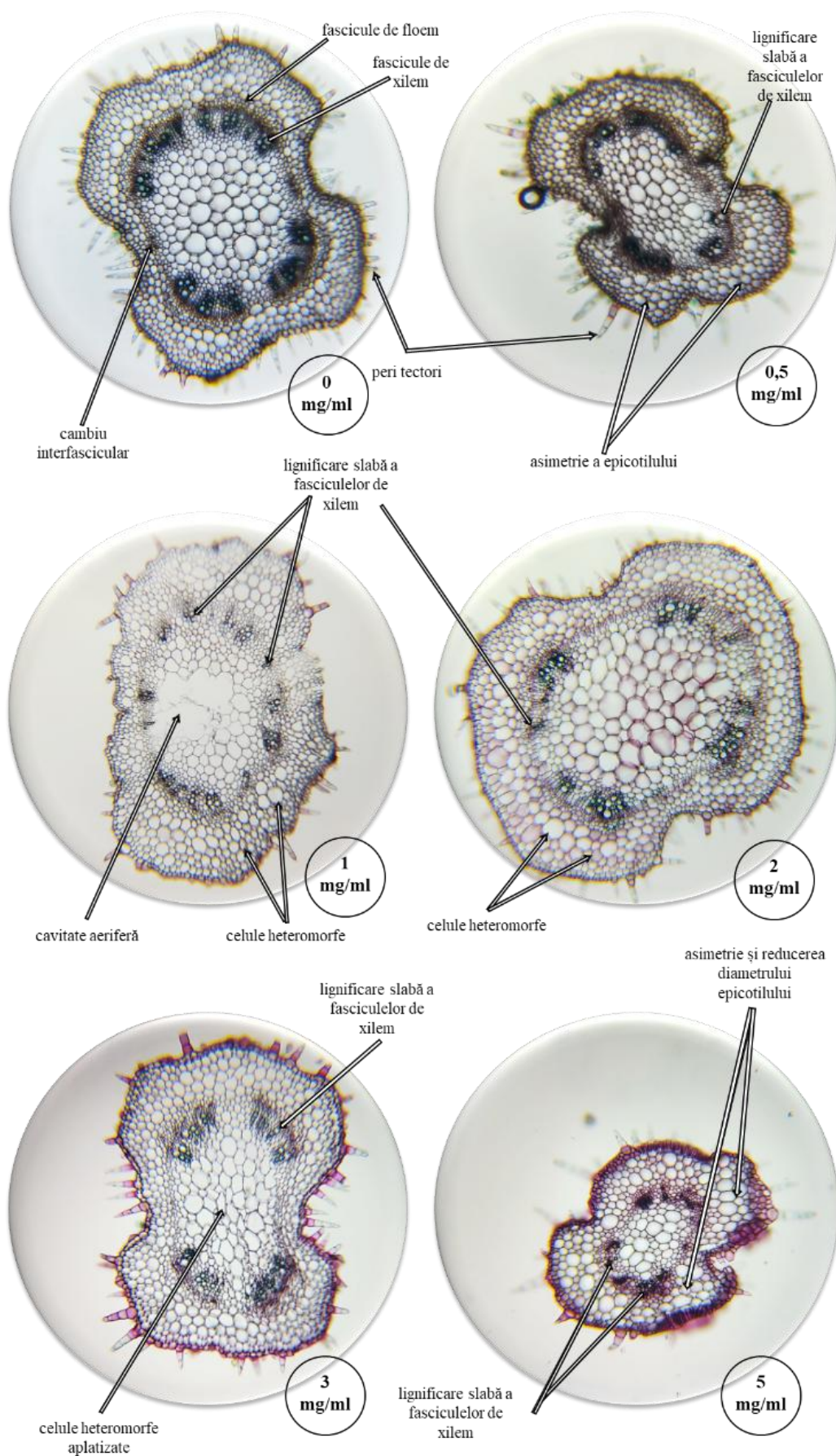


Figura 12. Secțiuni transversale prin epicotilele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu colchicină pe apexul caular

În scopul determinării potențialului efect alelopativ indus de compuși biologic activi prezenți în organele plantelor de *Colchicum autumnale* L. asupra plantelor test au fost preparate 2 extracte metanolice din bulbii și din florile de brândușă de toamnă și au fost utilizate ca plante test aceleași soiuri de busuioc ca în experimentul anterior în care au fost utilizate soluții apoase de colchicină. Cuantificarea colchicinei din extracte a fost efectuată prin HPLC, conform metodei lui Alali et al. (2004), utilizată și în studiile ulterioare.

Rezultatele studiului preliminar cu privire la efectele alelopatice ale extractelor metanolice din bulbi și din flori de *C. autumnale* L. (Moroșan et al., 2022) au indicat faptul că ambele extracte nediuatate testate inhibă complet germinația semințelor de busuioc din ambele soiuri, efect ce poate fi atribuit toxicității metanolului utilizat ca solvent în extracție. Pe de altă parte, extractul diluat din flori inhibă parțial germinația semințelor, în timp ce extractul diluat din bulbi de *C. autumnale* L. o inhibă complet (Tabel 3).

Tabel 3. Germinația procentuală finală a semințelor de *O. basilicum* L. tratate cu extracte alcoolice de *C. autumnale* L. (EB 1:1 = extract din bulbi diluat (1:1); EB = extract din bulbi nediluat; EF 1:1 - extract din flori diluat (1:1); EF- extract din flori nediluat, diferențele semnificative statistic sunt marcate cu litere diferite)

|                                       | <b>‘Italiano Classico’</b> | <b>‘Aromat de Buzău’</b> |
|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>C<sub>0</sub> (H<sub>2</sub>O)</b> | 80±1,92 <sup>a</sup>       | 68.89±7,78 <sup>b</sup>  |
| <b>C<sub>1</sub> (MeOH 35%)</b>       | 70±11,55 <sup>b</sup>      | 23,33±4,41 <sup>c</sup>  |
| <b>1:1 EB</b>                         | 0±0 <sup>d</sup>           | 0±0 <sup>d</sup>         |
| <b>1:1 EF</b>                         | 40±18,93 <sup>c</sup>      | 33,33±6,01 <sup>c</sup>  |
| <b>C<sub>2</sub> (MeOH 70%)</b>       | 0±0 <sup>d</sup>           | 0±0 <sup>d</sup>         |
| <b>EB</b>                             | 0±0 <sup>d</sup>           | 0±0 <sup>d</sup>         |
| <b>EF</b>                             | 0±0 <sup>d</sup>           | 0±0 <sup>d</sup>         |

În ceea ce privește răspunsurile plantulelor de *O. basilicum* L. tratate pe apexul caulinar cu aceste extracte, observațiile au arătat că tratamentele nu afectează semnificativ procesele fiziologice ale plantulelor și nici conținutul de pigmenți asimilatori, însă induc devierea nervurilor și anomalii ale formei foliare (Figura 13), ca și în cazul tratamentelor cu soluții apoase cu diferite concentrații de colchicină.

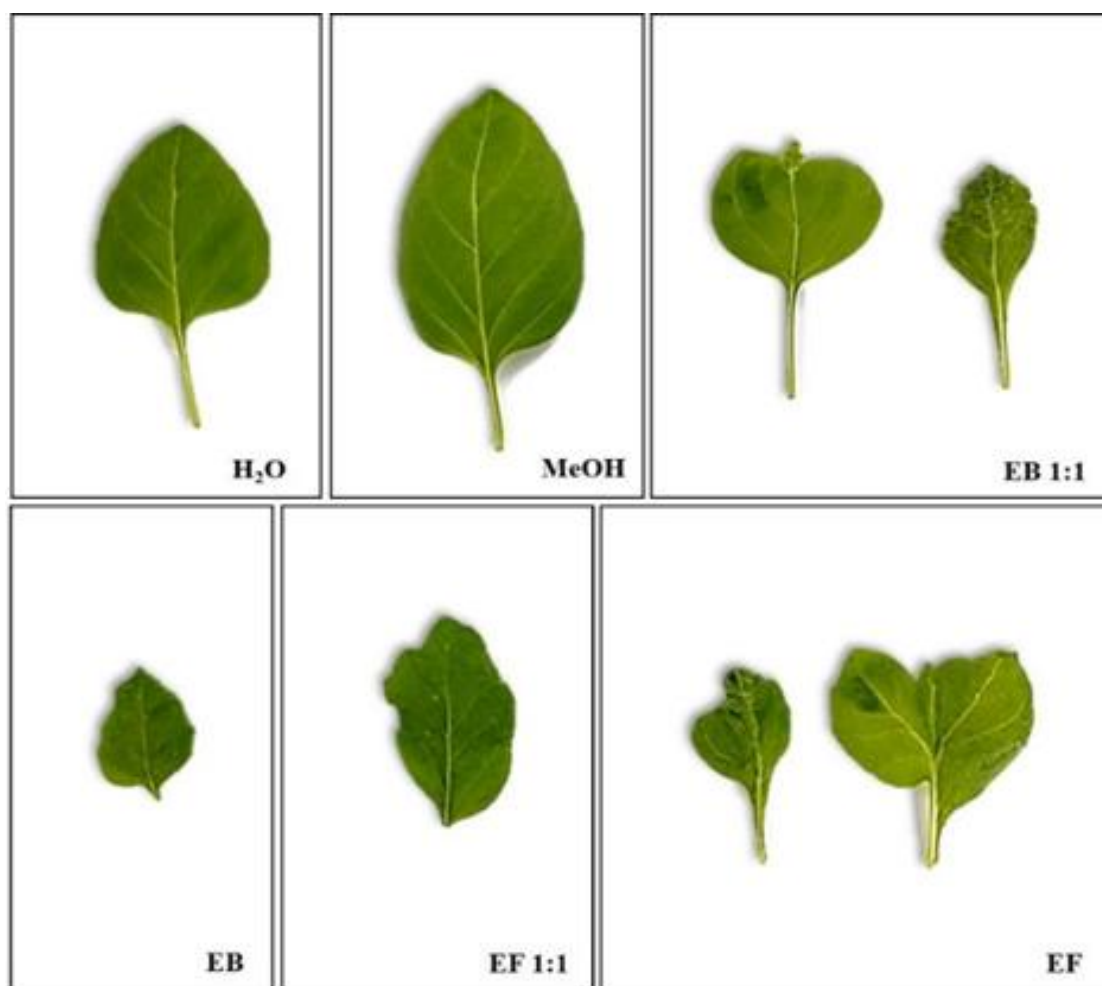


Figura 13. Morfologia frunzelor de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' din nodul bazal al plantulelor tratate cu extracte alcoolice de *C. autumnale* L. (EB 1:1 = extract din bulbi diluat (1:1); EB = extract din bulbi nediluat; EF 1:1 - extract din flori diluat (1:1); EF- extract din flori nediluat)

Mai mult, tratamentul cu extracte metanolice de *C. autumnale* L. a indus pe suprafețele foliare ale plantulelor de busuioc din ambele soiuri tratate pe apexul caular efecte similare cu cele observate în cazul celor tratate cu soluții apoase de colchicină: creșterea numărului de peri tectori și alungirea acestora, celule heteromorfe și lignificarea slabă a xilemului (Figura 14).

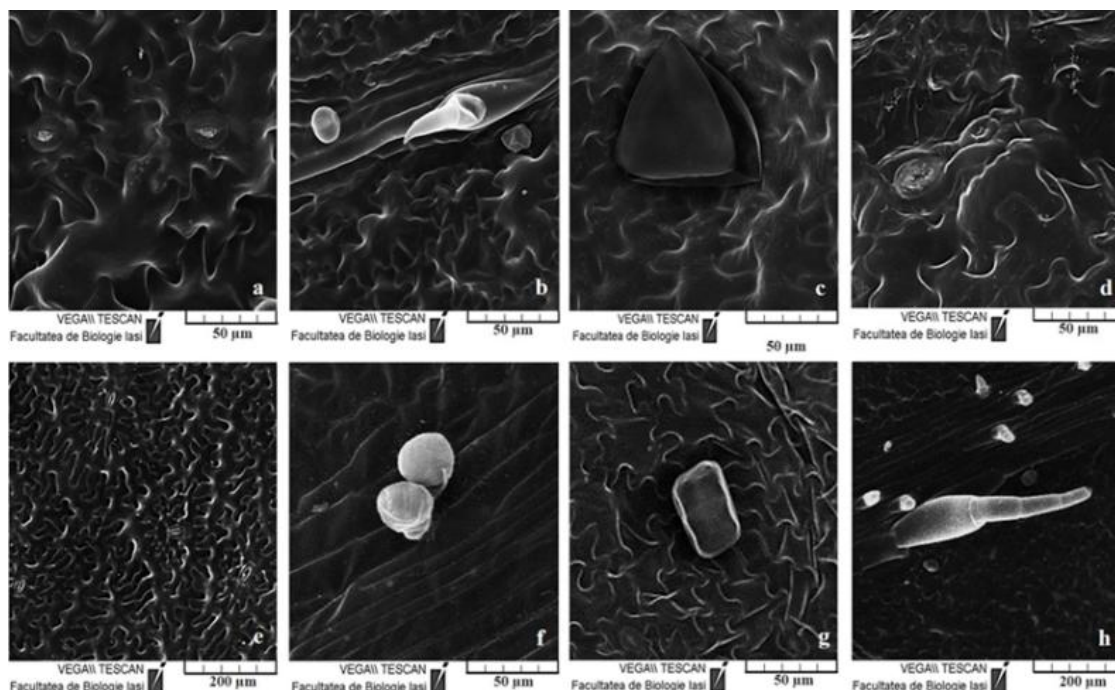


Figura 14. Anomalii observate pe suprafețele frunzelor de *O. basilicum* L. soiurile 'Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău' după aplicarea tratamentului cu extracte alcoolice de *C. autumnale* L. pe apexul caular (a – aspect tipic al suprafeței abaxiale; b – aspect tipic al suprafeței adaxiale; c – păr glandular cu formă alterată; d – stomate gemene; e – celule epidermice cu pereții laterali foarte ondulați; f – peri glandulari gemeni; g – păr glandular cu formă modificată; h – morfogeneza perilor tectori și un păr tector pluricelular alungit)

După tratamentul cu extracte metanolice de *C. autumnale* L., pe suprafețele foliare ale plantulelor de busuioc din ambele soiuri au fost observate deshidratări ale epidermei, peri glandulari cu formă alterată, iar în conturul transversal al epicotilelor examinate prezenta o alterare accentuată, explicată prin apariția celulelor heteromorfe în structura sa (Figura 15).

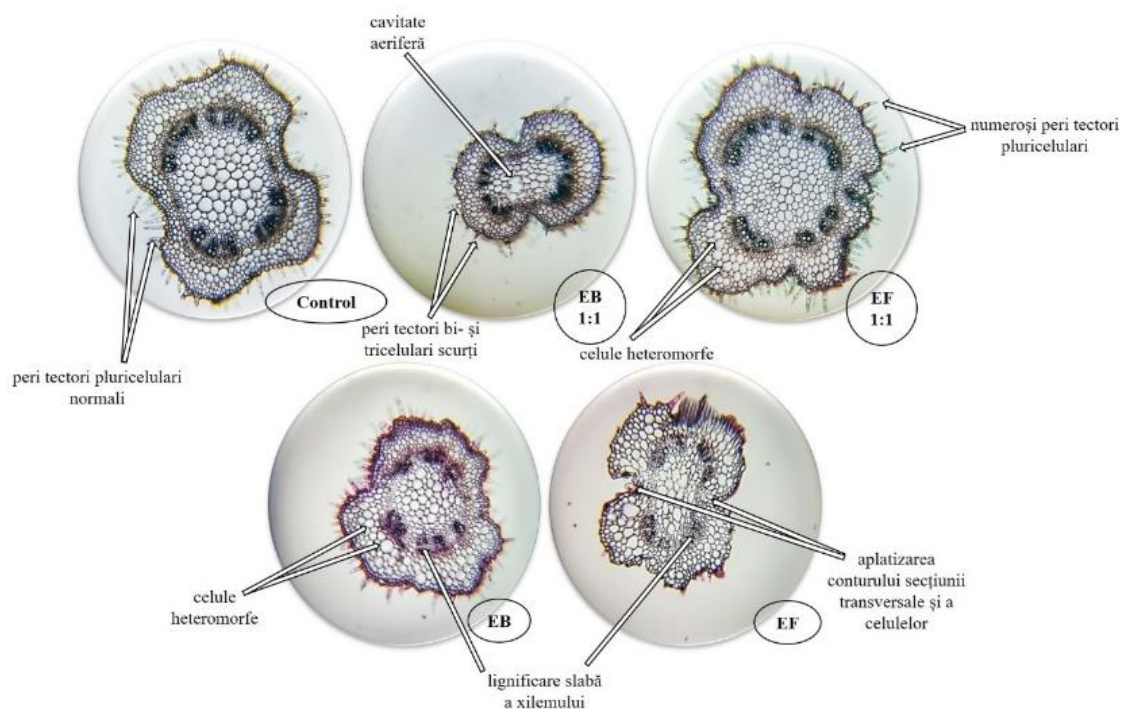


Figura 15. Diferențe identificate în structura epicotilului de la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău', după tratamentul cu extracte alcoolice de *C. autumnale* L., față de control (EB 1:1 = extract din bulbi diluat (1:1); EB = extract din bulbi nediluat; EF 1:1 - extract din flori diluat (1:1); EF- extract din flori nediluat)

Se impun, astfel, cercetări suplimentare pentru a elucida nivelul de toxicitate și potențialul alelopativ al metaboliților secundari produși de plantele aparținând speciei *C. autumnale* L. față de alte plante, cât și pentru a determina cum poate afecta această specie dinamica populațiilor vegetale din preajma sa și dacă această ar fi benefică pentru a fi introdusă dirijat în culturile de plante comestibile sau medicinale, ca agent protector împotriva bolilor și dăunătorilor, fără a afecta calitativ respectivele culturi. Astfel, s-a propus modificarea protocolului de lucru, înlocuirea solventului din extracte (metanolul a fost înlocuit de etanol) și extinderea și diversificarea analizelor de la nivel morfo-anatomic, fiziologic și biochimic.

## 2. Rezultate ulterioare

*Caracterizarea extractelor alcoolice și apoase din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de C. autumnale L.*

În extractele preparate din organele plantelor de *C. autumnale* L. conținutul de compuși bioactivi detectați a fost, în general, mai mare în extractele alcoolice, față de extractele apoase preparate din același material vegetal (folosind aceeași masă de material vegetal pulbere în prepararea extractelor, mai exact 5 grame), cu excepția extractului din bulbi colectați în perioada de înflorire.

Cel mai mare conținut de colchicină, compusul bioactiv principal, a fost detectat în extractele alcoolice și apos preparate din flori (8), iar cel mai mic, în extractele din teciile bulbului (7). Colchicina, ca mulți metaboliți secundari, contribuie la supraviețuirea plantelor prin efectul toxic pe care îl are față de ierbivore și agenți patogeni (Ghosh și Jha, 2008), fenomen ce poate explica faptul că a fost determinat un conținut de colchicină mai mare în organele supraterrane ale brândușei de toamnă, față de organele subterane.

Comparativ cu rezultatele cercetărilor anterior realizate, incluse în rezultatele preliminare, în care au fost preparate extracte din material vegetal (bulbi și flori) colectat din aceeași pajiște (în luna octombrie 2019), cu concentrațiile de colchicină detectate prin aceeași metodă ( $0,119 \pm 0,007$  mg/ml în extractul din bulbi și respectiv  $0,286 \pm 0,015$  mg/ml în extractul din flori), concentrația de colchicină în extractele obținute din materialul colectat în anul 2021 a fost de 2 ori mai mică în bulbi și de aproximativ 3 ori mai mare în extractul din flori. Aceste diferențe pot fi datorate condițiilor de mediu în care au crescut plantele, momentului colectării și biomasei totale a materialului vegetal recoltat, solventului utilizat în extracție, timpului de extracție etc.

Diferențele evidențiate prin compararea rezultatelor studiului de față cu cele preliminare se pot datora faptului că materialul vegetal a fost recoltat în ani diferiți, dar și faptului că metoda a fost adaptată ulterior după observarea faptului că metanolul (în raport de 70:30 cu H<sub>2</sub>O) este foarte toxic pentru semințele și plantulele de *O. basilicum* L., fiind ales etanolul (în raport de 70:30 cu H<sub>2</sub>O) ca solvent final cu toxicitate mai scăzută pentru utilizarea extractelor în tratamente aplicate soiurilor de busuioc test.

În studiul de față, conținutul de colchicină în bulbi a fost de  $1,328 \pm 0,003$  mg per gram de material vegetal colectat în perioada de creștere (primăvara) și  $0,617 \pm 0,002$  mg per gram de bulbi colectați în perioada de înflorire (toamna), utilizând un raport de 70:30 etanol-apă. Prin compararea rezultatelor obținute de Davoodi și colaborii (2021), care au obținut un conținut de  $4,4592 \pm 0,0109$  mg de colchicină per gram de material vegetal reprezentat de bulbi utilizând metanol-apă în raport de 80:20 ca solvent final indică faptul că metanolul ar putea fi un solvent mai potrivit pentru colchicină și acest compus are o solubilitate mai bună într-o concentrație mai mare de metanol. În această situație, este esențial să se ia în considerare mai mulți factori care pot influența conținutul de colchicină din extracte, inclusiv condițiile de mediu în care au crescut plantele de *C. autumnale* L., speciile de plante învecinate care concurează cu brândușa de toamnă pentru resursele nutritive, disponibilitatea nutrienților din sol, momentul colectării materialului vegetal și metoda de extracție folosită.

Colchiceina este considerată produsul principal de degradare al colchicinei (pe lângă lumicolchicine) (Kurek și Barczyński, 2016), compusul fiind utilizat ca și control al calității extractelor vegetale. Colchiceina a fost identificată în concentrații mici în extractele alcoolice și apoase din frunze tinere (2) și în extractele alcoolice și apoase preparate din fructe (3E, 5E și 5A) și foarte mici în extractele alcoolice și apoase din bulbi (1 și 6), extractul alcoolic din frunze mature (4E) și în extractele alcoolice și apoase din flori (8). Prezența acestui compus nu a fost detectată în compoziția extractului apos și nici în a celui etanolic din tecile bulbilor. Conținutul acestui compus a crescut în fructele de *C. autumnale* L. pe parcursul maturării lor, fapt indicat de concentrația mai crescută de colchiceină în extractele alcoolice și apoase din fructe mature (5) în comparație cu extractele din fructe imature (3).

Demecolcina, a cărei prezență deși a fost raportată în mai multe studii efectuate în legătură cu compoziția biochimică a speciei *C. autumnale* L. (Malichová et al., 1979; Yoneda et al., 1984; Herbert, Kattah și Knagg, 1990; Davoodi et al., 2021), nu a fost detectată în conținutul extractelor preparate în cadrul studiului de față, ceea ce poate indica faptul că substratul din zona din care a fost colectat materialul vegetal și condițiile de mediu sau de stres pe care le-au experimentat indivizii de *C. autumnale* L. înainte de colectare au influențat compoziția chimică a acestor plante, după cum a fost determinat prin analiza extractelor alcoolice și apoase.

Apigenina a fost identificată în extractele alcoolice și apoase din flori (8), în extractul apos din frunze mature (4A) și în extractul alcoolic din frunze tinere (2E). Acest compus este o flavonă cu proprietăți antioxidante, care ajută la protejarea celulelor plantelor de

stresul oxidativ, proprietate crucială pentru prevenirea daunelor cauzate de speciile reactive de oxigen (Madunić et al., 2018; Azeem et al., 2024) și a celor cauzate de razele UV-B (Righini et al., 2018). Ca metabolit secundar, apigenina contribuie la mecanismele de apărare ale plantei împotriva agenților patogeni și a factorilor de stres de mediu (Mushtaq et al., 2023; Azeem et al., 2024). Comparând aceste rezultate cu rezultatele obținute anterior și cu datele din literatură (Burzo et al., 2005), a fost confirmat faptul că apigenina se găsește în florile de *C. autumnale* L., aceasta fiind de asemenea identificată în cantități foarte mici în extractele din frunze.

Acidul salicilic a fost identificat în concentrația cea mai mare în extractele alcoolice și apoase din flori (8) și din frunze (2 și 4). Acest compus a fost indentificat și în extractele alcoolice alte organe, precum extractele din bulbii colectați primăvara (1E), fructele imature și mature (3E și 5E) și tecile bulbului (7E). Cuantificarea acestui compus în extractele alcoolice din frunze (2E și 4E) și fructe (3E și 5E) ar sugera creșterea conținutului acestui compus pe parcursul maturării acestor organe. Acidul salicilic este un compus implicat în procesul de înflorire, prezintă un rol important în protecția plantelor împotriva factorilor de stres biotici și abiotici (Wani et al., 2017) și contribuie la reglarea proceselor fiziologice și biochimice de-a lungul ciclului de viață al plantei, influențând creșterea și dezvoltarea lor (Vicente și Plasencia, 2011; Mo et al., 2020). Cu toate acestea, dat fiind conținutul foarte scăzut din extracte, este posibil ca acest compus să nu exercite efecte biologice vizibile asupra semințelor și plantulelor test pe termen scurt.

Analizele asupra materialului vegetal (organe vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L.) au arătat faptul că în timpul stadiului vegetativ cea mai mare cantitate de polifenoli se regăsește în organele supraterane, mai ales în frunze (2, 4) și flori (8), iar conținutul de polifenoli determinat a fost mai mare în bulbii colectați în timpul primăverii (1), comparativ cu bulbii colectați toamna (6). De asemenea, analiza extractelor alcoolice a sugerat că acumularea de polifenoli în fructe (3E și 5E) s-ar produce pe parcursul maturării, însă, în extractele apoase acest conținut a rămas aproximativ constant.

În mod similar analizei conținutului de polifenoli în extractele alcoolice și apoase din organe ale plantelor de *C. autumnale* L., s-a constatat că în timpul stadiului de creștere (perioada de primăvară) cea mai mare cantitate de flavonoide se regăsește în organele supraterane, îndeosebi în frunze (2, 4), flori (8) și fructe (3, 5). Flavonoidele sunt compuși fenolici ce reglează dezvoltarea plantelor și contribuie la pigmentarea florilor și fructelor, caracteristici esențiale pentru atragerea polenizatorilor (Mierziak, Kostyn și Kulma, 2014;

Mathesius, 2018), fapt ce ar putea explica prezența lor abundentă în aceste organe. Mai mult decât atât, acești compuși, prin acumularea în epidermă, protejează plantele de radiațiile solare dăunătoare (Shah și Smith, 2020; Ferreyra, Serra și Casati, 2021).

Flavonoidele prezintă proprietăți antioxidante puternice, ajutând la eliminarea speciilor reactive de oxigen (ROS) și, astfel, îndeplinesc un rol semnificativ în toleranța la stres a plantelor (Khalid, Bilal și Huang, 2019; Dias, Pinto și Silva, 2021; Shomali et al., 2022), dar și împotriva agenților patogeni și ierbivorelor, sporind rezistența acestora la stresul biotic (Mathesius, 2018; Alseekh et al., 2020; Shah și Smith, 2020). Mai mult, flavonoidele sunt implicate în procesele de semnalizare celulară precum interacțiunile rădăcină-rizosferă, interacțiune în care pot stimula sau inhiba activitatea microbiană, pot afecta absorbția nutrienților și pot media, influența sau chiar determina interacțiuni alelopatiche (Hassan și Mathesius, 2012; Shah și Smith, 2020), realitate ce explică prezența lor, chiar și în cantități mai scăzute, în organele subterane.

Activitatea antioxidantă a fost considerabil crescută în cazul extractelor alcoolice preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L., comparativ cu extractele apoase. Toate organele brândușei de toamnă au prezentat activitate antioxidantă ridicată, cu excepția extractului din bulbi colectați primăvara. În cazul extractelor apoase, activitatea antioxidantă detectată a fost destul de slabă, iar între extracte nu au fost determinate variații semnificative.

Având în vedere faptul că cea mai mare activitate antioxidantă a fost detectată în extractele alcoolice din fructe (3E și 5E), bulbi colectați toamna (6E) și flori (8E), fără variații semnificative, dar și în frunze (2E, 4E și 7E), însă conținutul de polifenoli și flavonoide a fost detectat în extractele din flori (8E), frunze (2E și 4E, dar nu și 7E) și fructe (3E și 5E) este posibil ca în organele supraterane ale brândușei de toamnă flavonoidele să se afle compușii principali care contribuie la activitatea antioxidantă, cu toate că există diferențe semnificative între conținutul de flavonoide dintre extractele alcoolice preparate din aceste organe.

O activitate antioxidantă foarte scăzută în cazul extractelor apoase preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L. poate indica prezența unor compuși cu solubilitate mai crescută în alcool sau insolubili/mai puțin solubili în apă. Pe lângă acest fapt, conținutul de polifenoli și de flavonoide detectat în extractele alcoolice din bulbi colectați toamna (6E) a fost foarte scăzut, fapt ce oferă indicii cu privire la prezența

altor compuși în conținutul acestui extract, care contribuie la o activitate antioxidantă crescută.

#### *Teste genetice și fiziologice asupra soiurilor test de O. basilicum L.*

În urma aplicării metodei Squash și a observării cromozomilor la microscopul optic, a fost stabilit faptul că metoda optimă de tratare a preplantulelor pentru a putea vizualiza cu claritate cromozomii pentru soiurile ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’ ale speciei *O. basilicum* L. este cea cu 8-hidroxichinolină 0,002 M (conform metodei utilizate de Truță și Zamfirache, 2013) timp de 240 de minute, la temperatura camerei (Figurile 16, 17). Studiul metafazelor a indicat faptul că soiurile ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’ ale speciei *O. basilicum* L. prezintă fiecare același număr de cromozomi ( $2n = 48$ ,  $x = 12$ ), observație ce este în concordanță cu informațiile din literatură referitoare la numărul de cromozomi prezenți la această specie (Pushpangadan și Bradu, 1995; Khosla, 1995; Archana et al, 2013), însă există și o variabilitate în numărul de cromozomi ai altor soiuri ce aparțin acestei specii (Paton și Putievsky, 1996; MuKherjee et al., 2005). Așadar, potențialele diferențe în răspunsurile plantelor de busuioc la tratamentul cu extracte de *C. autumnale* L. se pot datora unor factori de ordin morfogenetic și metabolic specifici fiecăruia dintre soiurile studiate.

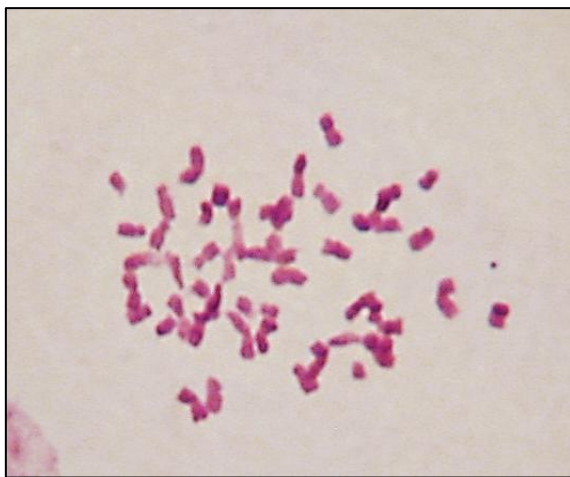


Figura 16. Cromozomii metafazici ai preplantulelor de *O. basilicum* L. ‘Italiano Classico’ tratate cu 8-hidroxichinolină 0,002 M timp de 4 ore ( $2n = 48$ )



Figura 17. Cromozomii metafazici ai preplantulelor de *O. basilicum* L. ‘Aromat de Buzău’ tratate cu 8-hidroxichinolină 0,002 M timp de 4 ore ( $2n = 48$ )

În urma efectuării testului de viabilitate conform metodei descrise de Boldor, Raianu și Trifu (1983) s-a constatat că o concentrație de 70% etanol prezintă un impact semnificativ asupra viabilității embrionului semințelor de *O. basilicum* L. în cazul ambelor soiuri studiate,

determinând necrozarea țesuturilor embrionare după doar 30 de minute de expunere. În mod similar, o concentrație de 35% etanol inhibă complet viabilitatea semințelor de *O. basilicum* L. soiul ‘Italiano Classico’ și parțial a celor din soiul ‘Aromat de Buzău’, acest soi părând a fi mai rezistent la stresul chimic indus de etanol. În același timp, o concentrație mai mică (23,33%) de etanol afectează semnificativ doar viabilitatea embrionilor semințelor din soiul ‘Italiano Classico’. Concentrația cea mai mică de etanol testată (17,5%) nu a afectat semnificativ viabilitatea embrionilor semințelor de busuioc din soiul ‘Aromat de Buzău’ comparativ cu varianta control (tratamentul cu H<sub>2</sub>O), ci doar a embrionilor semințelor de busuioc din soiul ‘Italiano Classico’ (Tabel 4).

Tabel 4. Procentajul de viabilitate (%) a embrionilor semințelor de *O. basilicum* L. soiurile ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’ după 30 de minute de imbibitie cu diferite concentrații de etanol (diferențele semnificative statistic sunt marcate cu litere diferite)

| Tratament        | <i>O. basilicum</i> L.<br>soiul ‘Italiano<br>Classico’ | <i>O. basilicum</i> L.<br>soiul<br>‘Aromat de<br>Buzău’ |
|------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O | 93,33±7,14 <sup>a</sup>                                | 86,67±7,69 <sup>b</sup>                                 |
| EtOH 17,5%       | 80±14,43 <sup>b</sup>                                  | 86,67±7,69 <sup>b</sup>                                 |
| EtOH 23,33%      | 40±28,87 <sup>c</sup>                                  | 86,67±15,38 <sup>b</sup>                                |
| EtOH 35%         | 0±0 <sup>d</sup>                                       | 26,67±25 <sup>d</sup>                                   |
| EtOH 70%         | 0±0 <sup>d</sup>                                       | 0±0 <sup>d</sup>                                        |

Testul de imbibitie efectuat pe semințele de *O. basilicum* L. cu extracte alcoolice și apoase din organe vegetative și de reproducere de *C. autumnale* L. a indicat faptul că masa de extract fixat prin imbibitie per sămânță este invers proporțională cu concentrația extractului, aceasta fiind însă mai mică în cazul extractelor, comparativ cu controlul corespunzător.

Semințele de *O. basilicum* L. soiul ‘Aromat de Buzău’ prezintă o capacitate de a absorbi și de a reține o cantitate mai mare de extract alcoolic sau apos, față de soiul ‘Italiano Classico’.

*Efecte ale extractelor preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de C. autumnale L. asupra semințelor de O. basilicum L.*

I. În perioada de creștere

Extractele alcoolice și apoase preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L. colectate în perioada de creștere (primăvara) afectează în mod diferit germinația semințelor speciei-test. În timp ce extractele alcoolice și apoase din bulbi (1) inhibă creșterea preplantulelor (rezultat evidențiat prin reducerea semnificativă a indicelui de vigoare a preplantulelor = SVI), extractele din frunze și din fructe își exercită efectele în moduri diferite, în funcție de concentrația compușilor biologic activi proprii și de solventul utilizat în extracție. În comparație cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată (C<sub>0</sub>), extractul alcoolic din bulbi de bânđușă de toamnă inhibă toți indicii de germinație ai semințelor ambelor soiuri de busuioc, iar extractul apos inhibă indicele de emergență a preplantulelor (SE) la soiul ‘Aromat de Buzău’.

Extractul apos din frunze (2), având un conținut ridicat de colchicină (mai mare decât cel din bulbi, dar mai mic decât cel din extractul alcoolic din frunze), inhibă creșterea preplantulelor (SVI), în timp ce extractul alcoolic stimulează emergența preplantulelor (SE) și timpul zilnic de germinație (MDG) a semințelor ambelor soiuri de busuioc. Pe de altă parte, există și răspunsuri specifice ale semințelor fiecărui soi la tratamentul cu extractul alcoolic din frunze: germinația semințelor din soiul ‘Italiano Classico’ a fost stimulată din punctul de vedere al germinației procentuale finale (FGP) și al indicelui de vigoare a preplantulelor (SVI), în timp ce germinația semințelor din soiul ‘Aromat de Buzău’ a fost stimulată din punctul de vedere al indicelui de germinație (GI) și al energiei germinative (GE). În comparație cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată (C<sub>0</sub>), extractul alcoolic din frunze inhibă germinația procentuală finală (FGP) a ambelor soiuri, și indicii de germinație (GI) și de vigoare a preplantulelor în cazul semințelor din soiul ‘Italiano Classico’, însă aceste efecte inhibitoare pot fi atribuite, de fapt, etanolului din extract.

Extractul apos din fructe (3) a inhibat atât creșterea preplantulelor (SVI), cât și indicele de emergență a preplantulelor (SE), în timp ce extractul alcoolic a stimulat germinația semințelor din perspectiva germinației procentuale finale (FGP) și a indicelui de emergență (SE), în comparație cu tratamentul cu etanol de concentrație 70%, în cazul ambelor soiuri testate. Mai mult, extractul alcoolic din fructe a stimulat și timpul zilnic de germinație (MDG) și creșterea preplantulelor (SVI) la soiul ‘Italiano Classico’. S-ar părea

că o concentrație scăzută a compușilor din extractele preparate determină efecte negative asupra germinăției semințelor de busuioc, iar o concentrație ridicată prezintă efecte stimulatorie. Pe de altă parte, în comparație cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată (C<sub>0</sub>), extractul alcoolic din fructe inhibă germinația procentuală finală (FGP), indicele de germinație (GI) și de vigoare a preplantulelor (SVI) la ambele soiuri.

## II. În perioada de fructificare

Extractul apos din frunze (4) inhibă indicele de emergență a preplantulelor (SE) ambelor soiuri de busuioc studiate, dar și energia germinativă (GE) și creșterea preplantulelor (SVI) de busuioc din soiul 'Aromat de Buzău'. Pe de altă parte, extractul alcoolic preparat din același material vegetal stimulează indicele de emergență a preplantulelor (SE) de busuioc din soiul 'Aromat de Buzău', în comparație cu tratamentul cu etanol. În comparație cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată (C<sub>0</sub>), extractul alcoolic din frunze inhibă toți indicii de germinație ai semințelor ambelor soiuri.

Extractul apos din fructe (5), deși nu prezintă o concentrație ridicată de colchicină, inhibă creșterea preplantulelor (SVI) aparținând ambelor soiuri de busuioc, în timp ce extractul alcoolic stimulează indicele de emergență a preplantulelor (SE) și energia germinativă (GE), în comparație cu tratamentul cu etanol. Aceste observații contribuie la teoria potrivit căreia o concentrație mai scăzută a compușilor determină efecte inhibitoare în plantele receptoare, iar o concentrație ridicată (în extractele alcoolice) ar putea induce un stres benefic, care stimulează germinația semințelor ambelor soiuri de *O. basilicum*. Comparativ cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată (C<sub>0</sub>), extractul alcoolic din fructe inhibă majoritatea indicilor de germinație ai semințelor ambelor soiuri.

## III. În perioada de înflorire

Extractul apos din bulbi (6) colectați în perioada de înflorire inhibă germinația semințelor ambelor soiuri de busuioc din punctul de vedere al indicelui de emergență a preplantulelor (SE), energiei germinative (GE) și creșterii preplantulelor (SVI). Extractul alcoolic preparat din același material vegetal inhibă timpul mediu de germinație (MGT) și creșterea preplantulelor (SVI), în comparație cu tratamentul cu etanol de concentrație 70%, precum și toți indicii de germinație, în comparație cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată. Se pare că acest organ (bulbul), chiar dacă nu conține o concentrație mare de colchicină, prezintă efecte inhibitoare și îndeplinește rolul de depozitare a compușilor alelopatici, asigurând protecția plantei în zona subterană.

Extractul apos din tecile bulbilor (7) nu exercită efecte semnificative asupra procesului de germinație a semințelor soiurilor de busuioc testate, iar extractul alcoolic prezintă efecte stimulative asupra germinației, în comparație cu tratamentul cu etanol (dar inhibitoare în comparație cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată), soiurile răspunzând, însă, diferit, la tratamentele cu acest extract. Extractul alcoolic din tecile bulbilor a stimulat germinația procentuală finală (FGP), timpul mediu zilnic de germinație (MDG) și indicele de vigoare a preplantulelor (SVI) din soiul ‘Italiano Classico’, precum și indicele de emergență (SE) și energia germinativă (GE) a preplantulelor din soiul ‘Aromat de Buzău’. Dacă aceste rezultate ar fi fost analizate strict în raport cu cele din varianta control C<sub>0</sub> (cu H<sub>2</sub>O), s-ar fi putut spune că acest organ prezintă efecte strict inhibitoare. În acest context considerăm că tecile bulbilor, fiind, de fapt, rămășițele frunzelor care au protejat planta de-a lungul ciclului său de viață, și-au pierdut proprietățile alelopatice la concentrații scăzute, dar prezintă potențial stimulator la concentrații ridicate.

Extracțele apoase și alcoolice din flori (8) inhibă creșterea preplantulelor (SVI) aparținând ambelor soiuri de busuioc studiate, comparativ cu tratamentul cu etanol, iar extractul apos din flori inhibă emergența preplantulelor (SE) din soiul ‘Aromat de Buzău’. În comparație cu semințele tratate cu H<sub>2</sub>O distilată (C<sub>0</sub>), extractul alcoolic din flori (cu o concentrație ridicată de colchicină) inhibă toți indicii de germinație ai semințelor ambelor soiuri de busuioc. Acest organ este nucleul alelopativ al plantei în zona supraterană, protejând-o nu doar de stresul oxidativ, de dăunători și ierbivore, ci și în competiția cu alte specii de plante din vecinătate, îndeplinind un rol deosebit în perpetuarea speciei *C. autumnale* L., prin ocrotirea structurilor sale de reproducere.

*Efecte ale extractelor preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor de C. autumnale L. asupra plantulelor de O. basilicum L.*

Testarea extractelor din organe vegetative și de reproducere ale plantelor aparținând speciei *C. autumnale* L. colectate în diferite stadii ale ciclului său ontogenetic asupra meristemelor caulinare ale plantulelor celor două soiuri de *O. basilicum* L. avute în atenție reprezintă o strategie aplicată pentru a maximiza efectele alelopatice ale speciei donatoare, astfel încât acestea să fie observabile și cuantificabile în specia receptoare, ca metodă adaptată după tehnicile de inducere a poliploidiei în speciile de plante de interes, deoarece meristemele reprezintă țesuturi nediferențiate, cu activitate metabolică intensă, foarte

susceptibile la condiții de stres sau la acțiunea unor compuși cu activitate biologică, cum este colchicina.

#### I. În perioada de creștere

Extractul apos din bulbi (1) stimulează creșterea epicotilului plantulelor aparținând ambelor soiuri de busuioc studiate (Figura 40) și creșterea ariei foliare la nodul bazal al plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău', însă extractul alcoolic preparat din același material vegetal determină diminuarea suprafeței foliare la nodurile bazal și intermediar al plantulelor din soiul 'Italiano Classico' (Figura 41). Ambele tipuri de extracte determină anomalii de morfogeneză, concretizate printr-un heteromorfism al celulelor epidermice și stomatelor sau prin apariția pe suprafața foliară a unor zone de morfogeneză intercalate cu zone de țesut dezvoltat (Figura 18), anomalii ce sunt cel mai probabil determinate de acțiunea colchicinei. Acest extract nu a influențat la nivel micromorfologic modificarea densității perilor tectori și secretori, ci a indus creșterea ariei stomatelor și modificări în densitatea acestora în funcție de suprafața foliară examinată și de soiul de busuioc studiat. Heteromorfismul celulelor poate fi observat și în secțiunile anatomice, precum și o lignificare mai slabă a vaselor conducătoare (Figura 19) care, conform literaturii, se datorează efectelor colchicinei. Din punct de vedere fiziologic, extractele alcoolice și apoase preparate din bulbi au determinat creșterea cantității de CO<sub>2</sub> substomatic, scăderea conținutului de clorofilă a din frunze (Figura 43) și creșterea activității antioxidante la ambele soiuri de busuioc avute în atenție (Figura 44). Aceste extracte au determinat și scădere conținutului de polifenoli în frunzele plantulelor din soiul 'Italiano Classico', iar extractul apos a determinat scădere conținutului de flavonoide din frunzele ambelor soiuri. Cu toate că plantulele tratate cu extracte alcoolice și apoase din bulbi de *C. autumnale* L. au suferit mai puțin de atacul dăunătorilor, comparativ cu plantulele tratate cu etanol, indicii analizați indică, în mod clar, consecințele tratamentelor aplicate.

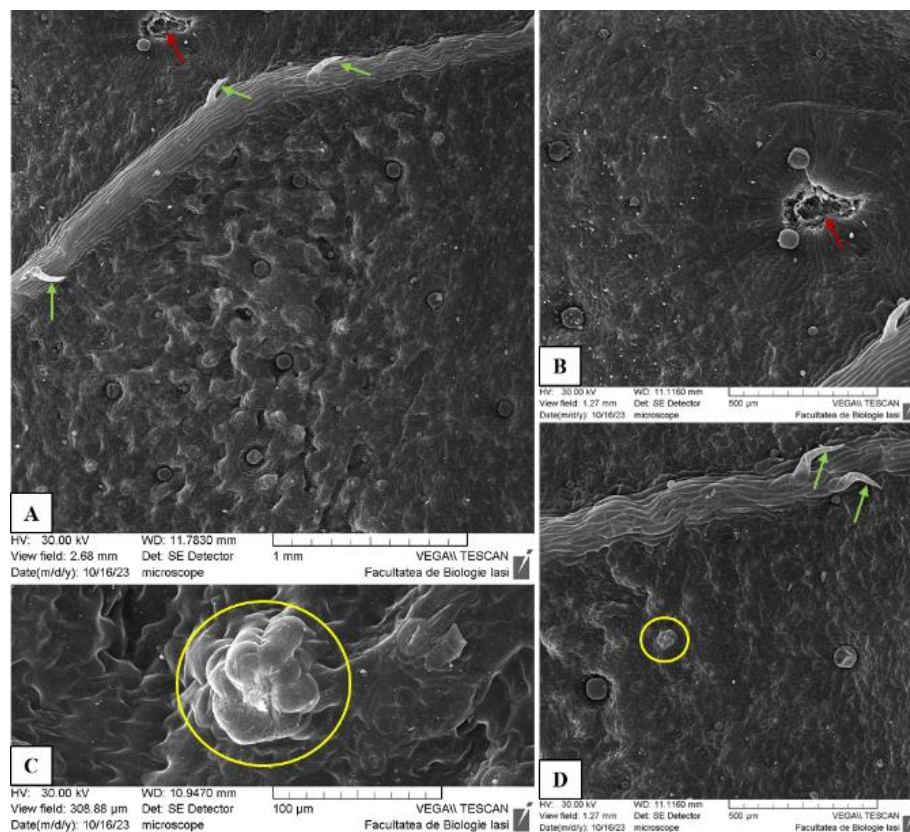


Figura 18. Suprafața foliară abaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul ‘Aromat de Buzău’ tratate cu extract apos din bulbi de *C. autumnale* L. (1A) colectați primăvara (săgețile verzi indică apariția perilor tectori; săgețile roșii indică o zonă cicatrizată în urma atacului unor insecte; cercul galben încadrează o zonă de morfogeneză)

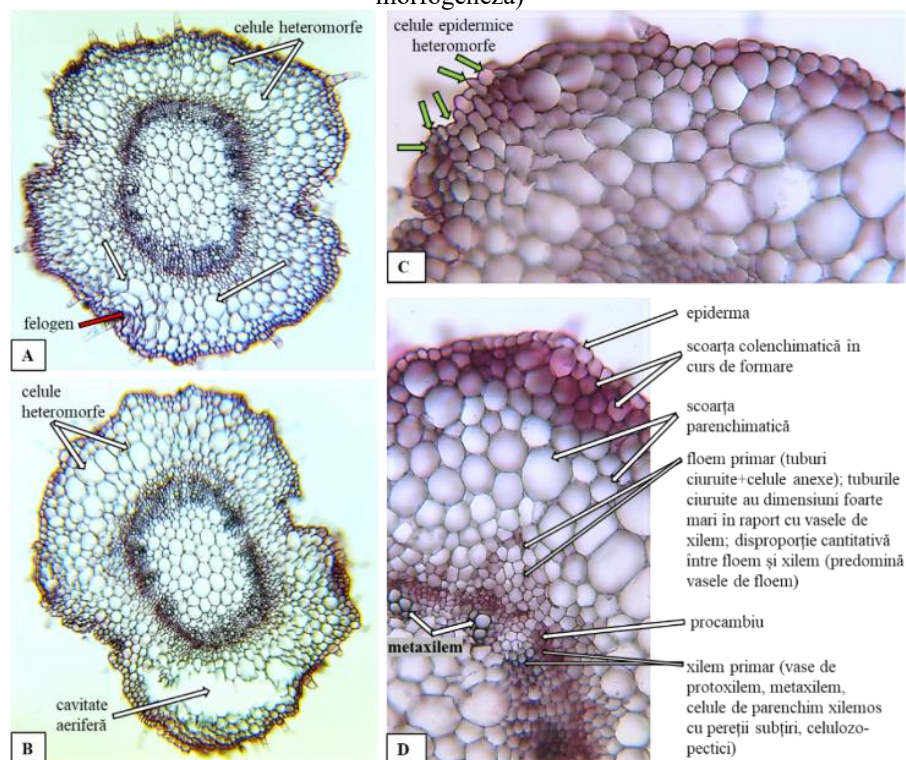


Figura 19. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul ‘Italiano Classico’ tratate cu extract alcoolic din bulbi de *C. autumnale* L. colectați primăvara (1E)

Extractul apos din frunze (2) a stimulat creșterea epicotilului plantulelor aparținând ambelor soiuri de busuioc (Figura 40) și a ariei foliare la nodul intermediar al plantulelor din soiul ‘Aromat de Buzău’ (Figura 41). Extractul alcoolic preparat din același material vegetal a stimulat creșterea epicotilului și a ariei foliare la nodul intermediar al plantulelor din soiul ‘Aromat de Buzău’, dar a inhibat creșterea foliară la nodurile bazal și intermediar al plantulelor din soiul ‘Italiano Classico’ (Figura 41). Ambele timpuri de extracte au indus anomalii de morfogenează pe suprafețele foliare examinate ale ambelor soiuri (Figura 20), precum și apariția perilor tectori pe suprafața abaxială a frunzelor (Figura 20), zonă în care nu apar în mod obișnuit, modificări ce indică un răspuns al plantulelor test la stresul chimic indus de tratamente. Aplicarea tratamentelor cu aceste extracte a indus creșterea ariei stomatale pe suprafețele foliare ale ambelor soiuri de busuioc și variații ale densității stomatelor, iar densitatea perilor tectori a scăzut pe suprafețele adaxiale analizate. Extractul apos a indus creșterea densității perilor secretori, fapt ce ar conferi plantulelor o rezistență mai bună la atacul dăunătorilor și ierbivorelor însă, în realitate, plantulele test nu au dobândit această rezistență dedusă din observațiile realizate pe fotografiile suprafețelor foliare efectuate la microscopul electronic. Ambele extracte au determinat reconfigurarea structurilor anatomice ale epicotilelor plantulelor test, acestea căpătând un contur rectangular (Figura 21), caracter ce reprezintă o ușoară abatere de la conturul pătratic obișnuit, specific speciilor din familia Lamiaceae. Extractul alcoolic din frunze a determinat creșterea ratei de transfer a electronilor, creșterea cantității de CO<sub>2</sub> substomatic, reducerea conținutului de clorofilă a (Figura 43) și creșterea activității antioxidante la plantulele ambelor soiuri de busuioc tratate (Figura 44), în timp ce extractul apos a determinat scăderea ratei transferului de electroni (Figura 42) și a conținutului de pigmenți carotenoidici la plantulele din soiul ‘Italiano Classico’ și creșterea conținutului de clorofilă b (Figura 43), flavonoide și a activității antioxidante la plantulele din soiul ‘Aromat de Buzău’ (Figura 44). Extractul apos a indus creșterea intensității transpirației și scăderea conținutului de CO<sub>2</sub> substomatic în frunzele plantulelor ambelor soiuri de busuioc. În lumina celor prezentate anterior putem considera că frunzele tinere de *C. autumnale* L. reprezintă organe cu un anumit potențial alelopativ, ce afectează în proporții diferite diverși parametri morfo-anatomo-fiziologici în plantulele receptoare și induce stres chimic și oxidativ.

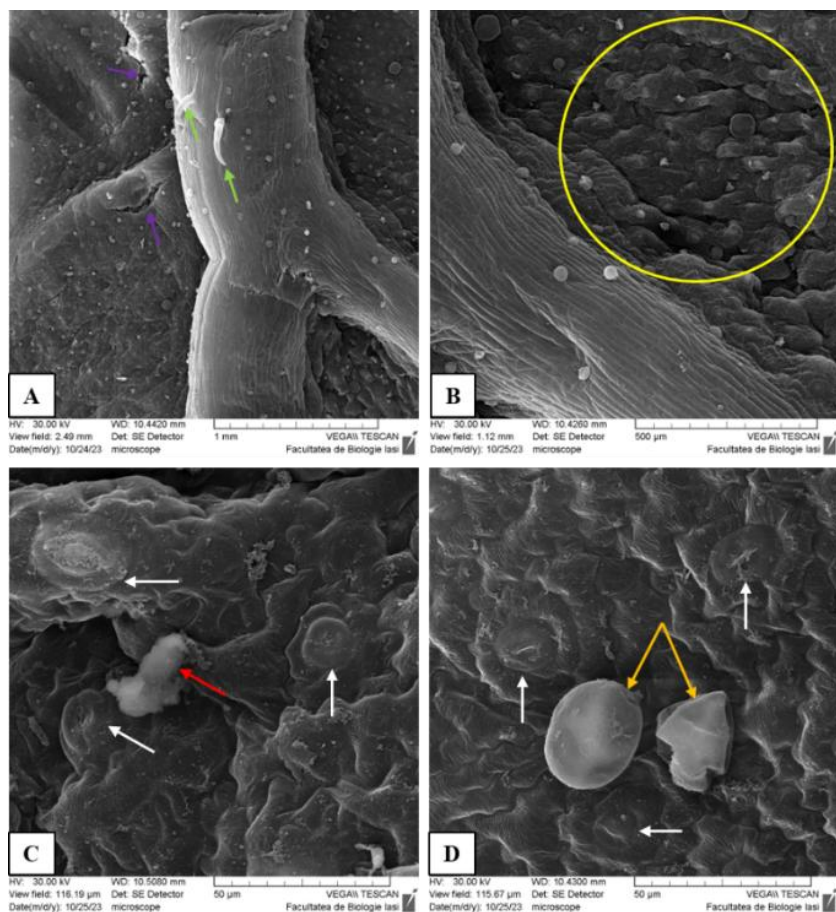


Figura 20. Suprafața foliară abaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Italiano Classico' tratate cu extract apos din frunze de *C. autumnale* L. (2A) colectate primăvara (săgețile violet indică rupturi ale epidermei; cercul galben încadrează o zonă de morfogeneză; săgețile albe indică stomate heteromorfe; săgeata roșie indică o formațiune străină depusă de insecte; săgețile portocalii indică peri secretori gemeni)

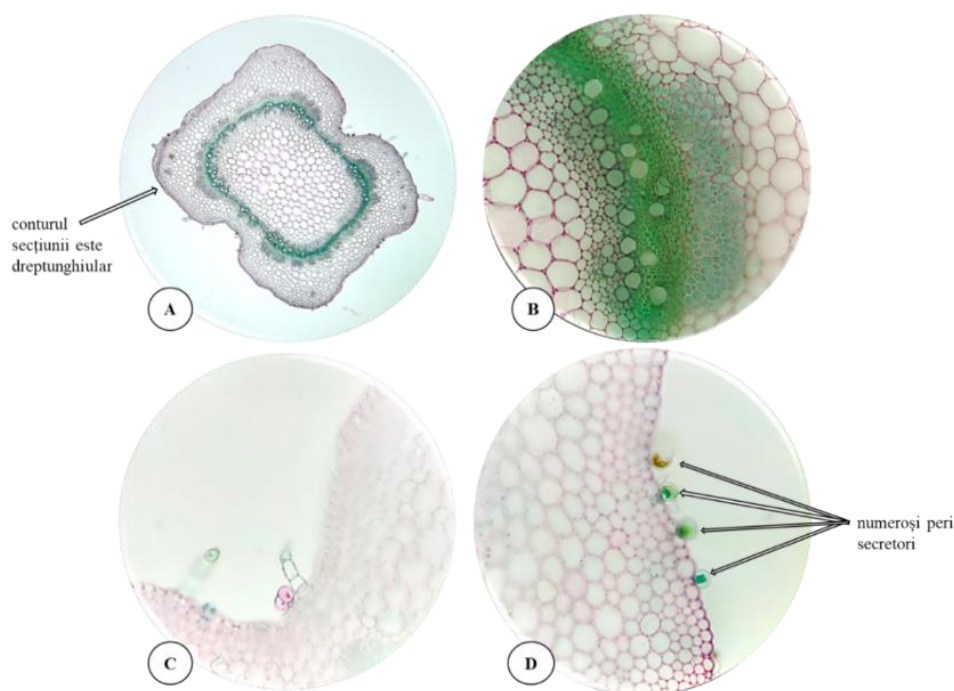


Figura 21. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Italiano Classico' tratate cu extract apos din frunze de *C. autumnale* L. (2A) colectate primăvara

Extractul apos din fructe (3) a afectat în mod diferit plantulele din cele două soiuri de busuioc studiate. La plantulele din soiul 'Italiano Classico' acest extract a determinat reducerea ariei foliare la toate cele trei noduri (Figura 41), a stimulat alungirea perilor tectori de pe suprafața foliară adaxială, concomitent cu scăderea densității acestora, creșterea ariei stomatale pe suprafața abaxială, scăderea ratei transferului de electroni (Figura 42), a conținutului de CO<sub>2</sub> substomatic și a conținutului de clorofilă b (Figura 43), dar și creșterea activității antioxidante (Figura 44). La plantulele din soiul 'Aromat de Buzău' acest extract a stimulat creșterea epicotilului (Figura 40), a ariei stomatelor pe ambele suprafețe foliare, a determinat variații în densitatea stomatelor și scăderea conținutului de polifenoli și flavonoide. Pe de altă parte, extractul alcoolic din fructe, la fel ca și cel apos, a determinat reducerea ariei foliare la toate cele trei noduri ale plantulelor din soiul 'Italiano Classico', dar a stimulat creșterea ariei foliare la nodul bazal al plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 41). Acest extract a determinat apariția unor anomalii de morfogeneză pe suprafețele foliare ale plantulelor aparținând ambelor soiuri de busuioc, dar și apariția perilor tectori pe suprafața abaxială (Figura 22) (stres chimic), creșterea ariei stomatelor pe ambele suprafețe foliare, asimetria structurală a epicotilului (Figura 23) și creșterea ratei de transfer a electronilor (Figura 42). Fructele plantelor aparținând speciei *C. autumnale* L., deși imature și incomplet dezvoltate, prezintă capacitatea de a induce stres chimic în plantele receptoare și de a le afecta diverși parametri, în funcție de soi, inducând instabilitate atât în structurile

anatomice și morfologice, cât și în procesele fiziologice și biochimice și sensibilizându-le, astfel, la atacul dăunătorilor, după cum a fost observat și în fotografiile efectuate asupra suprafețelor foliare examinate la microscopul electronic. Se poate spune că aceste extracte, pe lângă cele preparate din bulbii colectați în perioada de înflorire a plantelor de *C. autumnale* L., precum și din frunzele lor colectate în perioada de fructificare, au prezentat cele mai dăunătoare efecte asupra plantulelor receptoare aparținând celor două soiuri.

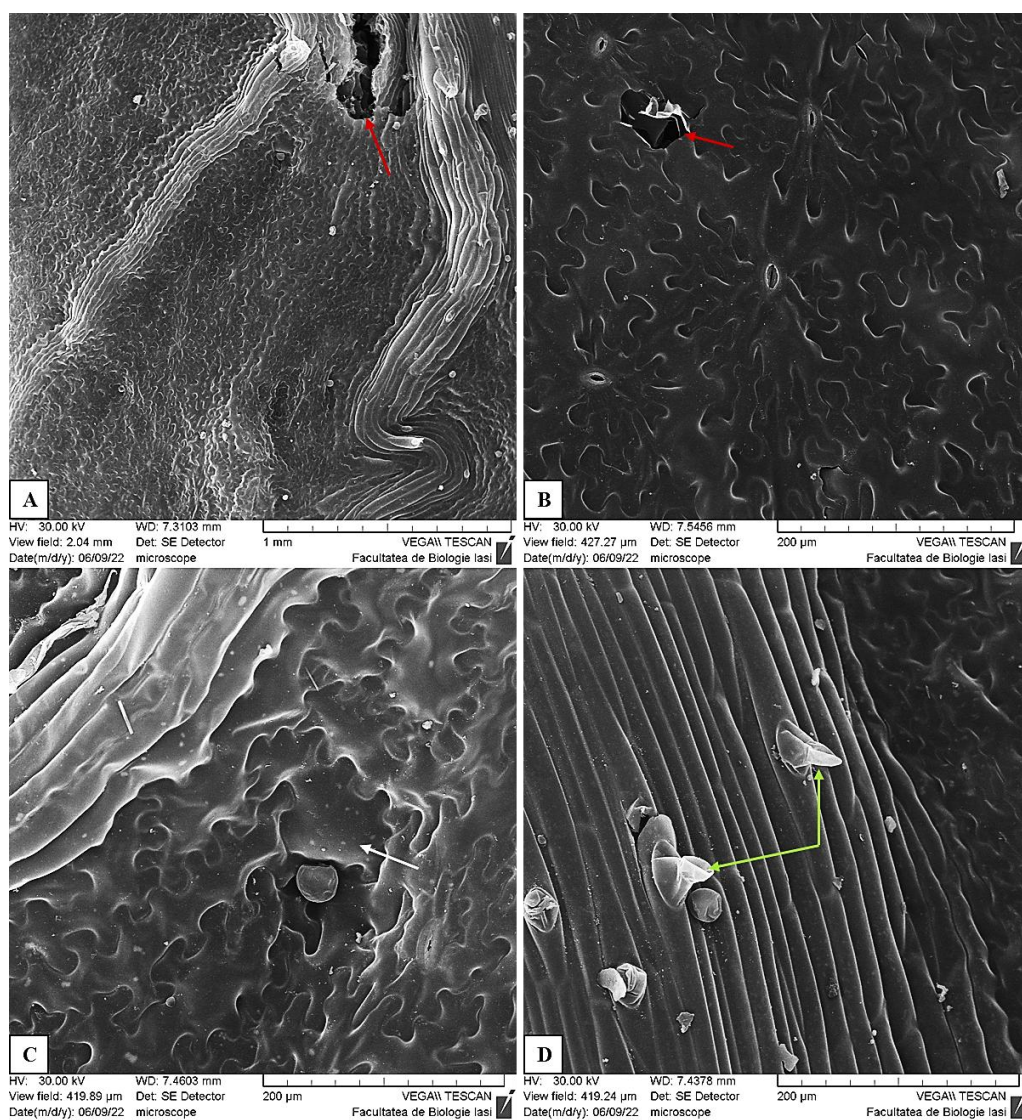


Figura 22. Suprafața foliară abaxială la plantulele de *O. basilicum* 'L. soiul Aromat de Buzău' tratate cu extract alcoolic din fructe de *C. autumnale* L. (3E) colectate primăvara (săgețile roșii indică cicatrizări ale epidermei în urma atacului unor insecte; săgeata albă indică o celulă epidermică cu formă alterată și dimensiuni mari; săgețile verzi indică apariția perilor tectori)

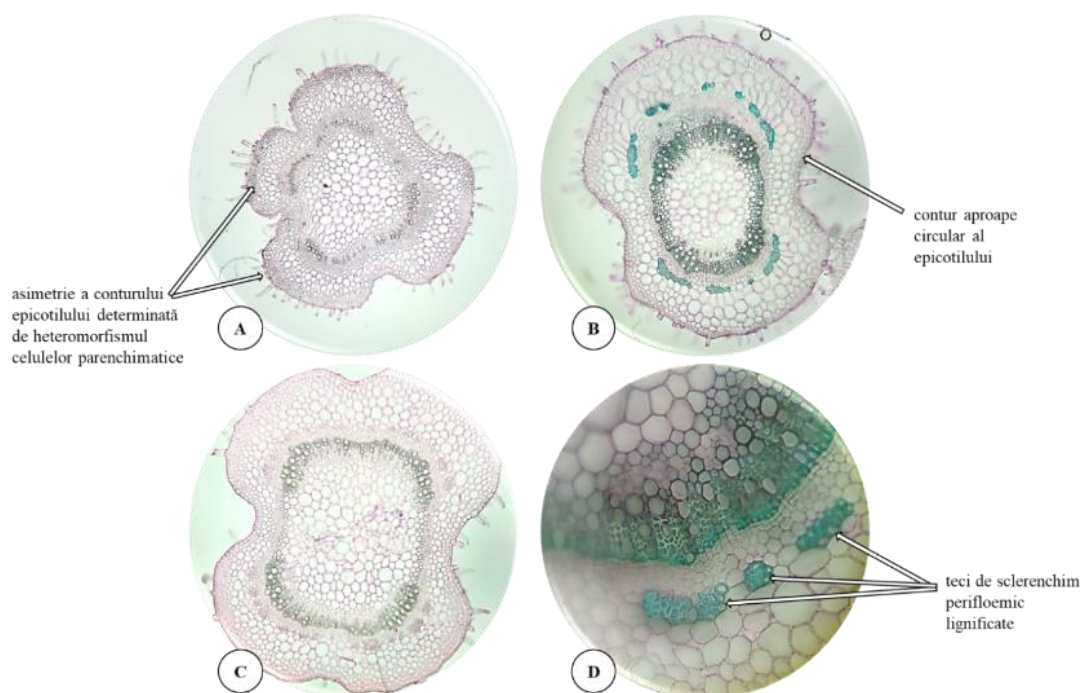


Figura 23. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din fructe de *C. autumnale* L: (3A) colectate primăvara

## II. În perioada de fructificare

Extractele alcoolice și apoase preparate din frunzele (4) plantelor de *C. autumnale* L. au stimulat creșterea epicotilelor plantulelor de busuioc din soiul 'Aromat de Buzău'. Extractul apos din frunze a determinat scăderea ariei foliare la toate cele trei noduri ale plantulelor din soiul 'Italiano Classico' și la nodul intermediar al plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 41), creșterea ariei stomatelor pe suprafața abaxială a frunzelor plantulelor din soiul 'Italiano Classico' și pe ambele suprafețe foliare ale plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău', precum și variații ale densității stomatelor, perilor tectori și secretori. Extractul apos din frunze ale plantelor de *C. autumnale* L. a determinat scăderea ratei de transfer a electronilor (Figura 42), scăderea conținutului de CO<sub>2</sub> substomatic și de polifenoli, și creșterea activității antioxidante la plantulele din soiul 'Italiano Classico' (Figura 44) și creșterea conținutului de CO<sub>2</sub> substomatic și de clorofilă a (Figura 43) la plantulele din soiul 'Aromat de Buzău'; în același timp, acest extract a determinat și scăderea conținutului de flavonoide în frunzele plantulelor aparținând ambelor soiuri de busuioc. Extractul alcoolic din frunze a determinat creșterea ariei foliare la nodul bazal al plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 41) și variații ale densității stomatelor, perilor tectori și secretori. Ambele tipuri de extracte au determinat anomalii de morfogeneză pe suprafețele foliare ale plantulelor aparținând celor două soiuri studiate (printre care și apariția perilor

tectori pe suprafața foliară abaxială) (Figurile 24 și 25), dar și în structura epicotilului (Figura 26), iar extractul alcoolic le-a indus acestora creșterea intensității procesului de transpirație foliară. Extractul apos pare a fi mai dăunător pentru plantulele receptoare decât cel alcoolic, preparat din același material vegetal, afectându-le diverși parametri morfo-anatomo-fiziologici și sensibilizându-le la atacul dăunătorilor, după cum s-a observat și prin examinarea imaginilor micromorfologice ale suprafețelor lor foliare la microscopul electronic.

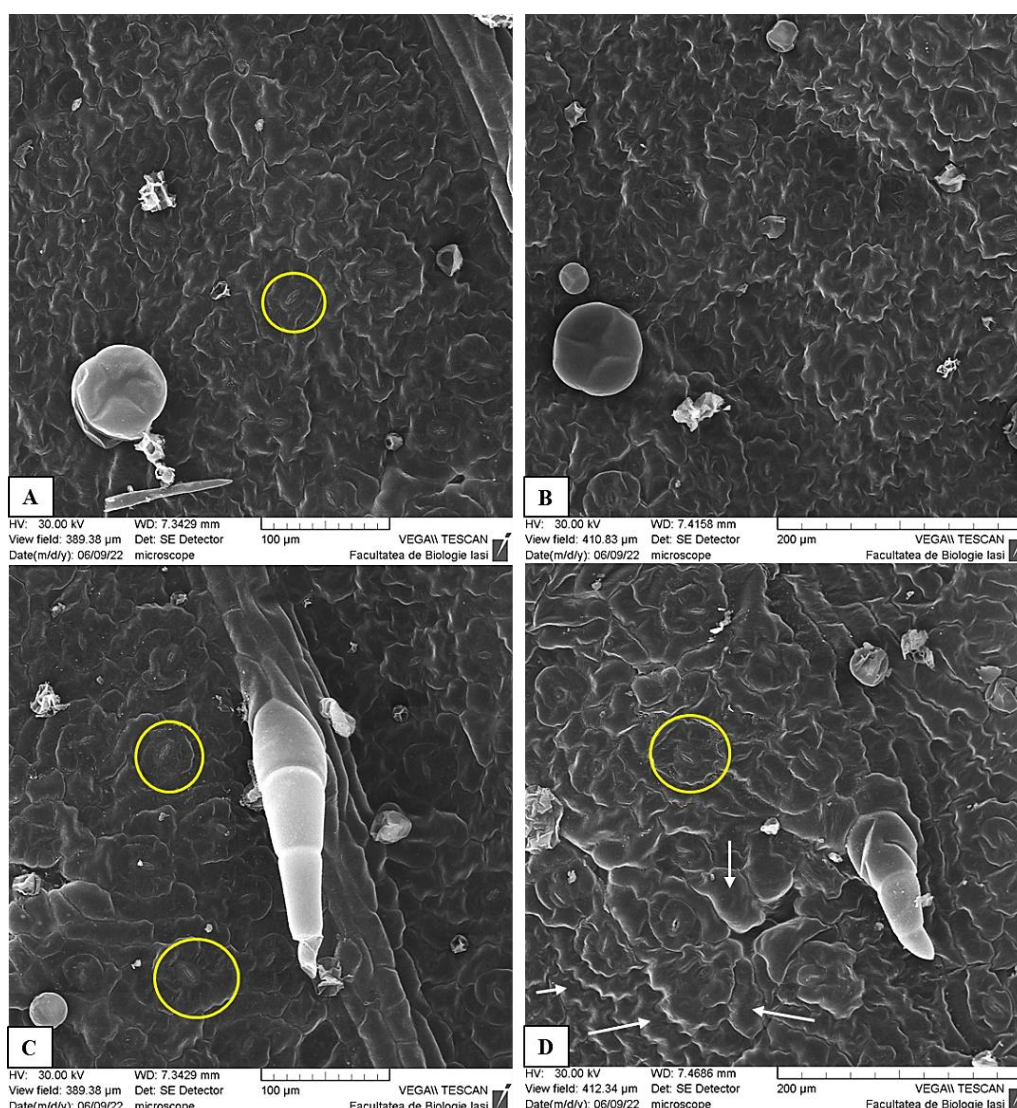


Figura 24. Suprafața foliară adaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul ‘Aromat de Buzău’ tratate cu extract alcoolic din frunze de *C. autumnale* L. (4E) colectate vara (săgețile albe indică celule heteromorfe; cercurile galbene încadrează zone de stomatogeneză)

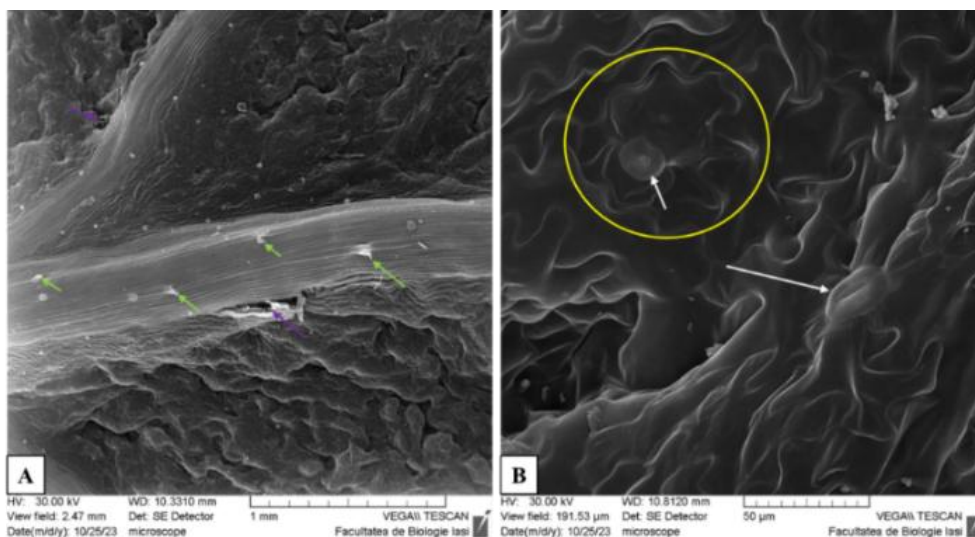


Figura 25. Suprafața foliară abaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Italiano Classico' tratate cu extract apos din frunze de *C. autumnale* L. (4A) colectate vara (săgețile violet indică rupturi sau denivelări la nivelul epidermei; săgețile verzi indică apariția perilor tectori; săgețile albe indică stomate heteromorfe; cercul galben încadrează o stomată în proces de morfogeneză)

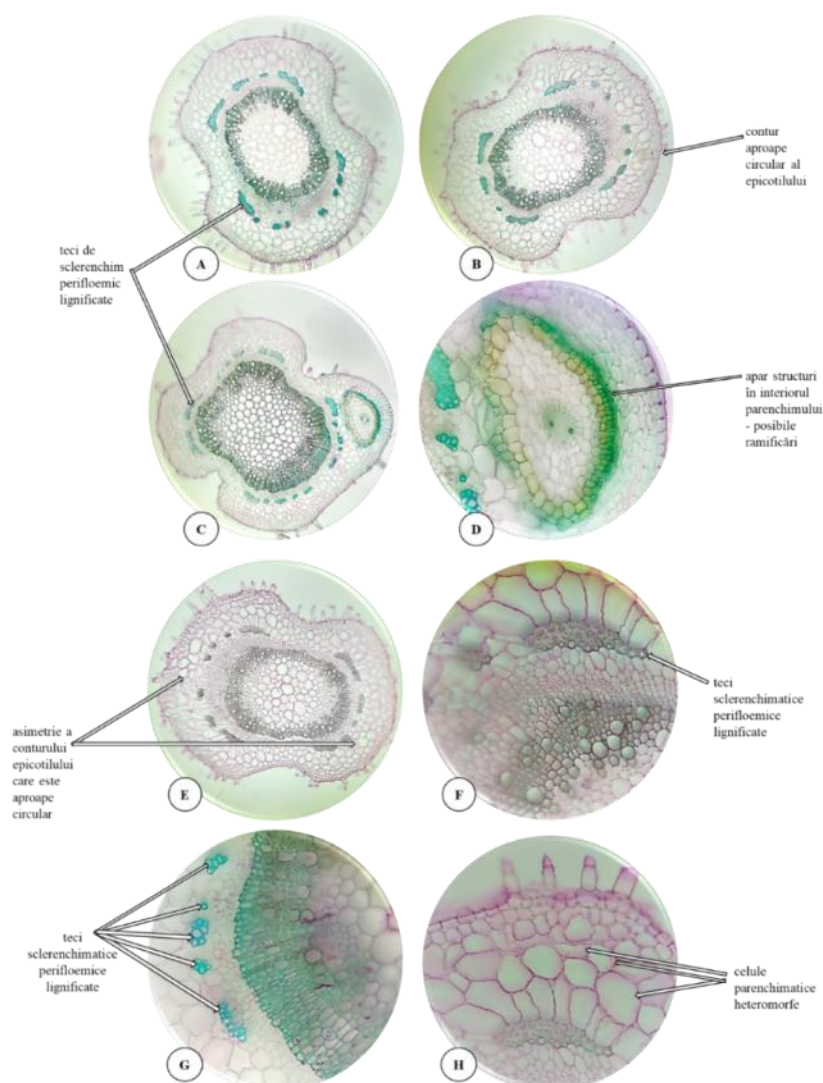


Figura 26. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din frunze de *C. autumnale* L. (4A) colectate vara

Extractul apos din fructe (5) de *C. autumnale* L. a stimulat creșterea epicotilului plantulelor din soiul ‘Italiano Classico’ (Figura 40), a inhibat creșterea ariei foliare la nodurile bazal și intermediar la plantulele din soiul ‘Aromat de Buzău’ (Figura 41), a indus variații ale indicilor micromorfologici și anatomici pe suprafețele foliare ale ambelor soiuri, a scăzut rata de transfer de electroni (Figura 42), conținutul de CO<sub>2</sub> substomatic, de polifenoli și flavonoide la ambele soiuri studiate și a scăzut activitatea antioxidantă în frunzele plantulelor din soiul ‘Aromat de Buzău’ (Figura 44).

Extractul alcoolic preparat din același material vegetal a indus reducerea suprafeței foliare la nodurile intermediar și apical al plantulelor din soiul ‘Italiano Classico’ și creșterea suprafeței foliare la nodul intermediar al plantulelor din soiul ‘Aromat de Buzău’ (Figura 41). Acest extract a determinat apariția unor semne de fragilitate și senescență prematură în structura epicotilelor examinate (Figura 29) cauzate, cel mai probabil, de hormonii de creștere prezenți în compoziția fructelor de *C. autumnale* L. din care s-a preparat extractul. În același timp remarcăm faptul că extractul discutat a intensificat procesul de respirație la plantulele ambelor soiuri și a scăzut conținutul de clorofilă b din frunzele plantulelor soiului ‘Aromat de Buzău’ (Figura 43).

Ambele tipuri de extracte din fructe au determinat anomalii de morfogeneză la nivelul frunzelor (Figura 27), printre care și apariția perilor tectori pe suprafața foliară abaxială (Figura 28) și anomalii în structurile epicotilelor (Figura 29) examinate aparținând plantulelor celor două soiuri de busuioc, însă aceste extracte nu au avut un efect atât de dăunător, comparativ cu celelalte extracte asupra plantulelor test care, ca efect al tratamentului primit s-au dovedit a fi mai rezistente la atacul dăunătorilor sau au fost atacate mai puțin decât plantulele test din alte variante experimentale.

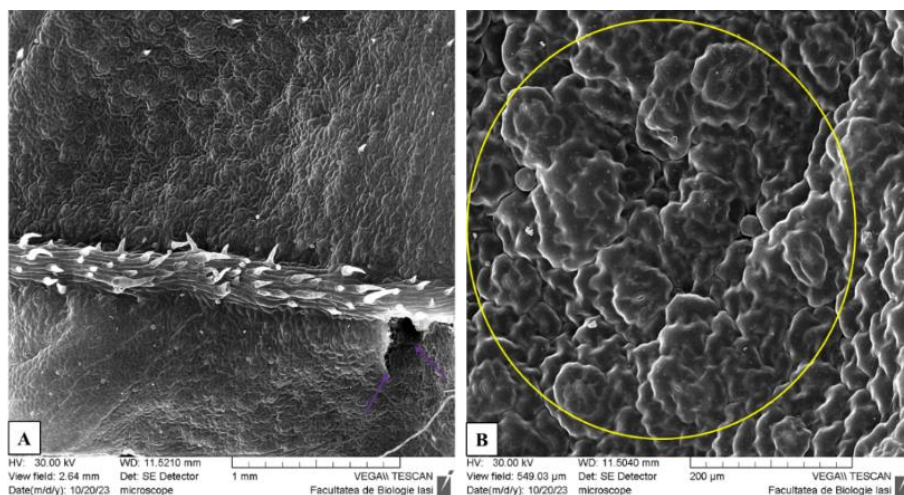


Figura 27. Suprafața foliară adaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din fructe de *C. autumnale* L. (5A) colectate vara (săgețile violet indică rupturi ale epidermei; cercul galben încadrează zone de stomatogeneză)

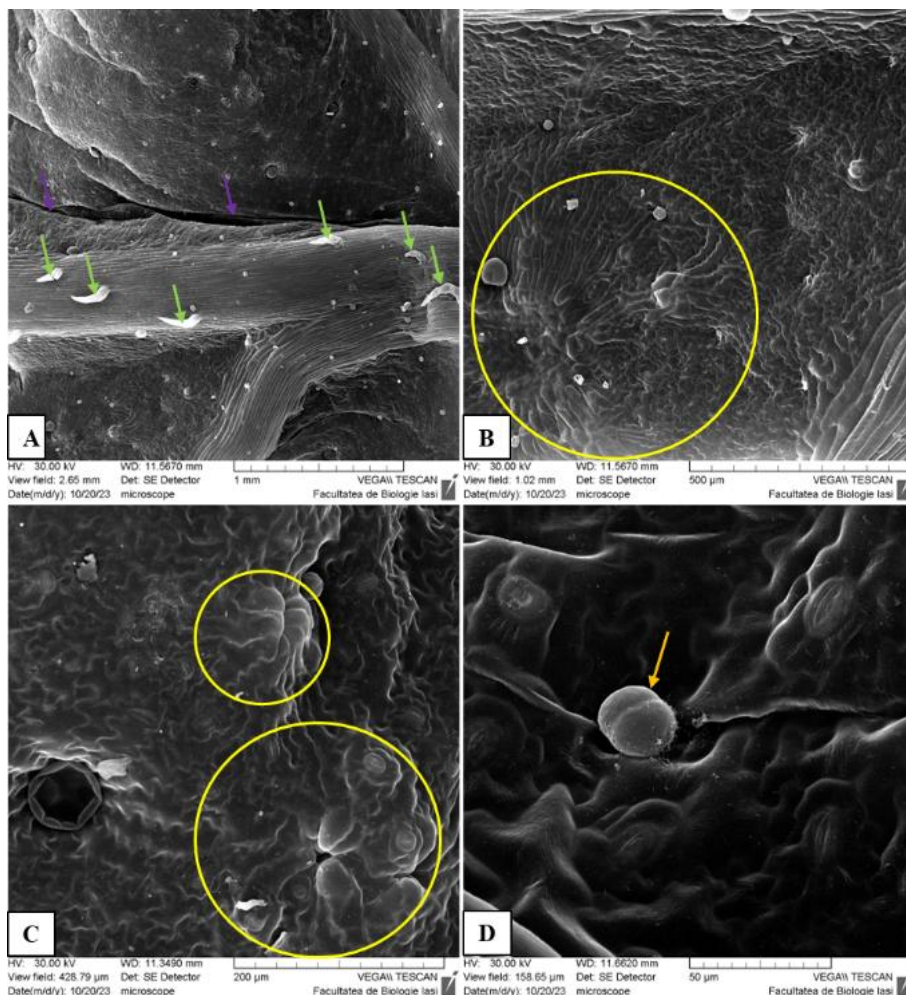


Figura 28. Suprafața foliară abaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din fructe de *C. autumnale* L. (5A) colectate vara (săgețile violet indică pliuri, denivelări sau discontinuități ale epidermei; săgețile verzi indică apariția perilor tectori; cercurile galbene încadrează zone de morfogenează sau dezorganizare a epidermei; săgeata portocalie indică un păr secretor cu capul secretor bicelular)

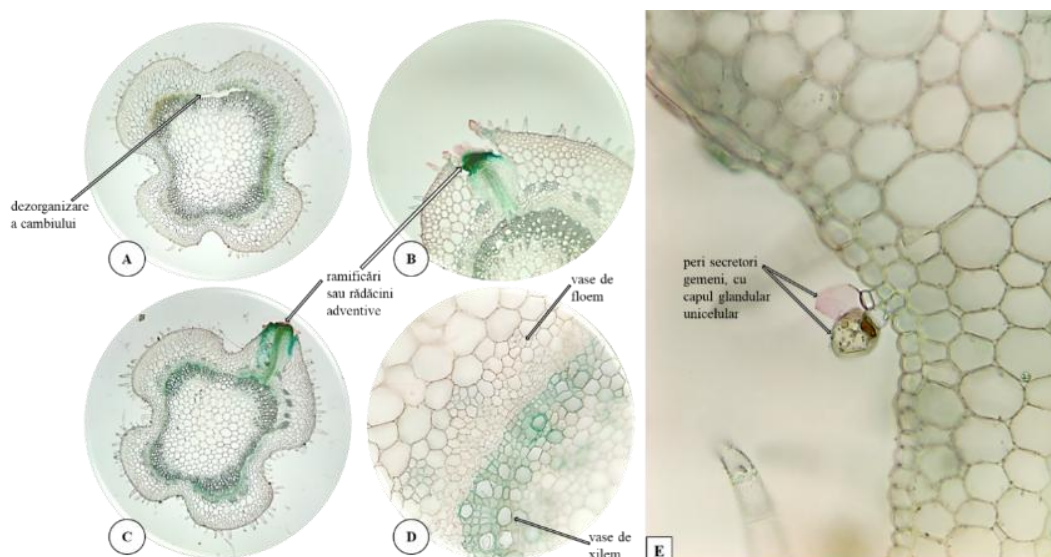


Figura 29. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din fructe de *C. autumnale* L. (5A) colectate vara

### III. În perioada de înflorire

Extractul apos din bulbi (6) colectați în perioada de înflorire a stimulat creșterea epicotilului plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău', a inhibat creșterea suprafeței foliare la toate cele trei noduri ale plantulelor din soiul 'Italiano Classico' (Figura 41), a determinat creșterea ariei stomatale pe suprafața abaxială a frunzelor plantulelor din soiul 'Italiano Classico' și pe ambele suprafețe foliare la soiul 'Aromat de Buzău', precum și creșterea densității stomatelor și scăderea densității perilor tectori pe suprafața adaxială a frunzelor plantulelor din soiul 'Italiano Classico'. Acest extract a indus în frunzele plantulelor din ambele soiuri de busuioc scăderea ratei de transfer a electronilor (Figura 42), a conținutului de CO<sub>2</sub> substomatic și a celui de flavonoide. Extractul alcoolic preparat din același material vegetal a indus scăderea ariei foliare la nodurile bazal și intermediar ale plantulelor din soiul 'Italiano Classico', acest parametru fiind stimulat de tratamentul cu extractul în discuție aplicat plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 41). Aria stomatală a scăzut, ca efect al aceluiași tratament, pe suprafața abaxială a plantulelor din soiul 'Italiano Classico' și a crescut pe ambele suprafețe foliare ale plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău'. De asemenea, extractul aplicat a indus creșterea densității perilor tectori pe suprafața adaxială la plantulele din soiul 'Aromat de Buzău' și a perilor secretori pe suprafața superioară (adaxială) a frunzelor plantulelor din soiul 'Italiano Classico'. Acest extract a indus creșterea cantității de CO<sub>2</sub> substomatic, scăderea conținutului de clorofilă a (Figura 43) și creșterea activității antioxidante (Figura 44) în frunzele plantulelor aparținând ambelor soiuri studiate, a crescut rata de transfer de electroni la plantulele din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 42)

și conținutul de clorofilă b din frunzele plantulelor din soiul ‘Italiano Classico’ (Figura 43). Putem considera că soiul ‘Aromat de Buzău’ pare a fi mai rezistent, comparativ cu ‘Italiano Classico’ la compușii alelopatici prezenți în compoziția acestui extract, specificând, în același timp faptul că ambele soiuri de busioc au prezentat anomalii de morfogeneză (Figurile 30 și 31), ca efect al aplicării tratamentelor cu extracte alcoolice și apoase preparate din bulbi de *C. autumnale* L.

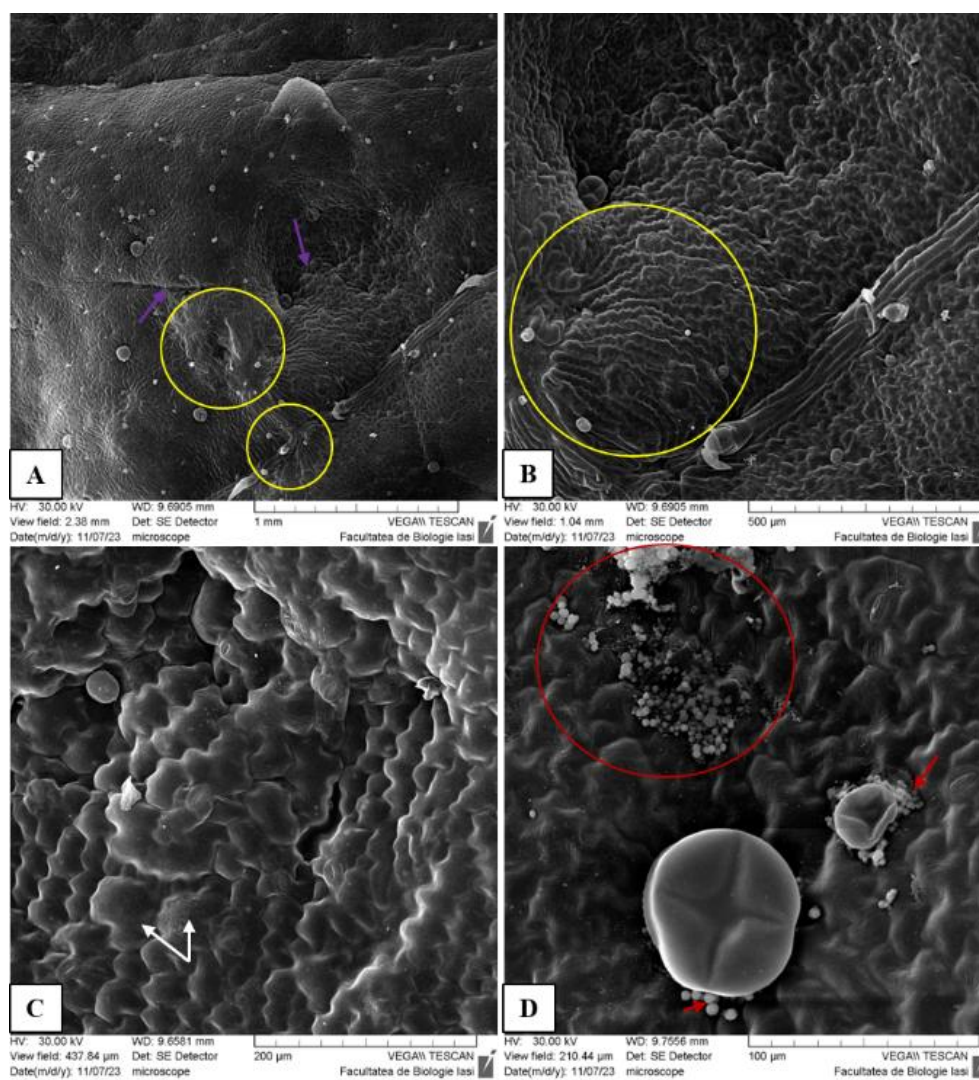


Figura 30. Suprafața foliară adaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul ‘Italiano Classico’ tratate cu extract apos din bulbi de *C. autumnale* L. (6A) colectați toamna (săgețile violet indică denivelări și pliuri ale reliefului epidermic; săgețile albe indică celule epidermice heteromorfe; săgețile roșii și cercul roșu indică formațiuni străine; cercurile galbene încadrează zone de morfogeneză)

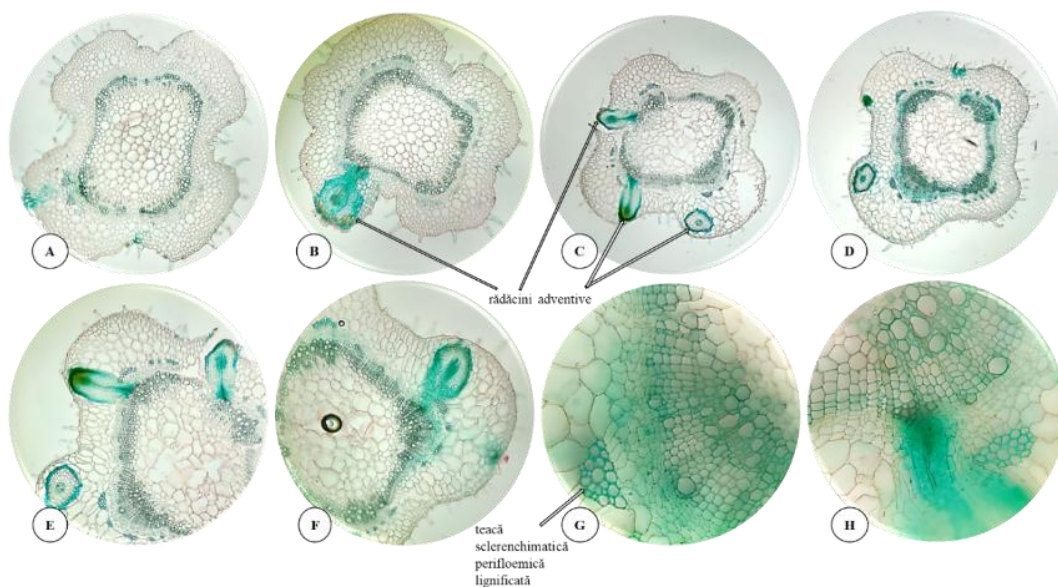


Figura 31. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din bulbi de *C. autumnale* L. (6A) colectați toamna

Extractul apos din tecile bulbilor (7) a stimulat creșterea epicotilului plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 40), a inhibat creșterea suprafeței foliare la nodurile bazal și intermediar ale plantulelor din soiul 'Italiano Classico' (Figura 41), reducând și rata de transport de electroni (Figura 42) și conținutul de polifenoli în frunzele plantelor aparținând acestei soiuri. Acest extract a indus creșterea ariei stomatelor pe suprafețele foliare abaxiale ale ambelor soiuri, scăderea conținutului de  $\text{CO}_2$  substomatic și a celui de flavonoide. La plantulele din soiul 'Aromat de Buzău' aria stomatelor a crescut și pe suprafața adaxială, iar densitatea lor a crescut pe suprafața abaxială. În mod similar, extractul alcoolic din tecile bulbilor a stimulat creșterea epicotilului plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 40) și creșterea suprafeței foliare la toate cele trei noduri ale plantulelor din soiul 'Italiano Classico' (Figura 41). Acest extract a indus variații în parametrii micromorfometrici ale suprafețelor foliare examinate, în special la plantulele din soiul 'Italiano Classico', la care densitatea stomatelor și a perilor secretori a crescut pe ambele suprafețe foliare și a determinat creșterea ratei transferului de electroni (Figura 42), a conținutului de  $\text{CO}_2$  substomatic și a activității antioxidante (Figura 44) a plantulelor din ambele soiuri, însă a indus scăderea conținutului de clorofilă a (Figura 43). Aceste extracte par a fi cele mai puțin toxice dintre extractele testate pentru plantulele test, deși ambele tipuri au indus anomalii de morfogeneză (Figurile 32, 33 și 34) și apariția perilor tectori pe suprafața foliară abaxială a plantulelor din ambele soiuri de busuioc.

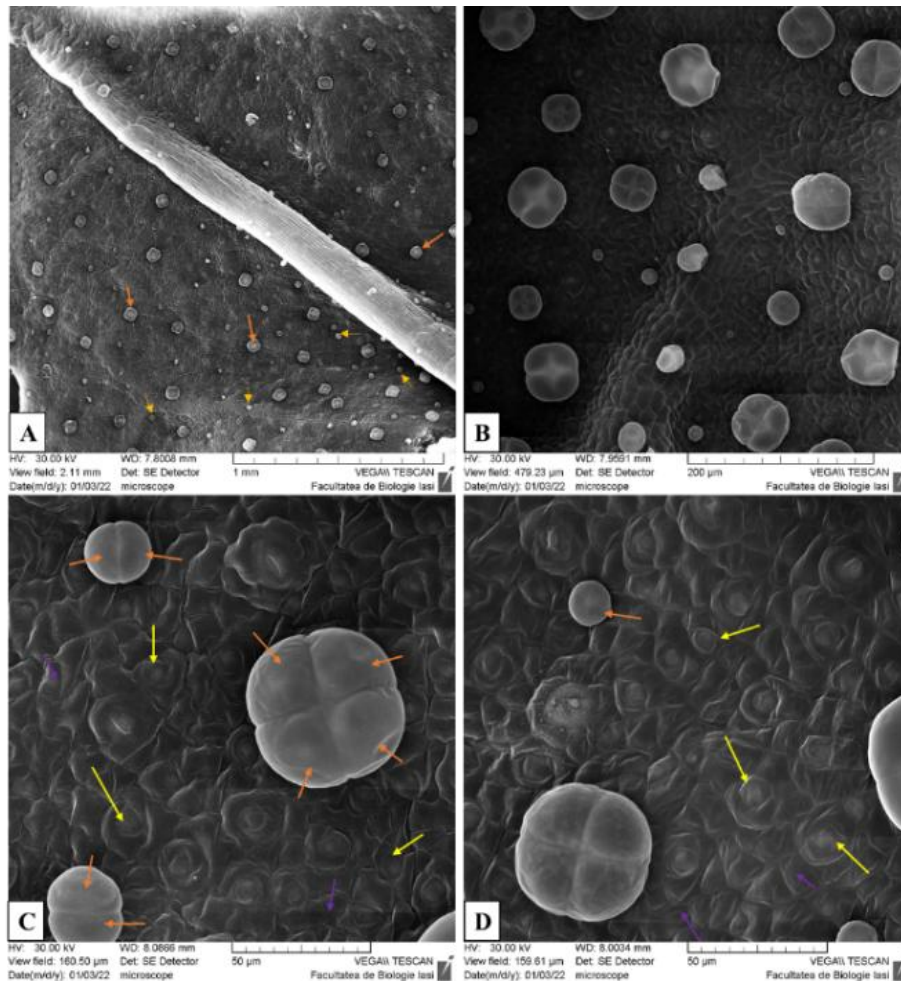


Figura 32. Suprafața foliară abaxială la plantele de *O. basilicum* L. soiul 'Italiano Classico' tratate cu extract alcoolice din tecile bulbilor de *C. autumnale* L. (7E) (săgețile portocalii indică peri glandulari cu număr diferit de celule glandulare; săgețile violet indică deshidratări ale epidermei; săgețile galbene indică stomate în proces de morfogeneză)

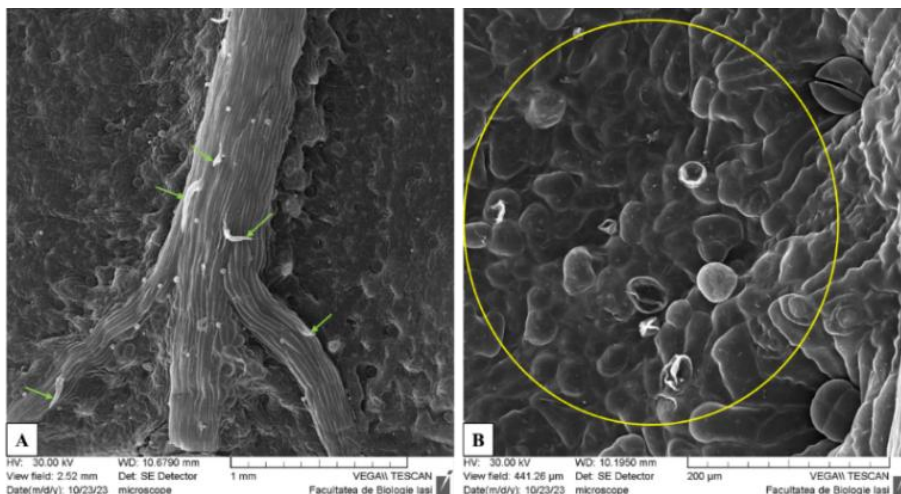


Figura 33. Suprafața foliară abaxială la plantele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din tecile bulbilor de *C. autumnale* L. (7A) (săgețile verzi indică apariția perilor tectori; cercul galben încadrează o zonă de morfogeneză)

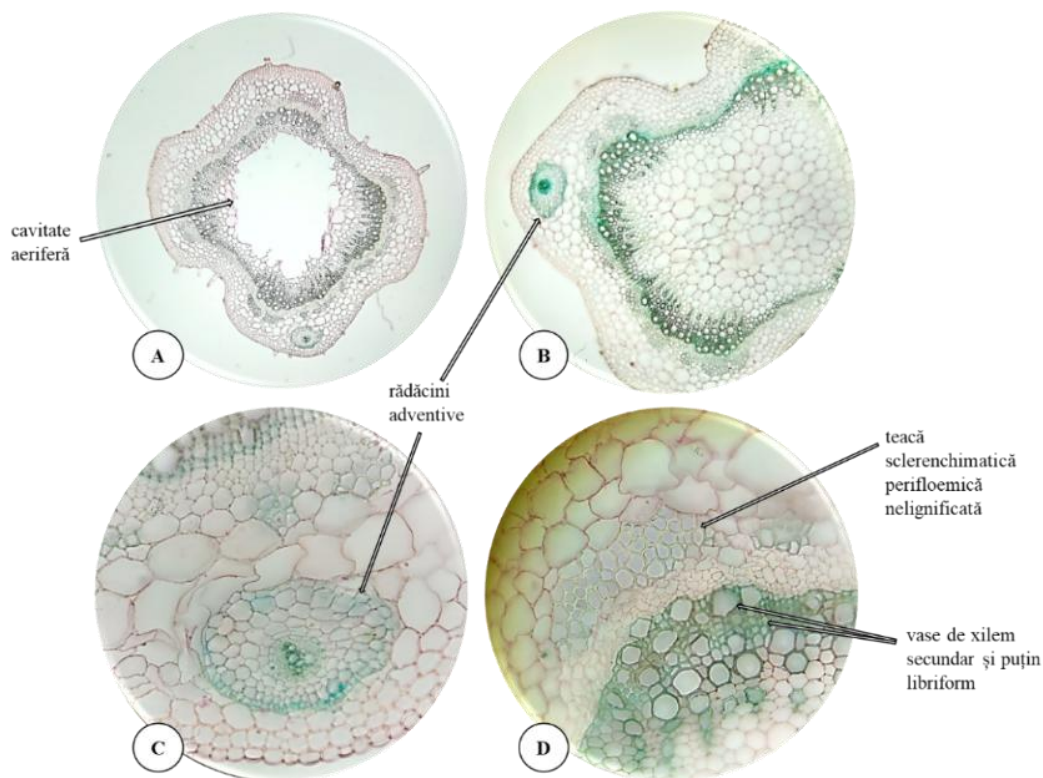


Figura 34. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din tecile bulbilor de *C. autumnale* L. (7A)

Extractul apos din flori (8) a indus creșterea epicotilului la plantulele din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 40), iar la plantulele din soiul 'Italiano Classico' a inhibat creșterea foliară la nodurile bazal și intermediar (Figura 41). La plantulele din soiul 'Italiano Classico' acest extract a indus creșterea ariei stomatelor pe suprafața abaxială și scăderea densității perilor tectori pe suprafața adaxială, scăderea conținutului de polifenoli și flavonoide și creșterea activității antioxidante (Figura 44). La plantulele din soiul 'Aromat de Buzău' extractul apos din flori de *C. autumnale* L. a determinat creșterea ariei stomatale pe ambele suprafețe foliare. La plantulele aparținând ambelor soiuri acest extract a determinat scăderea ratei de transfer de electroni (Figura 42) și a conținutului de CO<sub>2</sub> substomatic. Extractul alcoolic din flori a inhibat creșterea ariei foliare la nodul bazal al plantulelor din soiul 'Italiano Classico' și a stimulat creșterea ariei foliare la nodul intermediar al plantulelor din soiul 'Aromat de Buzău' (Figura 41), la soiul din urmă stimulând și creșterea densității stomatelor și perilor secretori pe suprafața adaxială. La plantulele din ambele soiuri de busuioc studiate acest extract a determinat creșterea ariei stomatale pe ambele suprafețe foliare, creșterea conținutului de CO<sub>2</sub> substomatic și a activității antioxidante (Figura 44), precum și scăderea conținutului de clorofilă a din frunze (Figura 43). Ambele tipuri de extracte preparate din flori au indus în plantulele tratate

anomalii ale elementelor structurale ale frunzelor (Figurile 35, 36 și 37) și epicotilelor (Figurile 38 și 39), inhibând lignificarea și accentuând asimetria prin heteromorfismul celulelor epidermice și stomatelor. Mai mult, extractul alcoolic din flori a determinat apariția în structura epicotilului a unui procambiu de tip inelar (Figura 38), ce este necaracteristic speciei *O. basilicum* L. Modificările morfo-structurale și funcționale evidențiate la plantulele test ale celor două soiuri de busuioc supuse tratamentelor cu extracte apoase și alcoolice din flori de *C. autumnale* L. pot fi considerate efecte induse de compușii cu puternic potențial alelopativ conținuți (colchicină, polifenoli și flavonoide), dozați practic în concentrații maxime în extractele aplicate.

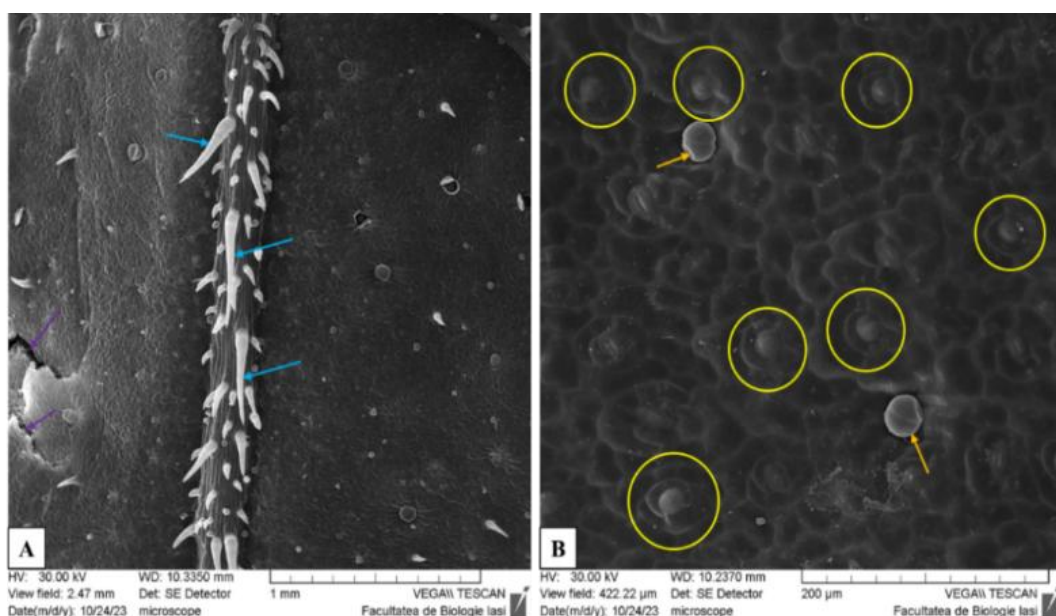


Figura 35. Suprafața foliară adaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din flori de *C. autumnale* L. (8A) (săgețile albastre indică alungirea perilor tectori; săgețile portocalii indică peri secretori cu capul secretor bicelular; cercurile galbene încadrează stomate în proces de morfogeneză)

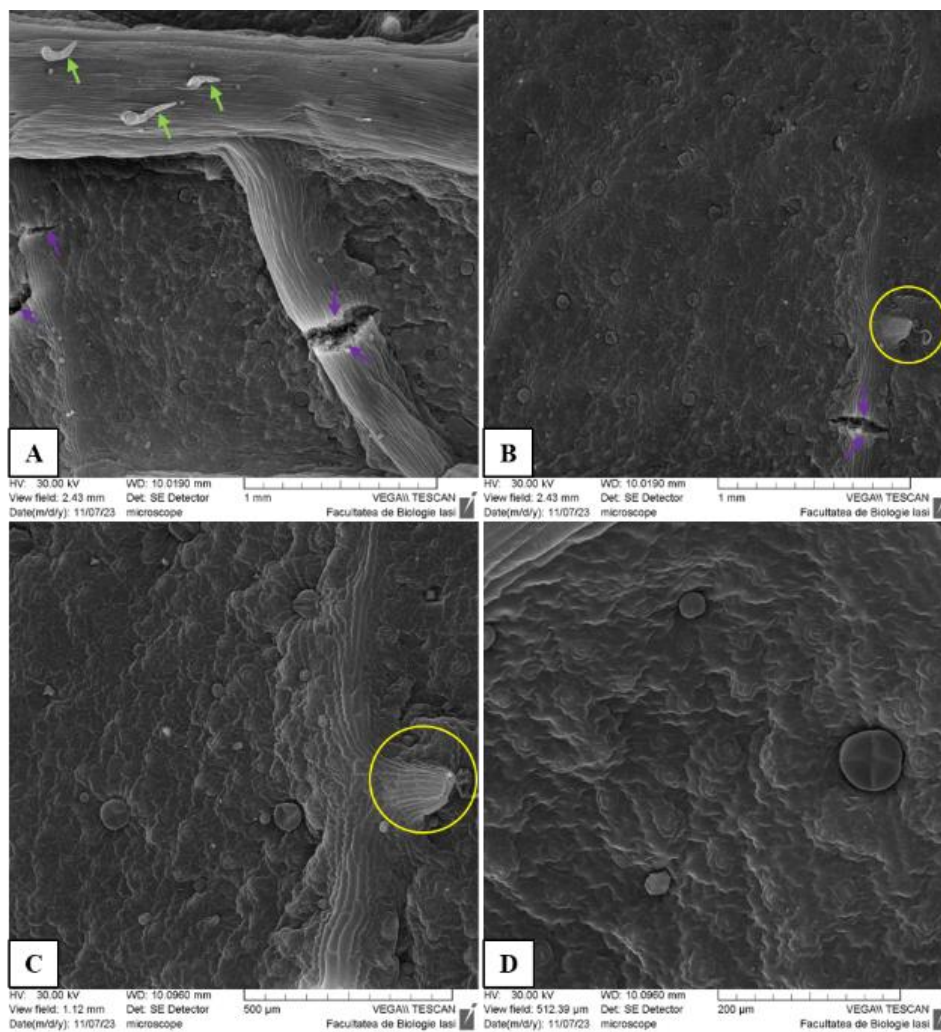


Figura 36. Suprafața foliară abaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Italiano Classico' tratate cu extract apos din flori de *C. autumnale* L. (8A) (săgețile violet indică pliuri ale epidermei; cercurile galbene indică o zonă de morfogeneză)

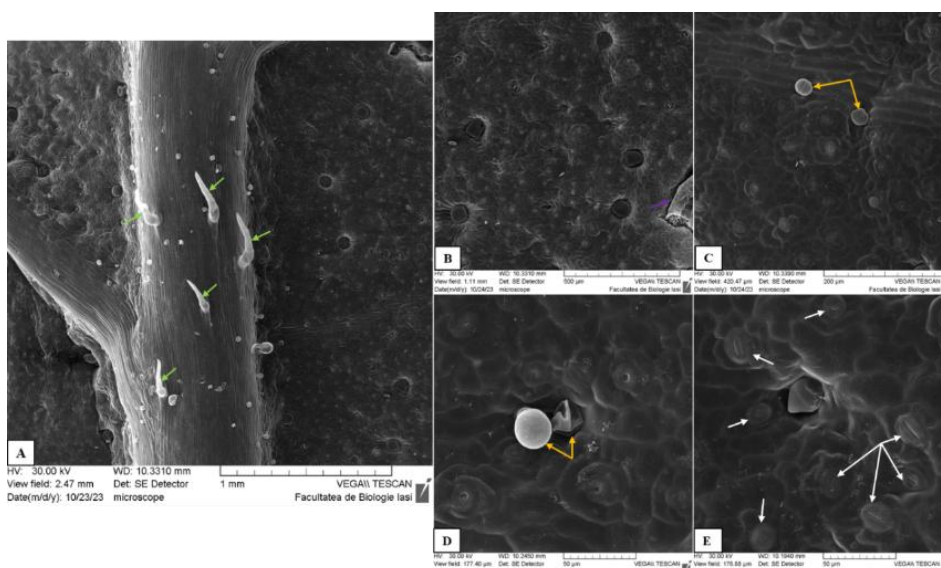


Figura 37. Suprafața foliară abaxială la plantulele de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din flori de *C. autumnale* L. (8A) (săgețile verzi indică apariția perilor tectori; săgețile portocalii indică peri secretori cu capul glandular bicelular; săgețile albe indică stomate heteromorfe)

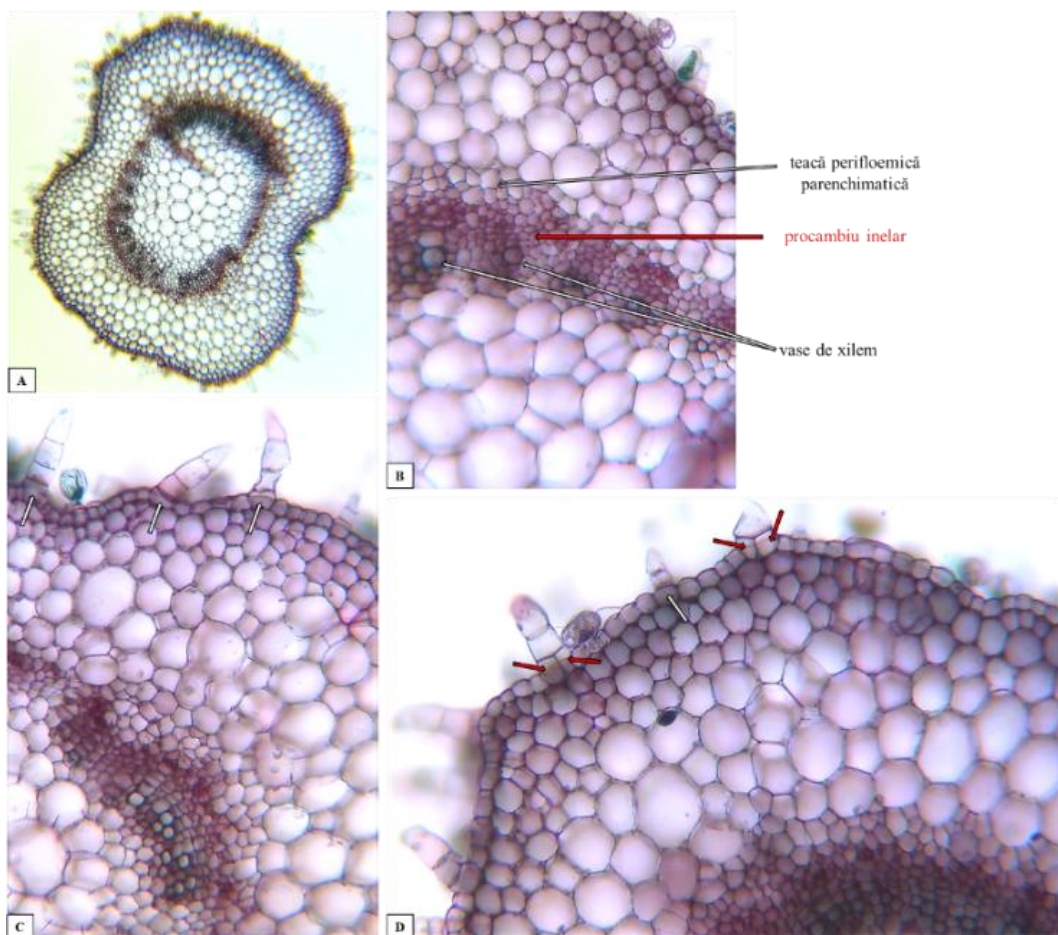


Figura 38. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Italiano Classico' tratate cu extract alcoolic din flori de *C. autumnale* L. (8E)

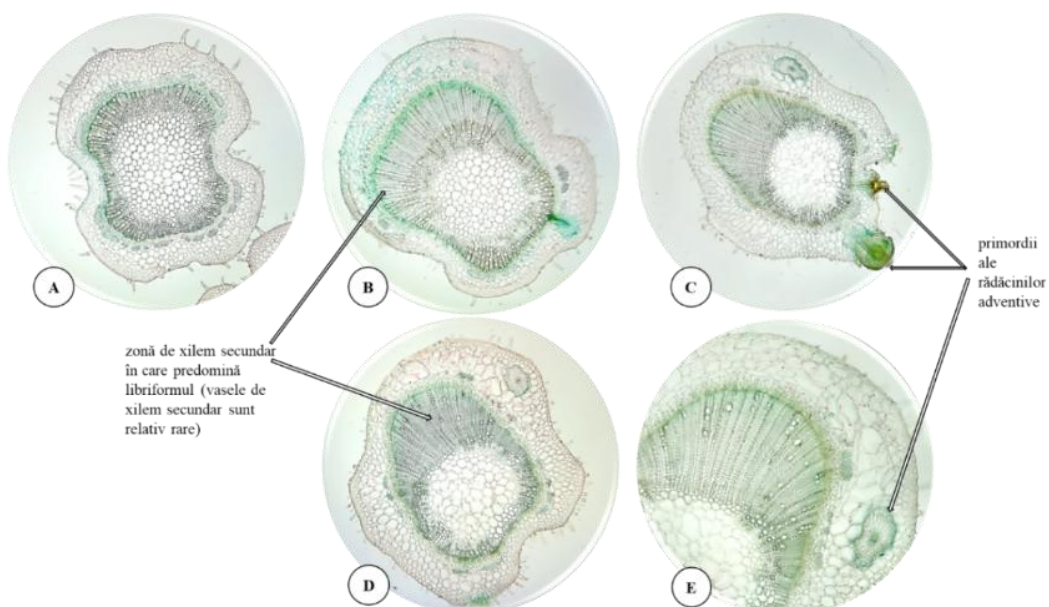


Figura 39. Anatomia epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiul 'Aromat de Buzău' tratate cu extract apos din flori de *C. autumnale* L. (8A)

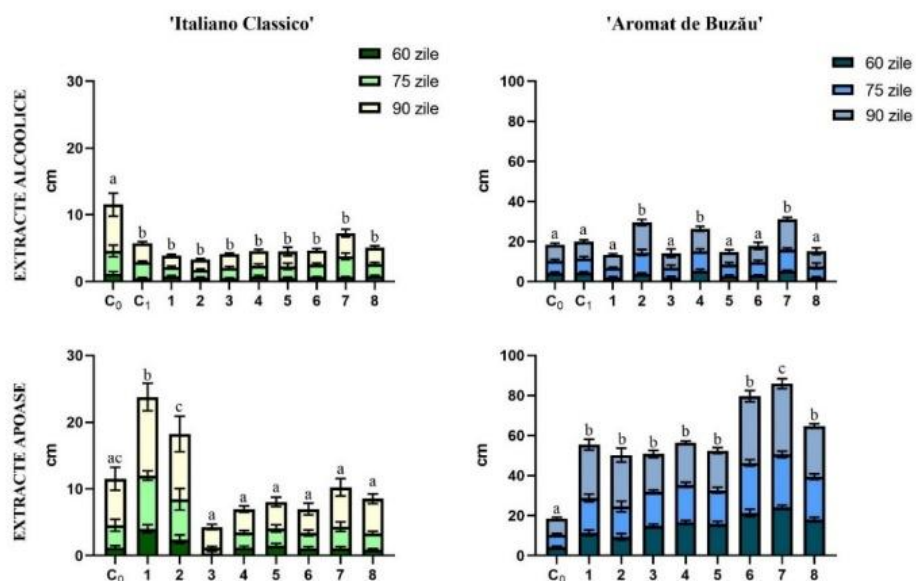


Figura 40. Înălțimea medie a epicotilului plantulelor de *O. basilicum* L. soiurile 'Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău' tratate cu extracte alcoolice și apoase de *C. autumnale* L. la 60, 75 și 90 de zile de la plantare

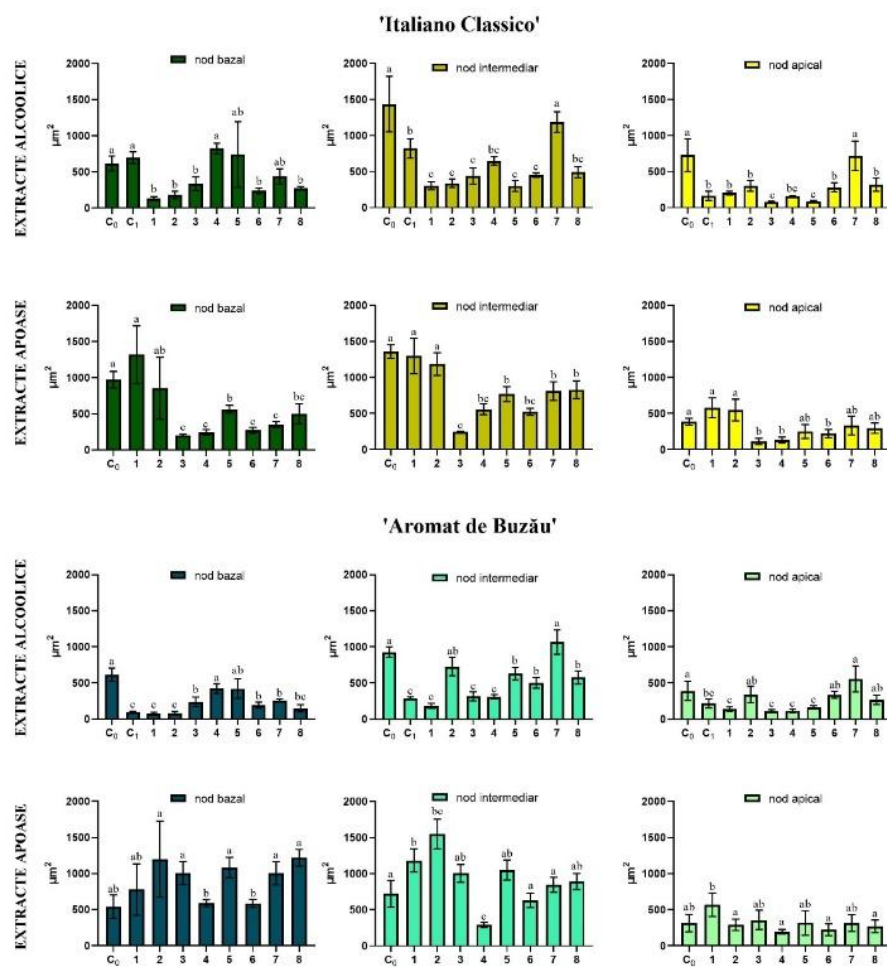
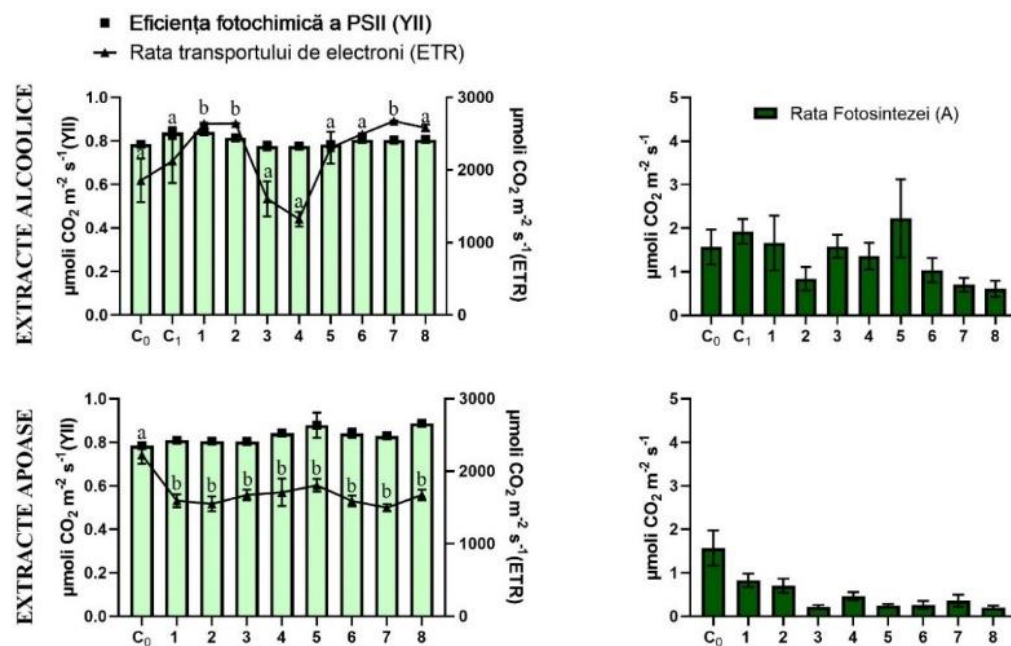


Figura 41. Aria medie a frunzelor de la nodurile plantulelor de *O. basilicum* L. soiurile 'Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău' tratate cu extracte alcoolice sau apoase de *C. autumnale* L., la 90 de zile de la plantare

## 'Italiano Classico'



## 'Aromat de Buzău'

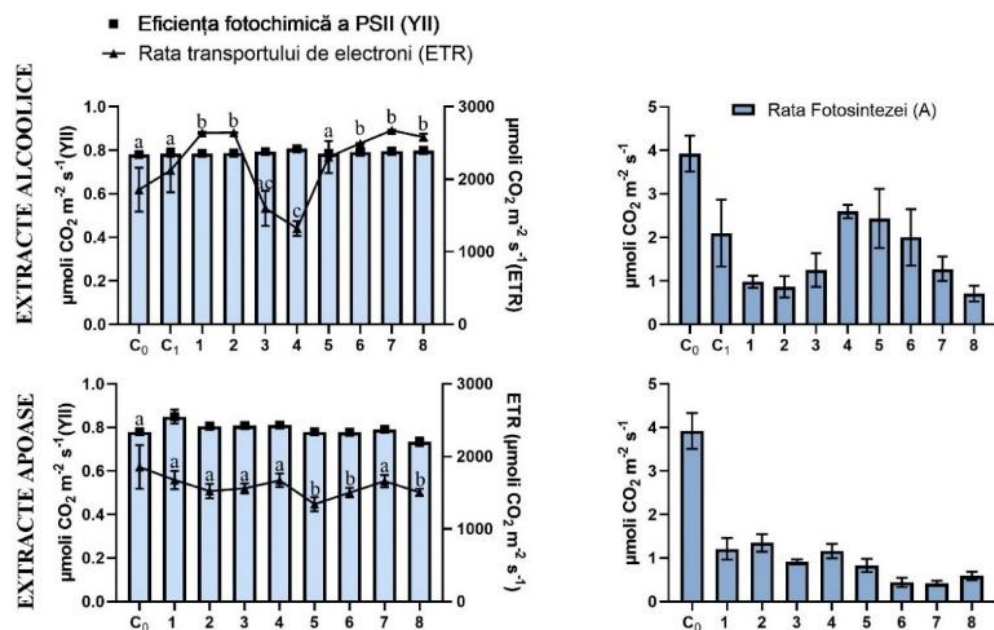


Figura 42. Indici ai procesului de fotosinteză la plantulele de *O. basilicum* L. soiurile ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’ tratate cu extracte alcoolice sau apoase de *C. autumnale* L.

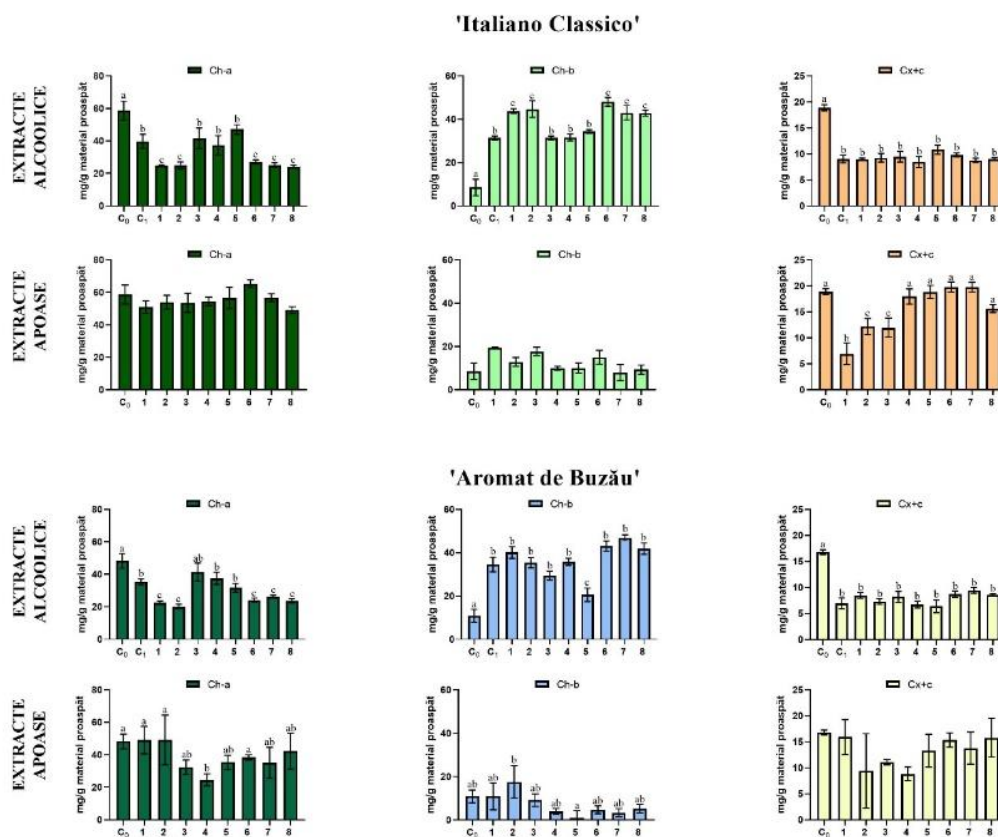


Figura 43. Variații ale conținutului de pigmenți asimilatori în frunzele plantulelor de *O. basilicum* L. soiurile 'Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău' tratate cu extracte alcoolice sau apoase de *C. autumnale* L.

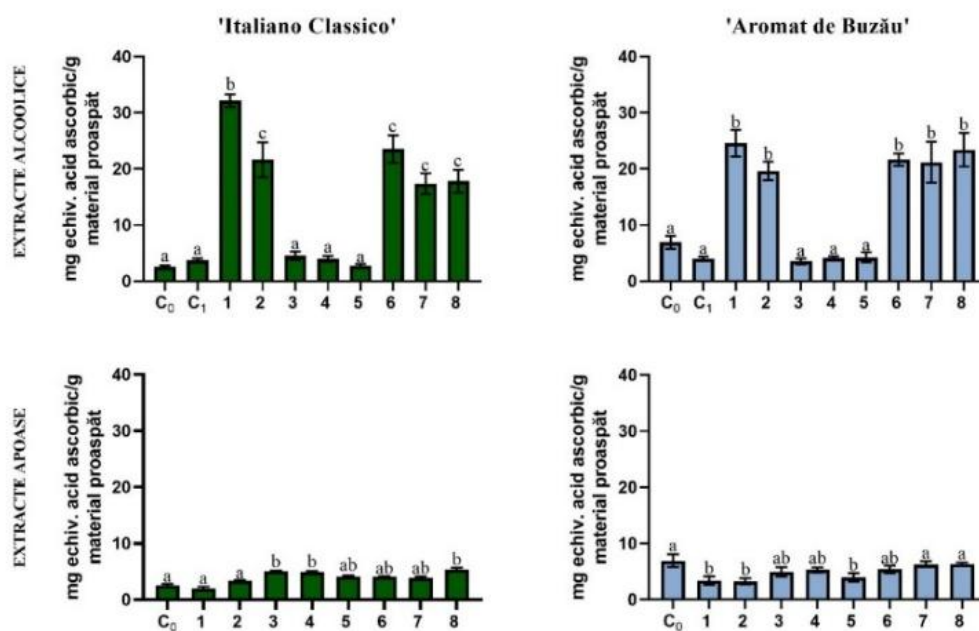


Figura 44. Activitatea antioxidantă în frunzele plantulelor de *O. basilicum* L. soiurile 'Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău', tratate cu extracte alcoolice sau apoase de *C. autumnale* L.

## Considerații finale

Testarea extractelor din organe colectate în diferite stadii ale ciclului ontogenetic ale unei specii reprezintă o abordare nouă în studiile de alelopatie care poate oferi indicii cu privire la diversele mecanisme de adaptare ale plantelor prin ajustarea căilor de eliberare, a tipurilor și concentrațiilor de metaboliților secundari. În același timp, analizele asupra variațiilor cantitative ale conținutului de metaboliți secundari cu activitate biologică în diferite organe ale speciei cu potențial alelopativ, *C. autumnale* L., în stadiile de înflorire, creștere și fructificare, oferă o perspectivă asupra mecanismelor prin care această specie își asigură supraviețuirea pe parcursul ciclului său ontogenetic.

Se poate afirma că plantele speciei *C. autumnale* L. recurg la diferite strategii de sinteză și eliberare a metaboliților secundari alelopatici prin ajustarea surselor și rezervelor în decursul ciclului ontogenetic, fiind o specie perenă, ce pot fi diferențiate astfel:

În perioada de creștere, metaboliții secundari ce se află în bulbul subteran al brândușei de toamnă prezintă efecte inhibitoare asupra creșterii preplantulelor altor specii din semințe, în acest caz, cele două soiuri de *O. basilicum* L., ‘Italiano Classico’ și ‘Aromat de Buzău’. Pe de altă parte, compușii alelopatici eliberați din organele supratere, la concentrații reduse induc efecte inhibitoare asupra creșterii preplantulelor-test, iar la concentrații mari, induc stres în preplantulele receptoare care determină grăbirea proceselor de germinație, de creștere și dezvoltare, care poate fi benefic pentru specia receptoare. Cu toate acestea, efectele compușilor alelopatici eliberați de plantele de *C. autumnale* L. asupra plantulelor ale căror meristeme au fost tratate în prealabil cu extracte ce conțin acești compuși se manifestă diferit. Compușii eliberați din organele subterane și supratere ale brândușei de toamnă pot stimula creșterea și dezvoltarea plantulelor receptoare, sau le pot inhiba, și afectează anumite procese fiziologice și biochimice, cum este rata de transfer de electroni, transpirația, conținutul de clorofilă a și activitatea antioxidantă. La nivel morfo-anatomic, acești compuși determină anomalii de morfogeneză, concretizate printr-un heteromorfism al celulelor epidermice și stomatelor în alcătuirea frunzelor și epicotilelor, sau apariția pe suprafața foliară a unor zone de morfogeneză intercalate cu zone de țesut dezvoltat și lignificarea slabă a vaselor conducătoare, anomalii ce sunt cel mai probabil determinate de acțiunea colchicinei, dar și apariția perilor tectori pe suprafața abaxială, ceea ce indică un răspuns la stresul chimic indus de tratament.

În perioada de fructificare, frunzele brândușei de toamnă produc și eliberează compuși ce induc efecte inhibitoare asupra speciilor de plante receptoare, întârziindu-le germinația și creșterea, în timp ce fructele pot avea efecte stimulative asupra germinației semințelor altor specii, efect ce se poate datora hormonilor de creștere prezenți în abundență în fructe. Efecte similare la nivel morfo-anatomic, fiziologic și biochimic ale compușilor eliberați în perioada de creștere au fost observate și după tratarea meristemelor caulinare ale plantulelor-test cu extracte din frunze și fructe.

În perioada de înflorire, organele subterane (bulbii) brândușelor de toamnă produc metaboliți secundari ce inhibă germinația și creșterea preplantulelor speciei receptoare, în mod similar celor eliberați în perioada de creștere, însă în perioada de înflorire a fost observat și efectul de întârziere a germinației semințelor altor specii. Pe de altă parte, tecile bulbilor, reprezentând rămășițele frunzelor ce și-au îndeplinit funcțiile înaintea perioadei de înflorire, produc compuși ce prezintă efecte neutre sau chiar stimulative asupra preplantulelor speciei receptoare, ceea ce se poate explica prin rolul de protecție pe care și-l mențin chiar și în subteran, învelind bulbul. Organele supratere (florile), având și cea mai mare concentrație de colchicină, prezintă efectele inhibitoare cele mai puternice asupra germinației semințelor și creșterii preplantulelor din specia-test. După tratarea meristemelor caulinare ale plantulelor-test, au fost observate efecte similare ale compușilor eliberați de către specia donatoare în perioada de creștere și fructificare.

Metaboliții secundari cu proprietăți alelopatice prezenți în organele vegetative și de reproducere ale plantelor aparținând speciei *Colchicum autumnale* L., interpretați ca factori perturbatori ce acționează cel mai probabil sinergic, induc instabilitate în procesele fiziologice și biochimice ale plantelor receptoare în funcție de natura și concentrația lor, direct influențate de etapa ciclului de ontogenetic al plantei donatoare (în cazul de față brândușa de toamnă), de stadiul de dezvoltare a plantelor speciei receptoare (în cazul de față semințe și plantule de busuioc), de organul plantei donatoare în care aceștia au fost sintetizați, precum și de calea lor de eliberare în mediu.

Rezultatele cercetărilor efectuate în cadrul acestui studiu au indicat faptul că toate organele plantelor de *C. autumnale* L. prezintă potențial alelopativ, prin acumularea de metaboliți secundari cu proprietăți alelopatice cum sunt colchicina și compușii polifenolici, care o protejează și îi oferă un avantaj în competiția interspecifică pe tot parcursul ciclului său ontogenetic.

Cele mai importante organe ale brândușei de toamnă implicate în fenomenul de alelopatie sunt organele supraterane, în special frunzele și florile, în structura cărora colchicina și fenolii se găsesc în concentrație mai mare, comparativ cu celelalte organe ale plantelor aparținând acestei specii.

Răspunsurile biologice înregistrate practic în organismele test test receptoare aparținând celor două soiuri de *Ocimum basilicum* L. ('Italiano Classico' și 'Aromat de Buzău') pe parcursul cercetării posibilelor efecte alelopatiche induse de aplicarea unor extracte vegetale (alcoolice și apoase) preparate din organe vegetative și de reproducere ale plantelor speciei donatoare (*Colchicum autumnale* L.) acoperă o paletă variată de efecte, ca de exemplu:

- Extractele vegetale alcoolice și apoase preparate din tecile bulbilor brândușei de toamnă nu au avut efecte negative asupra soiurilor de busuioc-test ci, dimpotrivă, acestea au stimulat germinația semințelor lor.

- Ambele tipuri de extracte vegetale preparate din florile brândușei de toamnă, individualizate prin conținuturile cele mai ridicate de compuși cu puternic potențial alelopativ (colchicină, polifenoli și flavonoide) dozați practic, au indus modificări biologice evidente, mai mult sau mai puțin benefice organismelor test avute în atenție (semințe și plantule din soiurile de busuioc menționate), modificări detectabile la nivel micromorfologic, structural, biochimic și funcțional.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu evidențiază natura dinamică a profilului biochimic al speciei *C. autumnale* L. de-a lungul ciclului său ontogenetic și importanța considerării acestor variații atât în cercetare, cât și în aplicațiile practice, sugerând potențiale implicații ecologice și posibile aplicații în strategiile de biocontrol al buruienilor prin optimizarea extracției colchicinei și a altor compuși bioactivi.

Acest studiu contribuie la înțelegerea complexității biochimice a speciei *C. autumnale* L. și oferă un model pentru investigarea compoziției chimice și a potențialelor aplicații ale altor plante cu proprietăți similare (alelopatiche) în strategiile de biocontrol al buruienilor prin optimizarea extracției metaboliților secundari bioactivi.

Cercetări viitoare în acest subiect vor putea contribui la adaptarea și perfecționarea metodelor de preparare a extractelor vegetale din organele vegetative și de reproducere ale plantelor de *C. autumnale* L., precum și la standardizarea modalităților lor de aplicare pe

teren ca tratamente biologice cu efecte stimulative sau protectoare în agricultura ecologică pentru plante de cultură de interes economic, în funcție de scopul practic urmărit: sporirea producțiilor agricole, horticole ori refacerea ecosistemelor naturale antropizate, aflate în declin biologic.

## Bibliografie selectivă

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012 - Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196: pp. 67–76.

Agati, G., Tattini, M., 2010 - Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist Foundation*, 186: pp. 786–793.

Alali, F., Tawaha, K., Qasaymeh, R.M. 2004 - Determination of colchicine in *Colchicum stevenii* and *C. hierosolymitanum* (Colchicaceae): comparison between two analytical methods. *Phytochemical Analysis*, 15(1): pp. 27–29.

Ali, M., Hayat, S., Ahmad, H., Ghani, M.I., Amin, B., Atif, M.J., Cheng, Z. 2019 - Priming of *Solanum melongena* L. Seeds Enhances Germination, Alters Antioxidant Enzymes, Modulates ROS, and Improves Early Seedling Growth: Indicating Aqueous Garlic Extract as Seed-Priming Bio-Stimulant for Eggplant Production. *Applied Science*, 9, 2203: pp. 1-13.

Al-Jubouri, A., Alqaisi, M. 2023 - Effect of Colchicine Concentration and Exposure Duration on the Growth and Flowering of *Petunia hybrid* L. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1213(1), 012038: pp. 1-6.

Alseekh, S., De Souza, L., Benina, M., Fernie, A. 2020 - The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 174, 112347: pp. 1-10.

Amist, N., Li, Z. R., Bai, L. Y. 2019 - Allelopathy in sustainable weeds management. *Allelopathy Journal*, 48: pp. 109–138.

Araniti, F., Costas-Gil, A., Cabeiras-Freijanes, L., Lupini, A., Sunseri, F., Reigosa, M.J., Abenavoli, M.R., Sánchez-Moreiras, A. 2018 - Rosmarinic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *PLoS ONE*, 13(12): pp. 1–26.

Archna, D. 2013 - Somatic chromosomal studies in *Ocimum basilicum* & *Ocimum sanctum* L. *International Journal of Phytomedicine*. 5: pp. 330-340.

Azeem, M., Kharl, H., Niazi, S., Ameer, N., Fayyaz, F., Huda, N., Zehra, T., Aftab, M. 2024 - An Overview Of Anti-Inflammatory, Antioxidant, Anti-Cancer, Anti-Hyperlipidemic, Neuroprotective And Muscle Relaxant Effects Of Natural Flavonoid, Apigenin; A Review. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 1, 644: pp. 1-13.

Bakhshayeshan-Agdam, H., Salehi-Lisar, S. Y. 2020 - Agronomic Crops Response and Tolerance to Allelopathic Stress. În: Hasanuzzaman M., *Agronomic Crops*. Springer, Singapore, pp. 313–348.

Boldor, O., Raianu, O., Trifu, M. 1983 - Fiziologia Plantelor. *Lucrări practice*. Editura Didactică și Pedagogică, București, pp. 233-234.

Burzo, I., Dobrescu, A., Bădulescu, L., Mihăescu, D., Bălan, L. 2005 - Fiziologia plantelor. *Substanțele utile din plante*, Elisavaros, București, pp. 136; 251-252.

Căpraru, G., Băra, I. 2007 – Cereale, pesticide, mutații – Efecte citogenetice și fiziologice induse de tratamentul cu pesticide la orz, orzoaică și secară. Editura Universității “Alexandru Ioan Cuza” Iași, pp. 52-54.

Ciniglia, C., Mastrobuoni, F., Scortichini, M., Petriccione, M. 2015 - Oxidative damage and cell-programmed death induced in *Zea mays* L. by allelochemical stress. *Ecotoxicology*, 24: pp. 926–937.

Davoodi, A., Azadbakht, M., Hosseinimehr, S.J., Emami, S., Azadbakht, M. 2021 - Phytochemical Profiles, Physicochemical Analysis, and Biological Activity of Three *Colchicum* Species. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(2), e98868: pp. 1-10.

Dayan, F.E., Howell, J., Weidenhamer, J.D. 2009 - Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. *Journal of Experimental Botany*, 60: pp. 2107–2117.

Dewitte, A., Van Laere, K., Van Huylenbroeck, J. 2012 - Use of 2n Gametes in Plant Breeding. În: Abdurakhmonov, I. (ed.), *Plant Breeding*. InTech, Rijeka, Cap. 4, pp. 59-86.

Dias, M., Pinto, D., Silva, A. 2021 - Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26 (17), 5377: pp. 1-13.

Dolenc Koce, J., Šoln, K. 2018 - Phytotoxic effects of *Fallopia japonica* and *F. × bohemica* leaves. *Phyton*, 57: pp. 47–58.

Duke, S. 2015 - Proving Allelopathy in Crop–Weed Interactions. *Weed Science*, 63(SP1): pp. 121-132.

Farooq, M., Jabran, K., Cheema, Z. A., Wahid, A., Siddique, K. H. 2011 - The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Management Science*, 67(5): pp. 493–506.

Ferreira, M., Serra, P., Casati, P. 2021 - Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia plantarum*. 173(3): pp. 736-749.

Fujii, Y., Pariasca, D., Shibuya, T., Yasuda, T., Kahn, B., Waller, G.R. 2007 - Plant-box method: a specific biosassay to evaluate allelopathy through root exudates. În: Fujii, Y., Hiradate, S. (ed.), *Allelopathy: New Concepts and Methodology*. Science Publishers, pp. 39–56.

Gao, S., Yan, Q., Chen, L., Song, Y., Li, J., Fu, C., Dong, M. 2017 - Effects of ploidy level and haplotype on variation of photosynthetic traits: Novel evidence from two *Fragaria* species. *PloS one*, 12(6), e0179899: pp. 1-10.

Ghosh, S., Jha, S. 2008 - Colchicine – an Overview for Plant Biotechnologists. În: Ramawat, K., Merillon, J. - *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg.: pp. 215-232.

Gniazdowska, A., Krasuska, U., Andrzejczak, O., Soltys, D. 2015 - Allelopathic compounds as oxidative stress agents: yes or no. În: Gupta, K.J., Igamberdiev, A.U. (ed.) *Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants*. Springer International Publishing, Suedia, pp. 155–176.

Grouh, M.S.H., Meftahizade, H., Lotfi, N., Rahimi, V., Baniasadi, B. 2011 - Doubling the chromosome number of *Salvia hains* using colchicine: Evaluation of morphological traits of recovered plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: pp. 4892–4898.

Hassan, S., Mathesius, U. 2012 - The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of experimental botany*, 63 (9): pp. 3429-3444.

Herald, T., Gadgil, P., Tilley, M. 2012 - High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: pp. 2326-2331.

Herbert, R., Kattah, A., Knagg, E. 1990 - The Biosynthesis of the phenethylisoquinoline alkaloid colchicine. Early and intermediate stages. *Tetrahedron*, 46: pp. 7119-7138.

Iannicelli, Guariniello, J. J., Tossi, V.E., Regalado, J.J., Di Ciaccio, L., van Baren, C.M., Pitta Álvarez, S.I., Escandón, A.S. 2020 - The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. *Scientia Horticulturae*, 260, Elsevier B.V., 108854: pp. 1-8.

Inderjit, Weston, L. A., Duke, S. O. 2005 - Challenges, achievements and opportunities in allelopathy research. *Journal of Plant Interactions*, 1(2), Taylor & Francis: pp. 69–81.

Jung, L. S., Winter, S., Eckstein, R. L., Kriechbaum, M., Karrer, G., Welk, E., Elsässer, M., Donath, T.W., Otte, A. 2011 - *Colchicum autumnale* L. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 13(3): pp. 227–244.

Keech, O., Carcaillet, C., Nilsson, M.C. 2005 - Adsorption of allelopathic compounds by wood-derived charcoal: the role of wood porosity. *Plant and Soil*, 272: pp. 291–300.

Khalid, M., , S., Bilal, M., Huang, D. 2019 - Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(1): pp. 211-230.

Khosla, M.K. 1995 - Study of inter-relationship, phylogeny and evolutionary tendencies in genus *Ocimum*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 55: pp. 71–83.

Kurek, J., Barczyński, P. 2016 - Colchicine Complexes with Lithium, Sodium and Potassium Salts – Spectroscopic Studies. *Croatica Chemica Acta*, 89: pp. 1-12.

Lau, J.A., Puliafico, K.P., Kopshever, J.A., Steltzer, H., Jarvis, E.P., Schwarzlander, M., Strauss, S.Y., Hufbauer, R.A. 2008 - Inference of allelopathy is complicated by effects of activated charcoal on plant growth. *New Phytologist Foundation*, 178: pp. 412–423.

Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., Li, H.B. 2014 - Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6: pp. 6020–6047.

Ma, H. J., Shin, D.H., Lee, I.J., Koh, J.C., Park, S.K., Kim, K.U. 2006 - Allelopathic potential of K21, selected as a promising allelopathic rice. *Weed Biology and Management*, John Wiley & Sons Ltd., 6(4): pp. 189–196.

Macías, F., Molinillo, J. M., Varela, R. M., Galindo, J. C. 2007 - Allelopathy - A natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63: pp. 327–348.

- Madunić, J., Madunić, I., Gajski, G., Popić, J., Garaj-Vrhovac, V. 2018 - Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer letters*, 413: pp. 11-22.
- Malichová, V., Potěsilová, H., Preininger, V., Santavý, F. 1979 - Alkaloids from leaves and flowers of *Colchicum autumnale* L. *Planta Medica*, 2: pp. 119-127.
- Mangena, P. 2021 - Germination, Morphological and Physiological Evaluation of Seedlings Pretreated with Colchicine in Soybean (*Glycine max* L). *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 18(18): pp. 111-121.
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M.A., Hafiz, I.A., Silvestri, C. 2019 - Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. *Plants. MDPI*, 8(7), 194: pp. 1-16.
- Manzoor, A., Ahmad, T., Naveed, M., Rehman, A., Bashir, M., Ahmad, R., Akhtar, N. 2023 - Assessment Of Biological Damage And Toxic Potency Of Colchicine In Gladiolus (*Gladiolus Grandiflorus*) Plants. *Agricultural Sciences Journal*, 5(2): pp. 72-92.
- Mathesius, U. 2018 - Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants*, 7: pp. 1-2.
- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. 2014 - Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19: pp. 16240 - 16265.
- Mo, Y., Heo, Y., Choi, H., Hyong, O., Choi, W. 2020 - Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. *The Plant Pathology Journal*, 36: pp. 1 - 10.
- Moroşan, I. C., Ivănescu, L. C., Olaru, Ş. M., Zamfirache, M. M. 2023 – Biological effects induced by colchicine in *Ocimum basilicum* L. *Italus Hortus*, 30: pp. 17-36.
- Moroşan, I.C., Ivănescu, L. C., Mihăşan, M., Olaru, Ştefan M., Zamfirache, M.-M. 2022 - Biological effects of some *Colchicum autumnale* L. extracts on tissue development of two varieties of *Ocimum basilicum* L. *Advances in Horticultural Science*, 36(4): pp. 283–292.
- Mostafa, G., Alhamd, M. 2016 - Detection and Evaluation the Tetraploid Plants of *Celosia argentea* Induced by Colchicines. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 10: pp. 110–115.
- Mukherjee, M., Datta, A.K., Maiti, G.G. 2005 - Chromosome number variation in *Ocimum basilicum* L. *Cytologia* 70: pp. 455–458.
- Mushtaq, Z., Sadeer, N., Hussain, M., , M., Alsagaby, S., Imran, M., Mumtaz, T., Umar, M., Tauseef, A., Abdulmonem, A., Tufail, T., Jbawi, E., Mahomoodally, M. 2023 - Therapeutical properties of apigenin: a review on the experimental evidence and basic mechanisms. *International Journal of Food Properties*, 26: pp. 1914 - 1939.
- Niazian, M., Nalousi, A. 2020 - Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142(3): pp. 447–469.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M., Moghadam, M. 2010 - Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production*, 4(2): pp. 87-98.

Paton, A., Putievsky, E. 1996 - Taxonomic problems and cytotoxic relationships between and within varieties of *Ocimum basilicum* and related species (Labiatae). Kew Bulletin, 51: pp. 509–524.

Paul, P., Halder, M., Jha, S. 2013 - Alkaloids derived from tyrosine: Penethyloquinoline (autumnaline, colchicine). În: Ramawat, K.G., Merillon, J.M., Henry, M. (ed.), Handbook of Natural Products- Phytochemistry, Botany, Metabolism. Springer Berlin Heidelberg, pp. 461–478.

Pollastri, S., Tattini, M., 2011. Flavonols: old compounds for old roles. Annals of Botany, 108: pp. 1225–1233.

Pushpangadan, P., Bradu, B.L. 1995 - Basil. În: Chadha, K.L., Gupta, R. Advances in horticulture Vol. 11—Medicinal and aromatic plants. Malhotra Publishing House, New Delhi, India, pp. 627–657.

Righini, S., Rodriguez, E., Berosich, C., Grotewold, E., Casati, P., Ferreyra, M. 2018 - Apigenin produced by maize flavone synthase I and II protects plants against UV-B-induced damage. Plant, cell & environment, 42 (2): pp. 495-508.

Rocchetti, G., Senizza, B., Zengin, G., Okur, M. A., Montesano, D., Yildiztugay, E., Lobine, D., Mahomoodally, M. F., Lucini, L. 2019 - Chemical profiling and biological properties of extracts from different parts of *Colchicum szovitsii* subsp. *Szovitsii*. Antioxidants, 8(12), 632: pp. 1-14.

Sadhukhan, R., Ganguly, A., Singh, P.K., Sarkar, P.K. 2014 - Study of Induced Polyploidy in African Marigold (*Tagetes crecta* L.). Environment & Ecology, 32(4): pp. 1219—1222.

Shah, A., Smith, D. 2020 - Flavonoids in Agriculture: Chemistry and Roles in, Biotic and Abiotic Stress Responses, and Microbial Associations. Agronomy, 10, 1209: pp. 1-18.

Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D., Hasanuzzaman, M. 2022 - Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. Plants, 11(22), 3158: pp. 1-19.

Singh, N. B. Sunaina, D. 2014 - Allelopathic Stress Produced by Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.). Journal Of Stress Physiology And Biochemistry, 10: pp. 5-14.

Šoln, K., Klemenčič, M., Dolenc Koce, J. 2022 - Plant cell responses to allelopathy: from oxidative stress to programmed cell death. Protoplasma, 259(5): pp. 1111–1124.

Truță, E., Zamfirache, M-M. 2013 – Preliminary cytogenetical investigation in two common basil varieties. Analele Științifice ale Universității “Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, Tomul XIV: pp. 29-30.

Tucker Serniak, L. 2016 - Comparison of the allelopathic effects and uptake of *Fallopia japonica* phytochemicals by *Raphanus sativus*. Weed Research, 56(2): pp. 97–101.

Udofia, E., Daudu, O., Isong, A., Odeyemi, F., Adeboye, S., Adeshina, D., Osisami, O., Joseph, R. 2024 - The Effects of Colchicine on the Mitotic Behaviour of Selected Indigenous Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Accession. Badeggi Journal Of Agricultural Research And Environment, 6(2): pp. 80-88.

Vicente, M., Plasencia, J. 2011 - Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. Journal of Experimental Botany, 62(10): pp. 3321-3338.

Wani, A.B., Chadar, H., Wani, A.H., Singh, S., Upadhyay, N. 2017 - Salicylic acid to decrease plant stress. *Environmental Chemistry Letters*, 15: pp. 101–123.

Wu, F. Z., Pan, K., Ma, F. M., Wang, X. D. 2004 - Effects of cinnamic acid on photosynthesis and cell ultrastructure of cucumber seedlings. *Acta Horticulturae Sinica*, 31: pp. 183-188.

Wurst, S., Vender, V., Rillig, M.C. 2010 - Testing for allelopathic effects in plant competition: does activated carbon disrupt plant symbioses?. *Plant Ecology*, 211(1): pp. 19–26.

Yan, Z., Wang, D., Cui, H., Zhang, D., Sun, Y., Jin, H., Li, X., Yang, X., Guo, H., He, X., Pan, L., Ren, X., Guo, K., Qin, B. 2016 - Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 248: pp. 1-9.

Yoneda, Y., Hayashi, Y., Shiroishi, M., Hayashi, S. 1984 - High Performance Liquid Chromatographic Determination of Colchicine-alkaloid from the Tissues and Biological Fluid of Bovine Poisoned by the Corm of Autumn Crocus (*Colchicum autumnale* L.). *Journal of The Food Hygienic Society of Japan (shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 25: pp. 1-21.

Yu, J. H., Zhang, Y., Niu, C. X., Li, J. J. 2006 - Effects of two kinds of allelochemicals on photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of *Solanum melongena* L. seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17: pp. 1629-1632.

Yu, J. Q., Ye, S. F., Zhang, M. F., Hu, W. H. 2003 - Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: pp. 129-139.

Zeinullina, A., Zargar, M., Dyussibayeva, E., Orazov, A., Zhirnova, I., Yessenbekova, G., Zotova, L., Rysbekova, A., Hu, Y. 2023 - Agro-Morphological Traits and Molecular Diversity of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) Affected by Various Colchicine Treatments. *Agronomy*, 13(12), 2973: pp. 1-18.

Zhuo, L., Zhu, F., Jin, D., Wu, Y., Wang, S. 2021 - Seed Germination and Seedling Growth of *Dendrocalamus brandisii* in vitro, and the Inhibitory Mechanism of Colchicine. *Frontiers in Plant Science*, 12, 784581: pp. 1-12.