

UNIVERSITATEA DIN PITEȘTI

**STUDIUL ECOLOGIC, COROLOGIC ȘI FITOSOCIOLOGIC AL SPECIEI RELICTE
LIGULARIA SIBIRICA (L.) CASS.**

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Alexandru Gabriel MARINESCU

Doctorand:

Andreea Natalia MATEI

PITEȘTI

2018

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE

CAPITOLUL 1 ISTORICUL CERCETĂRIILOR PRIVIND GENUL *LIGULARIA*

INTRODUCERE

1.1. MATERIALE ȘI METODE

1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

1.2.1. Genul *Ligularia*

1.2.1.1. *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

1.2.1.2. *Ligularia glauca* (L.) Hoffm.

1.2.1.3. *Ligularia bucovinensis* (L.) Nakai

1.2.1.4. *Ligularia carpathica* (Schott, Nyman et Kotschy) Pojark.

1.2.2. Istoricul cercetărilor pe plan mondial (Tabelul 2)

1.2.3. Istoricul cercetărilor în România (Tabelul 3)

CAPITOLUL 2 CARACTERIZAREA FIZICO-GEOGRAFICĂ, GEOLOGICĂ ȘI PEDOCLIMATICĂ A TERITORIILOR CERCETATE

INTRODUCERE

2.1. CARACTERIZAREA FIZICO-GEOGRAFICĂ, GEOLOGICĂ, PEDOLOGICĂ ȘI HIDROGRAFICĂ A SITURILOR

2.1.1. Cheile Brustureului

2.1.2. Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare

2.1.3. Mlaștina Hărman

2.1.4. Tinovul Apa Roșie

2.2. CARACTERIZAREA CLIMATICĂ A SITURILOR

2.2.1. Materiale și metode

2.2.2. Rezultate și discuții

2.2.2.1. Cheile Brustureului

2.2.2.2. Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare

2.2.2.3. Mlaștina Hărman

2.2.2.4. Tinovul Apa Roșie

CAPITOLUL 3 STRUCTURA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A FLOREI ÎNȘOȚITOARE SPECIEI RELICTE *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS.

3.1. MATERIALE ȘI METODE DE ANALIZĂ A FLOREI ȘI A COMUNITĂȚILOR VEGETALE

3.1.1. Modul de realizare a conspectului floristic

3.1.2. Metodologie de lucru pentru analiza calitativă și cantitativă a florei însoțitoare a speciei relict *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.2.1. Conspectul floristic

3.2.2. Analiza calitativă și cantitativă a florei însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

3.2.2.1. Cheile Brustureului

3.2.2.1.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european

3.2.2.1.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat

- 3.2.2.1.3. Analiza bioformelor
- 3.2.2.1.4. Analiza elementelor floristice
- 3.2.2.1.5. Analiza ecologică a cormofitelor
- 3.2.2.1.6. Analiza cariologică
- 3.2.2.2. Cheile Zănoagei, Scropoasa, Șapte Izvoare
 - 3.2.2.2.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european
 - 3.2.2.2.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat
 - 3.2.2.2.3. Analiza bioformelor
 - 3.2.2.2.4. Analiza elementelor floristice
 - 3.2.2.2.5. Analiza ecologică a cormofitelor
 - 3.2.2.2.6. Analiza cariologică
- 3.2.2.3. Mlaștina Hărman
 - 3.2.2.3.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european
 - 3.2.2.3.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat
 - 3.2.2.3.3. Analiza bioformelor
 - 3.2.2.3.4. Analiza elementelor floristice
 - 3.2.2.3.5. Analiza ecologică a cormofitelor
 - 3.2.2.3.6. Analiza cariologică
- 3.2.2.4. Tinovul Apa Roșie
 - 3.2.2.4.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european
 - 3.2.2.4.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat
 - 3.2.2.4.3. Analiza bioformelor
 - 3.2.2.4.4. Analiza elementelor floristice
 - 3.2.2.4.5. Analiza ecologică a cormofitelor
 - 3.2.2.4.6. Analiza cariologică
- 3.2.2.5. Analiza calitativă și cantitativă a florei însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica* (L.) Cass. în cele patru situri cercetate
 - 3.2.2.5.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european
 - 3.2.2.5.2. Analiza taxonomică a florei însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica* (L.) Cass. în siturile cercetate
 - 3.2.2.5.3. Analiza bioformelor în siturile cercetate
 - 3.2.2.5.4. Analiza elementelor floristice în siturile cercetate
 - 3.2.2.5.5. Analiza ecologică a cormofitelor din siturile cercetate
 - 3.2.2.5.6. Analiza cariologică a speciilor floristice din siturile cercetate
- 3.2.3. Încadrarea cenotică a speciei *Ligularia sibirica* (L.) Cass. în siturile cercetate
 - 3.2.3.1. Conspectul cenotaxonomic al grupărilor vegetale integratoare
 - 3.2.3.2. Descrierea și analiza vegetației integratoare a speciei luate în studiu din teritoriile cercetate
 - 3.2.3.2.1. *Cladietum marisci* Allorge 1922 ex Zobrist 1953
 - 3.2.3.2.2. *Caricetum rostratae* Rübel 1912
 - 3.2.3.2.3. *Carici remotae* – *Calthetum laetae* Coldea (1972) 1978 *ligularietosum sibiricae* Alexiu et Stancu 2003

- 3.2.3.2.4. *Junco - Caricetum nigrae* R. Tüxen (1937) 1952
- 3.2.3.2.5. *Orchido - Schoenetum nigricantis* Oberd. 1957
- 3.2.3.2.6. *Ligulario sibiricae - Ribetum petraei* Neblea et Alexiu 2003
- 3.2.3.2.7. *Cirsio waldsteinii – Heracleetum transsilvanici* Pawl. et Walas 1949
- 3.2.3.2.8. *Petasito-Cicerbicetum* R.Tüxen 1973
- 3.2.3.2.9. *Asperulo capitatae – Seslerietum rigidae* (Zólyomi1939) Coldea 1991
- 3.2.3.2.10. *Junco effusi-Molinietum caeruleae* Preising 1951
- 3.2.3.2.11. *Lysimachio vulgaris – Filipenduletum ulmariae* Balátová-Tuláčková 1978
- 3.2.3.3. Caracterizarea habitatelor din teritoriile studiate
 - 3.2.3.3.1. Habitatul 3220 Vegetația herbacee de pe malurile râurilor montane
 - 3.2.3.3.2. Habitatul 6410 Pajiști cu *Molinia* pe soluri calcaroase, turboase sau argiloase (*Molinion caeruleae*)
 - 3.2.3.3.3. Habitatul 6430 Comunități de lizieră cu ierburi înalte higrofile de la câmpie până în etajele montan și alpin
 - 3.2.3.3.4. Habitatul 7210* Mlaștini calcaroase cu *Cladium mariscus* și specii de *Caricion davallianae*
 - 3.2.3.3.5. Habitatul 7230 Mlaștini alcaline

CAPITOLUL 4 ASPECTE PRIVIND STRUCTURA POPULAȚIILOR SPECIEI RELICTE *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS.

INTRODUCERE

4.1. MATERIALE ȘI METODE

- 4.1.1. Specii de studiu
- 4.1.2. Analiza solului
- 4.1.3. Populațiile de studiu
- 4.1.4. Colectarea datelor morfologice

4.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

- 4.2.1. Dimensiunea și performanța populației
- 4.2.2. Relația dintre datele privind vegetația și conținutul de nutrienți din sol
- 4.2.3. Efectele variabilelor de mediu asupra unui set de măsurători morfologice
- 4.2.4. Considerații privind conservarea

CAPITOLUL 5 COMPOZIȚIA CHIMICĂ, ANTIOXIDANTĂ ȘI ACTIVITATEA CITOGENETICĂ A EXTRACTELOR OBȚINUTE DIN RĂDĂCINILE ȘI RIZOMII DE *LIGULARIA SIBIRICA* (L.). CASS.

INTRODUCERE

5.1. MATERIALE ȘI METODE

- 5.1.1. Compoziția chimică, antioxidantă și activitatea citogenetică a extractelor de *Ligularia sibirica*
- 5.1.2. Material vegetal
- 5.1.3. Reactivi și substanțe chimice

- 5.1.4. Proceduri de extracție
 - 5.1.4.1. *Evaluarea compoziției chimice a extractelor de rizom și rădăcini prin analiza FT-MIR*
 - 5.1.4.2. *Compuși fenolici totali – metodă de analiză*
 - 5.1.4.3. *Conținutul total de flavonoizi – analiză*
 - 5.1.4.4. *Determinarea activității antioxidante – metodă de analiză*
 - 5.1.4.4.1. Activitatea antioxidantă DPPH
 - 5.1.4.4.2. Testul TEAC (Capacitatea echivalentă antioxidantă Trolox)
 - 5.1.4.5. *Evaluarea efectelor citogenetice ale extractului de etanol de L. sibirica – metodă de analiză*

5.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

- 5.2.1. Evaluarea compoziției chimice a extractelor prin metoda FT-MIR
- 5.2.2. Determinarea activității antioxidante
- 5.2.3. Evaluarea efectelor citogenetice ale extractului etanolic de *Ligularia sibirica*

CAPITOLUL 6 TOLERANȚA LA STRES A SPECIEI RELICTE *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS.: RĂSPUNSUL LA CONDIȚIILE DE SALINITATE ȘI SECETĂ

INTRODUCERE

6.1. MATERIALE ȘI METODE

- 6.1.1. Materialul genetic luat în studiu
- 6.1.2. Analiza solului
- 6.1.3. Procentul de apă conținut
- 6.1.4. Determinarea conținutului în ioni la nivelul frunzelor și al rădăcinilor
- 6.1.5. Cuantificarea osmoliților
- 6.1.6. Malondiladehida (MDA – un biomarker al stresului oxidativ)
- 6.1.7. Antioxidanți non-enzimatici
- 6.1.8. Cuantificarea pigmentilor fotosintetici
- 6.1.9. Analiza statistică

6.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

- 6.2.2. Markerii morfologici și biochimici ai stresului salin pentru specia *Ligularia sibirica* (L.) Cass..Determinarea activității antioxidante
 - 6.2.2.1. Analiza solului
 - 6.2.2.2. Procentul de apă conținut
 - 6.2.2.3. Determinarea conținutului în ioni la nivelul frunzelor și al rădăcinilor (Anexa 7)
 - 6.2.2.4. Cuantificarea osmoliților
 - 6.2.2.5. Malondiladehidă (MDA – un biomarker al stresului oxidativ)
 - 6.2.2.6. Antioxidanți non-enzimatici
 - 6.2.2.7. Cuantificarea pigmentilor fotosintetici (ANEXA 8)
- 6.2.3. Markerii biochimici ai stresului hidric pentru specia *Ligularia sibirica* (L.) Cass.
 - 6.2.3.1. Procentul de apă conținut
 - 6.2.3.2. Determinarea conținutului în ioni la nivelul frunzelor și al rădăcinilor (ANEXA 7)
 - 6.2.3.3. Cuantificarea osmoliților
 - 6.2.3.4. Malondiladehida (MDA – un biomarker al stresului oxidativ)
 - 6.2.3.5. Antioxidanți non-enzimatici

6.2.3.6.Cuantificarea pigmentilor fotosintetici (ANEXA 8)

CAPITOLUL 7 MONITORIZAREA STĂRII DE CONSERVARE A SPECIEI *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS.

7. INTRODUCERE

7.1. MATERIALE ȘI METODE

7.1.2. Descrierea speciei investigate

7.1.3. Descrierea condițiilor climatice și pedologice ale siturilor luate în studiu

7.1.4. Metoda de analiză a populațiilor

7.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

7.2.2. Descrierea populațiilor cercetate în funcție de caracterelor morfologice ale speciei

Ligularia sibirica din fiecare sit

7.2.2.1.Cheile Zănoagei

7.2.2.2.Mlaștina Hărman

7.2.2.3.Tinovul Apa Roșie

CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

În acest moment la nivel mondial, european și național numeroase specii sunt considerate a fi periclitate, dar multe alte specii au încă un statut necunoscut, o mare parte dintre acestea fiind afectate de schimbările produse la nivelul habitatului. Convenția care protejează speciile rare printre care sunt incluse și cele endemice sau relictate la nivelul Uniunii Europene este Directiva Habitate prin Anexa II (Brînzan *et al.*, 2013).

Specia relictă *Ligularia sibirica* (L.) Cass a migrat de-a lungul perioadelor glaciare din Asia până în Europa în Preboreal, unde a găsit condițiile necesare de existență până în prezent (Pop, 1960). În Europa relictul glaciar se află pe teritoriul a 12 state, iar conform rețelei Natura 2000 pe teritoriul României se află într-unul dintre cele mai bune stadii de conservare.

Pierderea și degradarea calității habitatelor reprezintă cea mai mare amenințare a populațiilor de specii (Vitousek *et al.* 1997; Hobbs *et Yates* 2003; Aguilar *et al.* 2006; Fischer *et Lindenmayer* 2007; Brook *et al.*, 2008). Influențele de ordin antropogen contribuie și ele la degradarea habitatelor pe de o parte, astfel prin intensificarea agriculturii dar și prin neacordarea unei atenții corespunzătoare zonelor folosite pentru pășunat, habitatele se pot deteriora concomitent cu populațiile integratoare. În cadrul populațiilor, aceste influențe antropogene sunt corelate cu factorii pedo-climatici, care pot duce la un grad crescut de competiție interspecifică precum și deteriorări de ordin genetic. Astfel, de cele mai multe ori populațiile speciilor rare sunt cele mai afectate, iar pe o perioadă îndelungată de timp putem vorbi de extincția speciei (Brînzan *et al.*, 2013).

Relictul glaciar *Ligularia sibirica* (L.) Cass. ce aparține familiei *Asteraceae*, datează din perioada tardiglaciară – timpurie postglaciară, aceasta a migrat în perioadele glaciațiunilor din Asia până în Europa, unde a găsit condiții prielnice de existență, urmărind zonele umede din depresiuni, lunci, tinoave, pajiști și locuri mlăștinoase din bioregiunile alpină, continentală, boreală și mediteraneană. În ceea ce privește condițiile ecologice, *Ligularia sibirica* (L.) Cass. preferă locurile însorite pentru a înflori și solurile organice umede. În România existența taxonului din perioada tardiglaciară până în prezent a fost demonstrată în urma cercetărilor efectuate pentru determinarea vârstei würmiene în mlaștinile eutrofe din Rezervația Naturală Fânețele seculare Ponoare (Stoicovici, 1982).

Activitățile precum pășunatul necontrolat și lucrările de drenare efectuate în exces sunt cauzele principale care pot determina dispariția speciei prin distrugerea habitatului (Pop, 1960).

Convenția de la Berna protejează specia relictă *Ligularia sibirica* (L.) Cass. prin Anexa I, strictly protected flora species (Bern treaty number 104). În completare, IUCN încadrează specia ca Data Deficient (DD) (Bilz, 2011). Specia de importanță comunitară este protejată de Directiva Habitate prin Anexele IIb și IVb, OUG 57/2007 (Law 49/2011). *Carpathian Red List of Forest Habitats and Species* încadrează specia studiată în categoria near threatened (NT) (Kadlečík, 2014).

Începând cu Darwin, istoria evoluției fitopopulațiilor și interpretarea filogenetică a relațiilor dintre organisme, a servit la elucidarea sistemului natural (Andersson-Kottö *et Gairdner*, 1931; Mettler *et Greg*, 1974; Onete, 2008).

Modificările paleoclimatice, produse în decursul erelor geologice, au determinat migrarea unui număr foarte mare de specii de plante (Bănărescu *et Boșcaiu*, 1973). Speciile considerate a fi relictate geografice sau filogenetice, reprezintă o reală sursă de informații cu privire la

identificarea posibilelor caractere ce au permis supraviețuirea acestora încă din Holocen sau Paleocen până în prezent (Graham *et al.*, 2006; Carnaval *et al.*, 2009; Murienne *et al.*, 2009; Grandcolas *et al.*, 2011; Grandcolas *et al.*, 2014).

Anual numeroase specii și concomitent populațiile acestora sunt în pericol de extincție, această situație reflectându-se în scăderea biodiversității. De cele mai multe ori, activitățile antropice de ordin economic pot determina scăderea biodiversității prin degradarea și distrugerea habitatelor naturale. Diminuarea populațiilor locale poate duce și la pierderea zonelor importante din punct de vedere turistic, economic și științific (Primack *et al.*, 2008).

Speciile relict, pe lângă numeroase specii de plante, indică în prezent un declin la nivel populațional ca rezultat al unor factori precum: calitatea habitatului, mărirea populației și diversitatea genetică. Acești factori, prin acțiunea lor independentă sau concomitentă, afectează viabilitatea populațiilor (Fischer *et al.* 1988; Oostermeijer *et al.*, 1998; Vergeer *et al.*, 2003; Heinken-Šmídová, 2012).

Cele mai afectate populații sunt cele mici. Astfel, pe termen scurt reducerea mărimii populației, corelată cu diminuarea diversității genetice, se reflectă în habitus-ul scăzut al unei specii, fiind evidențiat printr-o producție și capacitate germinativă scăzută a semințelor, o creștere lentă a puietilor / indivizilor juvenili și un nivel al mortalității ridicat (Oostermeijer *et al.*, 1998; Heinken-Šmídová, 2012). Pe de altă parte, ca efect pe termen lung, diminuarea diversității genetice poate duce la extincția populației respective (Heinken-Šmídová, 2012).

În ultimii ani s-au realizat numeroase studii cu privire la declinul numeric al speciilor rare, urmărindu-se corelația dintre factorii care amenință existența populațiilor într-un anumit habitat (Fischer *et al.*, 1998; Oostermeijer *et al.*, 1998) și studiile complexe legate de dinamica populațiilor (Heinken-Šmídová, 2012).

Monitorizarea speciilor amenințate a fost recent strâns legată de angajamentele naționale în temeiul Directivei Uniunii Europene privind habitatele, fiind de asemenea strâns legată de conceptul de "stare de conservare favorabilă" (Pakalne *et al.*, 2005). Prin intermediul Convenției privind Diversitatea Biologică (CBD), numeroase țări au agreeat să reducă pierderile survenite la nivelul biodiversității, urmărind trei obiective principale: conservarea diversității biologice, utilizarea durabilă a componentelor diversității biologice precum și împărțirea corectă și echitabilă a beneficiilor rezultate din utilizarea resurselor genetice (Convention on Biological Diversity).

Obiective de cercetare:

- A.** Completarea informațiilor ce au în vedere distribuția geografică și ecologică a speciei de interes comunitar *Ligularia sibirica* (L.) Cass. la nivel global, european și național, prin intermediul îmbinării informațiilor din literatură cu studiile efectuate în teren.
- B.** Caracterizarea geomorfologică și climatică a celor patru teritorii studiate
- C.** Analizarea structurii calitative și cantitative a fitocenozelor integratoare.
- D.** Analiza factorilor de mediu care influențează conservarea speciei relict.
- E.** Completarea informațiilor referitoare la integrarea cenotică a speciei *Ligularia sibirica* (L.) Cass.
- F.** Evaluarea potențialului fitoterapeutic al extractelor obținute din rizomii și rădăcinile de *L. sibirica*
- G.** Răspunsul la condițiile de salinitate și secetă al speciei relict
- H.** Monitorizarea stării de conservare a speciei relict

CAPITOLUL I

ISTORICUL CERCETĂRILOR PRIVIND GENUL *LIGULARIA*

INTRODUCERE

Întocmirea prezentului capitol, a urmărit sintetizarea studiilor efectuate atât asupra speciei *Ligularia sibirica*, dar și asupra genului *Ligularia*. Acest capitol are ca obiectiv principal identificarea următorilor pași în cercetare, necesari caracterizării, monitorizării și conservării optime a speciei luate în studiu.

1.1. MATERIALE ȘI METODE

Pentru o mai bună structurare și evidențiere a gradului de cunoaștere și implicit de caracterizare a speciei relict, s-au întocmit două tabele distincte, unul la nivel național și unul la nivel internațional. Materialul științific necesar pentru completarea bazei de date, a fost obținut prin intermediul unor variate surse bibliografice precum: registre, programe de monitoring, baze de date (*Global Compositae Checklist, Flora Europaea, The Plant List, Euro+Med Plant Base, Google Scholar*), articole științifice, determinatoare și cărți de specialitate (*Flora Republicii Populare/Socialiste Române, Flora Ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta, Plante Vasculare din România. Determinator ilustrat de teren, Flora of the U.S.S.R, Flora of China*), etc.

1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

1.2.1. Genul *Ligularia*

Ligularia este un nume de proveniență latină, ”ligula”=limbă, denumire ce face trimitere la forma ligulelor specifice întâlnite la marginea antodiului (Sârbu *et al.*, 2013).

Genul *Ligularia*, conform *Flora of China, The Plant List, Flora Europaea* și conform datelor găsite în *The Botanic Garden and Botanical Museum Berlin BGBM*, cuprinde aproximativ 150 de specii, răspândite în zonele temperate din centrul și estul Asiei, precum și în Europa. Pe teritoriul Europei se găsesc șapte specii: *L. sibirica* (L.) Cass., *L. glauca* (L.) O. Hoffm., *L. carpathica* (Schott) Pojark., *L. dentata* (A. Gray) H. Hara, *L. hodgsonii* Hook., *L. przewalskii* (Maxim.) Diels și *L. stenocephala* (Maxim.) Matsum. & Koidz.. Speciile sunt găsite sub diferite categorii: specie introdusă, introdusă – naturalizată, introdusă – adventivă ocazional, nativă, îndoielnic nativă, cultivată – ornamentală (Tabel 1).

Aria de răspândire a genului *Ligularia* variază în funcție de stațiune, găsindu-se pe văile râurilor, pe malul lacurilor, în mlaștini eutrofe, tinoave, pajiști umede și mlaștinoase uneori sărăturate, în păduri umede, la margini de pădure, poieni de pădure, pe versanții stâncoși și grohotișurile din zona alpină. Altitudinea la care se găsesc speciile variază de la 100 m în Asia de N, până la 4800 m în restul continentului. Habitatetele în care se dezvoltă speciile ajung până în zona alpină, în locuri aride pe grohotișurile din munții înalți, precum munții Hengduan (China) sau pajiștile alpine ca cele din Tibet. Condițiile ecologice și altitudinea determină o variabilitate sporită a înălțimii speciilor, acestea măsurând de la 5 cm pe versanții stâncoși și grohotișurile din zona alpină, până la 200 cm înălțime pe văile râurilor, în mlaștini eutrofe, păduri tinere umbroase, pajiști etc. (Komarov *et al.*, 1961; Tzvelev *et al.*, 2002; Slavík, 2004; Wu *et al.*, 2011).

Conform celor patru publicații botanice de referință care fac trimitere la flora României (*Flora ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta, Plante vasculare din România*).

Determinator ilustrat de teren, Flora mică ilustrată a Republicii Populare Române) pe teritoriul țării noastre se regăesc două specii aparținând genului *Ligularia*, respectiv: *Ligularia sibirica* (L.) Cass. și *Ligularia glauca* (L.) Hoffm.

Genul *Ligularia* Cass. aparținând familiei *Asteraceae*, respectiv tribului *Senecioneae* și subtribului *Tussilaginatae* reprezintă un gen cu o diversitate ridicată, foarte multe specii fiind localizate în platoul estic Qinghai-Tibet și în împrejurimile acestuia; *L. dentata* și *L. hodgsonii* sunt considerate cele mai puțin evoluat specii (Jeffrey *et al.*, 1984). Această regiune este considerată centrul de origine și diversitate al genului *Ligularia* (Liu, 1989; Liu *et al.*, 1994). O parte dintre speciile identificate, mai mult de jumătate dintre acestea (60), sunt considerate a fi endemice pentru zona respectivă. Toate speciile aparținând genului *Ligularia* din acea zonă, dețin același număr de cromozomi $2n = 58$, cariotipuri similare de tipul $2A$ și $x = 29$ reprezentând numărul de bază. Numărul de cromozomi $x=30$ este întâlnit preponderent în Europa și în nordul Asiei, departe de centrul de origine și diversitate al genului *Ligularia*. Dacă numărul este derivat din $x=29$, printr-un eveniment aneuploid secundar, acesta poate fi considerat una dintre situațiile de inversare a evoluției cromozomilor (Liu, 2004).

Genul *Ligularia* a fost studiat intens în ultimii ani din punct de vedere al compușilor fitochimici, fiind astfel obținute rezultate semnificative utile în medicina tradițională, în tratarea bronșitelor, astmului, tuberculozei, artritei, tusei, inflamațiilor, icterului, scarlatinei și în ameliorarea durerilor hepatice (Li *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2010). Studiile farmaceutice precum și cele chimice efectuate asupra speciilor aparținând genului *Ligularia*, demonstrează prezența unor constituenți specifici precum sesquiterpenele (Wu *et al.*, 2016).

Specia *L. sibirica* nu a fost prea mult studiată din punct de vedere biochimic și nici din punct de vedere citotoxic, totuși trebuie menționat faptul că specia poate fi utilizată în tratarea flegmei excesive și în reducerea tusei (Liao *et al.*, 2002; Tori *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2013).

1.2.1.1. *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

Ligularia sibirica (Linnaeus) Cassini (Cuvier, 1823) este o specie polimorfă, perenă, de culoare verde, uneori cu tentă purpurie, ce poate atinge înălțimi de la 15 cm până la 150 cm (Chater, 1976).

- În sol, specia are un rizom scurt, dens acoperit cu rădăcini adventive groase sau subțiri și în partea superioară acoperit cu resturi fibroase de frunze moarte (Komarov, 1961; Tzvelev, 2002).

- *Tulpina* este erectă, groasă, striat-sulcată (brăzdată), verde sau roșiatic-violetă, complet glabră, pubescentă sau păroasă până la nivelul inflorescenței (Komarov, 1961; Tzvelev, 2002).

- *Frunzele* bazale sunt verzi pe fața superioară, cu dimensiuni cuprinse între: 3/10-25 și 3/7-20 cm. Acestea pot fi tringhiular-reniforme până la sagitate, dentate, mai mult sau mai puțin glabre, până la dens păroase pe suprafața inferioară sau superioară de-a lungul nervurilor, mai rar în întregime. Pețiolul de obicei poate fi de 2-2,5/3 ori mai lung decât lamina (Komarov, 1961; Chater, 1976; Tzvelev, 2002). Laminele au forme diferite, cu dimensiuni cuprinse între: 5,5/9-24 cm lungime și 7-22 cm lățime, cordate sau ovat-cordate, uneori deltoide, sinuat-dințate cu dinții deltoizi mai mult lați și scurt acumițați (Komarov, 1961; Chater, 1976; Tzvelev, 2002).

- *Frunzele* caulinare sunt de două tipuri: inferioare și superioare. Cele inferioare au lamina și pețiolul mai scurt, îngustat la bază într-o teacă mai lungă. La frunzele caulinare superioare lamina este deltoidă sau deltoid-cordată și delicat-dințată, cu pețiolul scurt, o mare parte fiind modificată într-o teacă extinsă. Totodată, se poate observa și o ultimă frunză de

culoare brună sau roșiatică, amplexicaulă, de forma unui solz sau a unei frunze bracteale inferioare (Komarov, 1961; Chater, 1976).



Fig. *Ligularia sibirica* (L.) Cass. – Mlaștina de la Hărman (Original)

- *Inflorescența* este simplă, racemoasă, mai mult oblongă, cu o lungime mai mare de 12 cm, fiind formată din 5/10-52 de capitule cu diametrul de 2,5-4,5 cm, oblic verticale ulterior aplecate (Komarov, 1961; Tzvelev, 2002). *Involucrul* este campanulat sau cilindric-campanulat, glabru sau arahnoid-păros și are la bază 11-12 bractee tomentoase pe fața exterioară. Frunzele bracteale inferioare sunt ovat-lanceolate, carenate, lung-acuminate, cu o lungime de 2,5-6 cm, având ocazional partea superioară dințată. Frunzele bracteale superioare sunt ovat-lanceolate, chiar liniare. Pedunculii inferiori și superiori sunt groși, cei inferiori au 5-10 cm lungime cu 1 sau 2 capitule, iar cei superiori măsoară 5-12 cm, cu perii maronii/albi și arahnoizi (Komarov, 1961; Tzvelev, 2002).

- *Capitulele* sunt formate din două tipuri de flori: flori ligulate, 7-8/11 la număr și flori tubulare, 18/23-32 la număr. Florile ligulate exterioare sunt galbene, oblong-ovate cu un tub de 5-6 mm lungime, ligulele fiind străbătute de 4-9 nervuri, în timp ce florile centrale sunt tubular-campanulate, cu limbul și tubul îngust, cu dinți lungi de 1-1.5 mm. La nivelul staminelor anterele au apendicele apical ovat-lanceolat, cel bazal fiind scurt și obtuz. Gineceul are stilul ramificat, ramificațiile fiind acoperite cu perișori scurți și subțiri, la vârfuri fiind ușor aplatizate în câte un apendice scurt, obtuz (Komarov, 1961; Tzvelev, 2002).

- *Achenele* sunt lungi cu dimensiuni cuprinse între 4 și 6 mm, papusul fiind mai lung sau egal cu achena, de culoare alb-murdar (Komarov, 1961; Chater, 1976; Tzvelev, 2002).

La Mlaștina Hărman este întâlnită *L. sibirica* var. *araneosa* DC sau *L. sibirica* f. *araneosa* DC (Nyárady, 1964; The Plant List), planta este sublanuginoasă cu pediceli alb-lanați.

1.2.1.2. *Ligularia glauca* (L.) Hoffm.

Deosebirile principale din punct de vedere morfologic dintre specia *L. sibirica* (L.) Cass. și *L. glauca* (L.) Hoffm. pot fi remarcate la nivelul organelor vegetative și al fructului. Astfel, frunzele bazale sunt îngustate sau ușor cordate la bază (Nyárády, 1964; Sârbu *et al.*, 2013), fiind mai mult sau mai puțin brusc atenuate în pețiol. Din punct de vedere al formei, frunzele sunt ovat-eliptice sau eliptice, cu marginea întregă sau mărunț denticulată, fiind totodată glauce (Komarov, 1961; Nyárády, 1964; Tzvelev, 2002; Ciocârlan, 2009). Papusul poate fi foarte scurt (Ciocârlan, 2009), mai scurt decât achenă sau în unele cazuri fiind chiar absent (Nyárády, 1964; Sârbu *et al.*, 2013).

1.2.1.3. *Ligularia bucovinensis* (L.) Nakai

Numeroși specialiști în botanică, atât din România dar și de peste hotare, din țări precum Ucraina, Slovacia, Cehia și Polonia, au încercat să obțină rezultate cât mai concludente cu privire la dihotomia dintre speciile *L. sibirica* și *L. bucovinensis*. Astfel din rezultatele obținute prin intermediul amplelor studii taxonomice desfășurate în ultimii ani, se poate menționa faptul că specia *L. bucovinensis* a fost acceptată în cadrul unor baze taxonomice: The Plant List sau Global *Compositae* Checklist. Cu toate acestea, mulți specialiști susțin faptul că acele caractere puțin variabile ale speciei *L. bucovinensis* precum înălțimea plantei de 70-75 cm, tulpinile zvelte subțiri și înflorescențele mici cu maxim 15 capitule (Komarov, 1961), ar fi mai potrivite pentru determinarea unei subspecii sau varietăți (Nyárády, 1964; Ciocârlan, 2009; Sârbu *et al.*, 2013).

1.2.1.4. *Ligularia carpathica* (Schott, Nyman *et* Kotschy) Pojark.

Principalele caractere morfologice care diferențiază specia *L. carpathica* de specia *L. glauca* includ: marginile sinuat-dințate ale tuturor frunzelor sau numai ale celor inferioare, limbul mai îngust al florilor tubulare, ligulele florilor periferice străbătute de aproximativ 6-10 nervuri (Pojarkova, 1961). În prezent, *L. carpathica* este acceptată ca specie de către baze taxonomice, precum: The Plant List și Euro+Med Plantbase, specia fiind recunoscută și de către determinantul de teren "Plantele vasculare din România. Determinator ilustrat de teren" (Sârbu *et al.*, 2013). Totuși, Nyárády (1964), Sanda (2004) și Ciocârlan (2009) consideră specia *L. carpathica* un sinonim al speciei *L. glauca*.

1.2.2. Istoricul cercetărilor pe plan mondial

Primele studii aprofundate asupra genului *Ligularia* încep în Franța în anul 1816, unde botanistul și naturalistul Alexandre Henri Gabriel de Cassini (1781-1832), specializat în familia *Asteraceae*, denumeste și încadrează genul *Ligularia*. Suedezul botanist, fizician și zoolog Carl Linnaeus (1707 – 1778), considerat "tatăl taxonomiei moderne" care a întocmit sistemul de nomenclatură binomială, utilizat astăzi la nivel internațional prin *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants* (ICN), a descris pentru prima dată specia *Ligularia sibirica*, pe care ulterior Cassini a reclasificat-o în anul 1823 în sistemul botanic utilizat în zilele noastre. Ulterior, prin desfășurarea cercetărilor de botanică la nivel european, specia relictă a fost menționată în volumele de Floră din 11 țări: Rusia, Estonia, Letonia, Polonia, Slovacia, Croația, Austria, România, Bulgaria, Franța și Ucraina.

Datorită amenințărilor la nivel climatic, al diminuării nutrienților și eutrofizării terenurilor, menținerea biodiversității și conservării florei și vegetației reprezintă o problemă actuală la nivel European. *L. sibirica* este considerată specie de importanță comunitară, iar prin

intermediul Directivei Habitate se încearcă conservarea acesteia, prin variate proiecte de monitorizare.

Din punct de vedere genetic, literatura de specialitate oferă informații referitoare la uniformitatea cariotipului, diversitatea genetică la nivel populațional și endopoliploidia speciei *L. sibirica*. Astfel, în anul 2004 Liu *et al.*, a efectuat un studiu complex asupra uniformității cariotipurilor genului *Ligularia*, concluzionând că variația structurii cariotipului la nivelul diploidelor poate să fie caracteristică evoluției cromozomiale. Cercetările din punct de vedere genetic au continuat cu studiul realizat de către Šmídová *et al.* în 2012. Krasņevska *et al.*, a studiat în 2017 endopoliploidia speciei *Ligularia sibirica* din cadrul câtorva populații distincte din Polonia.

În Europa au fost întocmite două teze de doctorat care au studiat specia relictă *L. sibirica* din diferite puncte de vedere. Prima lucrare, realizată de către Heinken-Šmídová în 2012, ”*Study of factors influencing population dynamics of the plant species Ligularia sibirica (L.) Cass.*”, a urmat obiective precum: estimarea diversității genetice și a condițiilor principale ale habitatului în localitățile studiate, precum și identificarea mărimii optime necesare dinamicii populației de *L. sibirica* în Cehia și Slovacia. Cea de a doua lucrare, scrisă de către Lanno în 2014, ”*Long-term changes in the Estonian flora and measures for conservation*” își dorește să afle răspuns la câteva întrebări în ceea ce privește conservarea speciei.

Genul *Ligularia*, datorită activității biologice intense și a numeroșilor compuși biochimici, a atras de-a lungul anilor interesul oamenilor de știință din China, Japonia și Mongolia. Specia *L. sibirica* a fost studiată în lucrări precum: ”*Phytochemicals and biological activity of Ligularia species*”, ”*Ligularenolide. A new sesquiterpene lactone of eremophilane type*”, ”*Studies on sesquiterpenoids. Structure of ligularol and ligularone from Ligularia sibirica Cass.*” și ”*Pyrrolizidine Alkaloids from Ligularia sibirica Cass. and Tephroses integrifolia L.*”.

Datorită habitus-ului lor, speciile genului *Ligularia* se pretează și pentru lucrările de amenajare peisagistică în cultivaruri precum: ”Britt Marie Crawford”, ”Gregynog Gold”, ”The Rocket”, ”Zepter”. Aceste cultivaruri au fost incluse în 2017 pe lista speciilor cu performanțe de creștere optimă în condițiile din Regatul Unit, fiind premiate în cadrul *The Award of Garden Merit (AGM)*, concurs organizat anual de către *British Royal Horticultural Society (RHS)*.

Wang *et al.* și Zhang *et al.* au demonstrat în 2011 faptul că specia *L. sibirica* poate fi utilizată în diferite aplicații ale biotehnologiei moderne, atât datorită capacității sale excelente de adaptare și rezistență la poluarea de tipul apelor reziduale zootehnice, cât și datorită capacității sale de purificare a apelor uzate provenite din sectorul zootehnic.

1.2.3. Istoricul cercetărilor în România

În România cercetările privind specia *L. sibirica* încep în anul 1796, când naturalistul Franz von Waldstein și botanistul Pál Kitaibel citează pentru prima dată specia *Cineraria sibirica* identificată în Munții Gutâi, Tăul lui Dumitru și Cavnice. Ulterior cercetările au continuat în anul 1816, când Johann Christian Baumgarten menționează specia relictă la care adaugă alte localități din județul Harghita.

Botanistul Philipp Johann Ferdinand Schur menționează în 1865 speciile: *Senecillis glauca* Gaertn. și *Senecillis carpathica* Schott, întâlnite în Muntele Corongiș – Munții Rodnei și La Piatra Secuiului - Rimetea, la care au fost precizate locațiile cu *L. sibirica* din Muntele Puturosu, Turia (Covasna) și Borseac. Michael Fuss în 1866 descrie pentru prima dată într-o publicație românească, *Transsilvaniae excursoria*, taxonii *L. sibirica* și *L. carpathica*.

Florian Porcius în anul 1881, critică puținele caractere prin care a fost efectuată diferențierea de către Schur dintre speciile *Senecillis (Ligularia) glauca* și *Senecillis (Ligularia) carpathica*.

Academicianul Nyárády E.I. a adus în 1964 o contribuție foarte mare în descrierea genului *Ligularia* și implicit a speciei *L. sibirica* în *Flora Republicii Socialiste Române*.

Contribuții la studiul speciei *L. sibirica* din mlaștinile de turbă din România sunt aduse și de către academicianul Emil Pop prin intermediul numeroaselor publicații, dar și prin sintetizarea cercetărilor efectuate în țară, în *Mlaștinile de Turbă din Republica Populară Română*, apărută în anul 1960.

Cercetările botanice au continuat până în prezent, la acestea au luat parte nume de referință în domeniu, precum: Grecescu D., Resmeriță I., Morariu I., Beldie Al., Boșcaiu N., Drăghici Bibica, Coldea Gh., Kovács J. A., Stoicovici Lucia, Gergely I., Rațiu Flavia, Alexiu V., Drăgulescu C., Stancu Daniela Ileana, Neblea Monica, Cristea V., Răduțoiu D., etc.

Convenția privind Diversitatea Biologică (CBD) reprezintă astăzi cel mai important instrument internațional în coordonarea politicilor și strategiilor la nivel global privind conservarea biodiversității. România a ratificat CBD prin Legea nr. 58/1994. *L. sibirica* este una dintre speciile de importanță comunitară din România, fiind menționată în Directiva Habitate în Anexele IIb, IVb și în OUG 57/2007 - Anexele 3, 4A. În prezent mărimea populației este neevaluată, starea de conservare fiind Data Deficient (DD). Patru lucrări de referință prezintă statutul speciei în România: ”*Lista roșie a plantelor superioare din România*” (Oltean *et al.*, 1994), ”*Lista roșie a plantelor vasculare dispărute, periclitare, vulnerabile și rare din flora României*” (Boșcaiu *et al.*, 1994), ”*Arii speciale pentru protecția și conservarea plantelor în România*” (Sârbu *et al.*, 2007), și ”*Ghidul de monitorizare a speciilor de plante de interes comunitar din România*” (Mihăilescu *et al.*, 2015).

Măsuri de protecție a speciei relictă au fost realizate încă din anul 1995, când Alexiu V. și Stancu Daniela vin cu o *Propunere de rezervație pe baza unui studiu fitocenologic în complexul de chei al Dâmboviței*, în care se găsește specia *L. sibirica*.

Kapás *et al.* au realizat în anul 2009, primul studiu efectuat în România pentru identificarea compușilor bioactivi ai speciei *L. sibirica*, ”*Obtaining and identification of bioactive compounds from Ligularia sibirica (L.) Cass.*”.

În anul 2013, Ciprian Mânzu *et al.*, prezintă o potențială distribuție a speciei *L. sibirica* corelată cu posibilele schimbări climatice prin intermediul lucrării ”*Current and future potential distribution of glacial relict Ligularia sibirica (Asteraceae) in Romania and temporal contribution of Natura 2000 to protect the species in light of global change*”.

Matei *et al.* au realizat în anul 2016 studiul ”*Responses to Drought and Salinity in the Endangered Species Ligularia sibirica (L.) Cass.*”. Autorii au concluzionat faptul că atât stresul la apă, cât și stresul la sare, au efecte negative asupra speciei studiate.

CAPITOLUL II

CARACTERIZAREA FIZICO-GEOGRAFICĂ, GEOLOGICĂ ȘI PEDOCLIMATICĂ A TERITORIILOR CERCETATE

INTRODUCERE

Modificările produse de-a lungul erelor geologice au avut ca rezultat migrarea unui număr mare de specii, acestea au tins să ocupe areale care să dețină condiții cât mai optime, necesare supraviețuirii. Relictul glaciar *Ligularia sibirica*, care face obiectul prezentului studiu, în urma migrării din Rusia, către continentul European, a ocupat diferite areale în mlaștini eutrofe și oligotrofe, turbării cu vegetație forestieră, zone de pe malurile râurilor, pajiști înmlăștinite de la margine de pădure, etc.

Pentru a afla în ce direcție evoluează o specie, trebuie aflat cum a apărut acea specie într-un anumit areal și ce factori îi pot periclita existența. Obiectivul prezentului capitol este caracterizarea geomorfologică și climatică a patru locații diferite în care se află distribuită specia relictă, cu scopul de a determina exact în ce măsură caracteristicile geomorfologice și climatice influențează, sau nu, conservarea speciei, care ulterior va fi analizată din punct de vedere fitosociologic și ecologic.

2.1. CARACTERIZAREA FIZICO-GEOGRAFICĂ, GEOLOGICĂ, PEDOLOGICĂ ȘI HIDROGRAFICĂ A SITURILOR

2.1.1. Cheile Brustureului

Rezervația Piatra Craiului Mare, înființată în 1938, s-a numărat printre primele rezervații înființate de către Comisia Monumentelor Naturii în România (Mihăilescu, 2001; Plan de Management al PNPC). Treptat, a fost înființat Parcul Național Piatra Craiului, care, în prezent, deține o zonă de conservare specială, de 4879 ha (Mihăilescu, 2001; Plan de Management al PNPC).

Pe partea de SV și de E a Masivului Piatra Craiului își face remarcată prezența cel mai mare complex de chei din țară, unde, de-a lungul râului Dâmbovicioara, se întâlnesc sculptate în marne și calcare marnoase cretacice, cinci sectoare de chei, dintre care se impun prin dimensiune și aspect cheile Dâmbovicioarei și Cheile Brustureului (810m alt.) (Cristea, 1984). Solurile, care vin să îmbrace structura calcaroasă, sunt destul de variate, de la cele mai puțin evoluat, până la cele evoluat, predominând cambisolurile și molisolurile. Astfel, la Cheile Brustureului se găsesc: rendzine (care se dezvoltă pe roci calcaroase), litosoluri, soluri brun acide sau negre acide (cambisolurile), la care se adaugă podzolurile (Alexiu *et* Stancu, 2003; Matei, 2015; Matei, 2016; Plan de Management al PNPC).

Cheile Brustureului găzduiesc izbucurile de la Gâlgoaie și Grota Brustureului, precum și specia relictă de importanță comunitară *Ligularia sibirica* (L.) Cass. (Alexiu, 1999; Constantinescu, 2009; Pop, 2006).

Rețeaua hidrografică de suprafață de la Cheile Brustureului este raportată la râul Dâmbovicioara și afluenții săi, cu un curs temporar și debit redus: Valea cu Apă, Valea Peșterii și Valea Muierii care, de la obârșie, până la vărsarea în Dâmbovița, are trei denumiri diferite: Valea Seacă a Pietrelor, Brusturet (până la confluența cu Valea Muierii) și Dâmbovicioara (Frînculeasa *et* Istrate, 2010).

Taxonul de importanță comunitară *Ligularia sibirica* este identificat, împreună cu alți taxoni, în Cheile Brustureului de către Bibica Drăghici, în anul 1967 (Drăghici, 1980), fiind

menționat, ulterior, în teza de doctorat cu titlul ”*Flora și vegetația Văii Dâmbovicioarei și a versantului estic al Pietrei Craiului*” și în publicația efectuată, împreună cu Morariu I., în anul 1980 ”*Contribuții la flora Masivului Pietra Craiului*” (Drăghici, 1980). Ulterior, în decursul anilor 1995, 1998, 2000 și 2001, Alexiu V. și Ileana Stancu efectuează studii asupra florei și vegetației din Cheile Brusturetului (2003). Pop O. menționează, în anul 2006, specia *Ligularia sibirica*, alături de alți taxoni, în acest sit.

2.1.2. Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare

Munții Bucegi ”(...) au o netăgăduită personalitate, determinată îndeosebi de multitudinea aspectelor pe o suprafață relativ mică și de marea bogăție a florei care cuprinde numeroase rarități și endemisme de mare interes științific” (Beldie, 1967).

Din punct de vedere geologic, Masivul Bucegi deține un fundament de șisturi cristaline (Cheile Zănoagei și Scropoasa), peste care s-au depus transgresiv depozite sedimentare mezozoice, care aparțin perioadelor jurasic și cretacic: calcare jurasice, conglomerate tipice de Bucegi și gresii micacee (Beldie, 1967). Calcarele jurasice sunt foarte bine reprezentate în Zănoaga alături de formațiunile cuaternare (Beldie, 1967).

Din punct de vedere pedologic, în Cheile Zănoagei (1329m alt.), Scropoasa (1267m alt.) și Șapte Izvoare (1272m alt.) sunt prezente solurile zonale cu o succesiune altitudinală, astfel.

Parcul Natural Bucegi se află localizat în partea estică a Carpaților Meridionali. Situl a fost propus pentru protejare în anul 1936, fiind administrat, în prezent, de Regia Națională a Pădurilor Romsilva (Plan de management PNB). Ulterior, în anul 2000, a fost înființat Parcul Natural Bucegi, situându-se pe teritoriul administrativ al județelor Dâmbovița, Prahova și Brașov (Plan de management PNB). Datorită complexității ecosistemelor, Parcul Natural Bucegi deține un grad crescut de conservare, cu numeroase categorii de arii protejate în care sunt incluse și două dintre numeroasele zone de protecție. Zonele în care a fost efectuat studiul fitosociologic al speciilor însoțitoare relictului glaciar *Ligularia sibirica* cuprind *zona de protecție strictă* Orzea-Zănoaga și *zona de protecție integrală* Zănoaga-Lucăcilă, ambele fiind localizate în județul Dâmbovița (Neblea et Alexiu, 2003; Neblea, 2007; Matei, 2018; www.bucegi-park.ro; Plan de management PNB).

Studiul s-a desfășurat de-a lungul Râului Ialomița, unde a fost întâlnită specia relictă *L. sibirica* în Cheile Zănoaga Mică și Zănoaga Mare, în zona lacului Scropoasa și în zona cascadei Șapte Izvoare, situată în proximitatea barajului Scropoasa, pe muntele Scropoasa (www.bucegi-park.ro; Plan de management PNB; Matei, 2018).

Prima sinteză asupra florei masivului Bucegi a fost efectuată de către Grecescu D. în anul 1910, cu lucrarea „*Plante vasculare din Bucegi*”, în care este menționată și specia *Ligularia sibirica*, studiile fiind completate, ulterior, de către Prodan I., în 1923, cu lucrarea „*Flora*” și Pușcariu D. et al. în anul 1956, cu lucrarea „*Pășunile alpine din Munții Bucegi*”. Beldie Al. continuă cercetările în Masivul Bucegi, în anul 1967, publicând lucrarea „*Flora și vegetația Munților Bucegi*”, în care menționează prezența speciei *Ligularia sibirica* în Cheile Zănoagei, fiind identificată, ulterior, și de către Neblea Monica et Alexiu V., în 2003, în lucrarea ”*Aspects of vegetation from Zănoaga and Tătaru Gorges (The Bucegi Mountains)*”.

Cercetările continuă în anul 2007, când Neblea Monica publică lucrarea ”*Vegetația megaforbietelor din Valea Ialomiței (Munții Bucegi)*” și în anul 2015, când Matei Andreea Natalia menționează prezența speciei *Ligularia sibirica* în Cheile Zănoagei, în zona lacului Scropoasa, spre cheile Orzei și în zona cascadei Șapte Izvoare. Aceste ultime locații ale

relictului au fost descrise în lucrarea ”*Phytosociological study of Ligularia sibirica (L.) Cass. Habitats from Zănoagei Gorges (Bucegi Mountains) Romania*” (Matei, 2016).

2.1.3. Mlaștina Hărman

Situl este situat în județul Brașov, pe teritoriul comunei Hărman. Mlaștina de la Hărman este considerată una dintre cele mai importante mlaștini din punct de vedere floristic din Țara Bârsei (Pop, 1965). Capacitatea mare de conservare a speciilor relicte este datorată, în principal, topoclimatului și rețelei hidrografice cu pârâuri reci de suprafață (Morariu, 1966; Brînzan, 2013; Matei, 2014).

Mlaștina Hărman a fost declarată Rezervație floristică pe o suprafață de 8 ha în anul 1962. Rezervația Naturală Mlaștina Hărman a fost declarată arie protejată la data de 6 Martie 2000 datorită vegetației de tip xerofil, formată în postglaciar. Rețeaua NATURA 2000 asociază Mlaștina Hărman cu Dealul Cetății Lempeș (Matei, 2014; Plan de management DCL-MH).

Turba activă de tip eutrof, cu o grosime de aproximativ 1 m, s-a format pe straturile de pietrișuri, nisipuri, argile și marne, acoperite de hidrisoluri și soluri aluvionale. Situl este hidratat permanent de rețeaua apelor de suprafață alcătuită din Pârâul Husbor, Pârâul de sub Coastă și Valea Morilor (Plan de management DCL-MH).

În prezent, Mlaștina de la Hărman (520m alt.) deține o suprafață de 4.5 ha, 2 ha fiind îngrădite și 2.5 ha sunt considerate ca zonă de tampon între situl propriu-zis și parcele agricole din vecinătate (Matei, 2014).

În 1905 Moesz G., efectuează primele studii asupra florei relicte de la Mlaștina Hărman, studii continuate de către RÖmer I. în anul 1911 și László G. în anul 1915 (RÖmer, 1911; Kovács *et* Rácz 1975). Ulterior, cercetările au fost reluate de către Emil Pop, care a evidențiat bogăția relictelor glaciare din cadrul mlaștinii eutrofe, în anii 1954, 1955, 1960, și de către Morariu I., în anul 1964.

2.1.4. Tinovul Apa Roșie

Tinovul Apa Roșie (996m alt.) se află situat în SV-ul Munților Nemira, care fac parte din grupa Centrală a Carpaților Orientali, în județul Covasna, pe teritoriul comunelor Estelnic și Mereni (Plan de management TAR).

Structura litologică a Munților Nemira este formată din roci ale flișului paleogen, fiind localizați în estul zonei cristalino-mezozoice, alcătuite din marne, argile, gresii și conglomerate. Solurile turboase și de lăcoviște sunt situate de-a lungul văilor râului Apa Roșie, un mic afluent al râului Uz (Plan de management TAR; Coldea *et* Kovács 1969).

Tipurile dominante de sol sunt cele hidromorfe: soluri pseudogleice, luvices-podzolite în partea central-vestică a arealului. Prezența solurilor brune feriiluviale și a podzolorilor brune se remarcă în sectorul estic al sitului. În sectorul nordic al sitului, unde își face simțită prezența specia de interes comunitar *Ligularia sibirica*, care face obiectul prezentului studiu, sunt prezente solurile brune acide incluse în clasa cambisolurilor (Plan de management TAR).

Situl Natura 2000 Tinovul Apa Roșie a fost înființat în anul 2007, prin Ordinul ministrului mediului și dezvoltării durabile Nr 1964/2007, modificat ulterior prin intermediul Ordinului ministrului mediului și pădurilor Nr. 2387/2011, la care se adaugă interesul comunitar al sitului datorat importanței de ordin comunitar rezultat în urma prezenței speciilor de ordin comunitar: *Ligularia sibirica* și *Angelica palustris* (Plan de management TAR).

Printre primele cercetări floristice realizate la Tinovul Apa Roșie, se află și cele efectuate de către: Pop E. în 1960, Predescu Gh. în 1939, și Coldea Gh. *et* Kovács A. în 1969 (Kovács *et*

Rácz 1974). Cercetările asupra florei și vegetației au continuat cu Mititelu D. et Barabaș N. în anul 1994.

2.2.CARACTERIZAREA CLIMATICĂ A SITULUI

2.2.1. Materiale și metode

Realizarea și disponibilitatea datelor climatice calitative sunt esențiale pentru stabilirea impactului variabilității climatice pentru o regiune (Dumitrescu et Bîrsan, 2015; Onete, 2008). Având în vedere că în siturile luate în studiu nu se află, în acest moment, nici o stație meteorologică în proximitatea acestora, crearea seturilor de date prin intermediul tehnicilor de interpolare, folosind grilele de date înregistrate la stațiile meteorologice din apropiere, ne permite estimarea caracteristicilor climatice pentru zona luată în studiu (Sluiter, 2012; Dumitrescu et Bîrsan, 2015).

Prin intermediul proiectului finanțat de către UE, Joint Research Centre - *Climate of the Carpathian Region* (CARPATCLIIM), s-a avut în vedere realizarea unei grile climatologice zilnice, pentru regiunea Munților Carpați. Astfel, a fost realizat setul de grile de date pentru România denumit ROCADA (Romanian Climatic DATaset) pentru perioada 1961-2013. (Dumitrescu et Bîrsan, 2015).

Produsele climatologice incluse în setul de date ROCADA, pentru fiecare sit luat în studiu pentru intervalul 1961-2013, au fost furnizate de către ANM (Administrația Națională de Meteorologie), prin bunăvoința domnului Marius-Victor Bîrsan. Pachetul de date include următoarele variabile meteorologice:

- Presiunea medie lunară (mb - milibari)
- Temperatura maximă (°C - grade Celsius)
- Media temperaturii maxime lunare (°C - grade Celsius)
- Temperatura medie (°C - grade Celsius)
- Temperatura minimă (°C - grade Celsius)
- Media temperaturii minime lunare (°C - grade Celsius)
- Temperatura solului (°C - grade Celsius)
- Media umezelii relative (% - procente)
- Nebulozitatea medie / acoperirea medie a stratului de nori (scară 1–10)
- Numărul de ore de soare lunar (raportată la ore și zecimi)
- Media precipitațiilor totale lunare (mm)

2.2.2. Rezultate și discuții

2.2.2.1. Cheile Brusturetului

Topoclimatul cheilor calcaroase din care fac parte Cheile Dâmboviței, Dâmbovicioarei și Cheile Brusturetului includ fenomene destul de intense, precum inversiunile termice, având ca rezultat prezența fluxurilor de aer calm sau direcționate de-a lungul văilor cu un grad de umiditate ridicat, o prezență redusă a soarelui la care se adaugă fenomenele hidro-meteorologice îndelungate: ceață, îngheț și prezența prelungită a stratului de zăpadă cu o influență considerabilă asupra vegetației prezente (Teodoreanu, 2006).

Temperatura aerului variază foarte mult datorită inversiunilor termice frecvente și semnificative, mai ales în partea inferioară a Masivului Pietra Craiului (Teodoreanu, 2006). Prin intermediul analizei pachetului de date climatice ROCADA, pentru intervalul 1961-2013,

temperatura minimă a fost înregistrată în luna februarie din anul 1985, respectiv -26.85°C , iar temperatura maximă a fost înregistrată în luna iulie 1988, respectiv 26.94°C .

În Parcul Național Piatra Craiului distribuția **precipitațiilor** atmosferice este neuniformă și, totodată, prezintă un grad ridicat de instabilitate mare, influențată de circulația aerului și de orientarea versanților, în general cantitatea de precipitații crescând odată cu altitudinea (Teodoreanu, 2006). Cantitatea maximă de precipitații zilnice de la Cheile Brustureului a fost înregistrată în decursul lunii iunie 2012, cu o valoare de 90.34 mm.

Înghetul este un fenomen care influențează semnificativ vegetația dintr-o regiune, aceasta variind în funcție de altitudine și de circulația maselor dominante de aer (Teodoreanu, 2006).

Presiunea atmosferică scade odată cu altitudinea, astfel la o altitudine de 800-1000m, media anuală este de aproximativ 920mb (Teodoreanu, 2006). Prin intermediul analizei seturilor de date ROCADA, corespunzătoare Cheilor Brustureului pentru intervalul 1961-2013, presiunea cea mai mică de 809.84mb a fost atinsă în luna decembrie 1981, în timp ce presiunea maximă de 830.63mb, a fost înregistrată în decembrie 1972.

Durata de strălucire a soarelui contribuie împreună cu alți factori la distribuția speciilor vegetale dintr-o regiune, astfel, prin analizarea setului de date ROCADA pentru Cheile Brustureului, numărul de ore înregistrate la valoarea cea mai mare au fost în luna iulie 2012, iar minimul a fost înregistrat în luna decembrie 1969.

Acoperirea stratului de nori sau **nebulozitatea medie** exprimată prin fracție noroasă, analizată pentru Cheile Brustureului prin prisma setului de date ROCADA, înregistrează treapta 8 ca valoare maximă în luna septembrie 1996 și treapta 3 ca valoare minimă în luna august 1992, pe o scară de la 1 la 10

Cel mai instabil element climatic, **vântul** circulă pe direcția NV către SE în Masivul Piatra Craiului. În ansamblu predomină vânturile de vest care sunt însoțite și de vânturile regionale caracteristice (Teodoreanu, 2006).

Umiditatea relativă a aerului descrește odată cu creșterea altitudinii, atingând valoarea de 75% în zonele joase și peste 85% la altitudini mai înalte (Teodoreanu, 2006). Putem semnala că de-a lungul celor 53 de ani analizați prin intermediul pachetelor de date ROCADA, media lunară a umidității relative crește proporțional cu media lunară a precipitațiilor.

Temperatura solului la Cheile Brustureului a atins valoarea minimă în luna ianuarie din anul 1962: -14.9°C , și cea maximă în luna iulie din anul 2012: -18.6°C .

2.2.2.2. Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare

Climatul de tip montan de la Parcul Natural Bucegi este raportat la următoarele două etaje: montan-forestier (800-1800 m altitudine) și etajul alpin, ce cuprinde două subetaje: alpin inferior și alpin superior.

Temperatura constituie unul dintre cei mai importanți factori climatici ce pot determina distribuția florei dintr-un areal. Astfel, prin intermediul analizei pachetului de date climatice ROCADA, au fost observate înregistrarea unor temperaturi minime de -6.38°C în luna februarie 1985 și maxime de 28.23°C pentru luna august a anului 2012. Din punct de vedere al temperaturii medii anuale, în Parcul Natural Bucegi, se pot observa diferențele de 2 până la 5°C între versanții însoriți, cei adăpostiți și între cei umbriți, supuși intensității vânturilor (Beldie, 1967).

Precipitațiile atmosferice reprezintă unul dintre cele mai importante elemente climatice. Pentru siturile luate în studiu din cadrul Parcului Natural Bucegi, precipitațiile maxime zilnice

obținute prin intermediul setului de date ROCADA au fost înregistrate în iulie 1975, respectiv 89.33mm.

În ceea ce privește **înghețul**, în Parcul Natural Bucegi, în decursul lunii septembrie apar primele manifestări ale acestuia, în timp ce dezghețul începe, cu aproximație, în luna mai sau la începutul lunii iunie.

Presiunea atmosferică scade odată cu altitudinea, astfel pentru teritoriile luate în studiu din Parcul Natural Bucegi, prin prisma pachetelor de date ROCADA, putem remarca faptul că presiunea minimă este înregistrată de obicei în luna februarie.

Durata de strălucire a soarelui este unul dintre factorii climatici care influențează semnificativ ocuparea unei zone cu un anumit tip de floră. Astfel, la Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare durata medie de strălucire a soarelui scade din luna iulie, de la o valoare de 209.40 de ore, la 104.84 de ore înregistrate în luna noiembrie.

Acoperirea stratului de nori sau nebulozitatea medie a aerului este exprimată prin fracție noroasă pe o scară de la 0 la 10. Prin intermediul analizei setului de date ROCADA, se observă faptul că nebulozitatea medie atinge valoarea treapta minimă de 5.65 în luna octombrie și treapta maximă în luna aprilie de 6.98.

Umiditatea relativă a aerului descrește odată cu altitudinea, atingând valoarea de 76% în zonele joase, până la 84% la altitudini mai înalte, favorizând prezența unui climat răcoros și umed în arealul studiat (Plan de management PNB). Analiza datelor climatice a fost posibilă prin intermediul bazei de date ROCADA. Media umidității relative lunare este destul de variabilă pentru cele trei zone studiate, înregistrând valorile maxime în lunile de iarnă.

Media lunară a temperaturii solului a oscilat de-a lungul timpului. În timpul anului, media lunară a temperaturii solului atinge valori pozitive, începând cu luna aprilie, până în luna octombrie, cu maxime înregistrate, preponderent, în luna iulie, înregistrându-se valori negative din noiembrie până la jumătatea lunii aprilie.

2.2.2.3. Mlaștina Hărman

La Mlaștina Hărman este întâlnit climatul de tip continental, cu o prezență scăzută a vânturilor, având ca specific preponderența inversiunilor termice, mai ales iarna și la începutul primăverii, fenomen caracteristic Țării Bârsei.

Analiza factorului **temperatură** înregistrată în ultimii 53 de ani ne poate oferi o perspectivă destul de interesantă asupra evoluției vegetației în timp. Temperatura medie anuală analizată pentru cei 53 de ani variază în timp de la -4.54°C în lunile ianuarie până la 18.25°C în lunile iulie.

Media anuală a **precipitațiilor atmosferice** de la Mlaștina Hărman atinge valori de la 700mm, la 760mm (Plan de management DCL-MH). Prin analizarea pachetului de date ROCADA, s-a stabilit că lunile care înregistrează cea mai mare cantitate de precipitații sunt mai, iunie, iulie și august.

Presiunea atmosferică de la Mlaștina Hărman înregistrează valoarea minimă de 951.61mb a cantității de precipitații medii lunare în lunile aprilie și valoarea medie maximă lunară de 957.86mb în lunile octombrie din intervalul celor 53 de ani.

Durata de strălucire a soarelui variază la Mlaștina Hărman de la o medie de 56.82 de ore în lunile decembrie, până la 248.55 ore în decursul lunilor iulie, din perioada celor 53 de ani analizați

Acoperirea stratului de nori sau **nebulozitatea medie**, pentru perioada anilor 1961-2013, înregistrează treapta minimă de 5.11, în decursul lunii august și treapta maximă de 7.48, în decursul lunilor decembrie.

Media **umidității relative a aerului** pentru Mlaștina Hărman variază nesemnificativ, înregistrând o medie minimă de 72.25% în lunile aprilie și cea maximă de 81.45% în lunile septembrie pe parcursul anilor analizați.

Media lunară a temperaturii solului de la Mlaștina Hărman a înregistrat valoarea minimă de -10.47°C în luna ianuarie 1985 și cea maximă de 29.19°C în anul 2012.

2.2.2.4. Tinovul Apa Roșie

Prin intermediul analizei pachetului de date climatice ROCADA, a fost înregistrată **temperatura** medie lunară calculată pentru intervalul 1961-2013, care variază de la -6.57°C în luna ianuarie, la 13.54°C în luna iulie.

Pentru Tinovul Apa Roșie, **precipitațiile maxime zilnice** obținute prin intermediul aceluiași set de date, au fost înregistrate în iulie 2005 (84.77mm).

Presiunea atmosferică scade odată cu altitudinea, astfel, pentru Tinovul Apa Roșie, prin prisma pachetelor de date furnizate pentru perioada 1961-2013, putem remarca faptul că presiunea minimă este înregistrată de obicei în luna aprilie cu o medie de 868.45mb, în timp ce media presiunii atmosferice lunare atinge valoarea maximă în luna septembrie, respectiv 875.52mb.

Durata de strălucire a soarelui la Tinovul Apa Roșie scade din luna iulie de la o valoare de 243.98 de ore, la 95.56 ore înregistrate în luna februarie.

Acoperirea stratului de nori sau **nebulozitatea medie** a aerului este exprimată prin fracție noroasă pe o scară de la 0 la 10. Prin intermediul analizei setului de date ROCADA, se observă faptul că nebulozitatea medie atinge treapta minimă de 5.19 în luna august și cea maximă în luna aprilie de 6.89

Umiditatea relativă a aerului descrește odată cu altitudinea. Media umidității relative lunare este destul de variabilă, înregistrând valoarea minimă în luna iulie din anul 2007 de 63.66%, în timp ce valoarea maximă a fost înregistrată în luna februarie a anului 2010, cu o referință de 89.91%.

În decursul anului, **media lunară a temperaturii solului** atinge valori pozitive începând cu luna martie până în luna noiembrie, cu un maxim înregistrat în luna iulie, înregistrând valori negative din noiembrie până la jumătatea lunii martie.

CAPITOLUL III

STRUCTURA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A FLOREI ÎNȘOȚITOARE SPECIEI RELICTE *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS.

„Singura posibilitate reală de a proteja speciile periclitate cu dispariția rămâne încercarea de a conserva comunitățile biologice și ecosistemele din care acestea fac parte. (...) S-au luat în considerare acele specii care erau rare ori prezentau o valoare biogeografică deosebită (relicte terțiare, relicte glaciare, endemite), declarându-se astfel monumentele naturii și elaborându-se „listele roșii” (Alexiu, 2011).

3.1. MATERIALE ȘI METODE DE ANALIZĂ A FLOREI ȘI A COMUNITĂȚILOR VEGETALE

3.1.1. Metoda de prezentare a florei

Conspectul florei vasculare însoțitoare speciei *Ligularia sibirica* (L.) Cass., a fost întocmit pe baza informațiilor din literatură și a cercetărilor personale efectuate în teren în perioada 2013-2016.

Prezentarea fiecărui taxon a cuprins următoarele aspecte: denumirea științifică, denumirea populară, sinonimia, forma biologică, elementul floristic, răspândirea în cele 4 situri, numărul de bază și numărul somatic de cromozomi, caracterizarea ecologică în funcție de indicii Ellenberg, iar în cele din urmă a fost prezentată apartenența cenotică. Nomenclatura taxonomică adoptată, corespunde celei din Flora României (1952-1976), modificată în conformitate cu Codul Internațional de nomenclatură botanică (The Melbourne International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants, 2012).

Ordinea sistematică a familiilor și a genurilor este prezentată conform lucrării *Plante Vasculare din România. Determinator ilustrat de teren* (Sârbu et al., 2013): clasificarea sistematică este efectuată în conformitate cu sistemul taxonomic al lui Ehrendorfer F. (1978), Soó R. (1964-1973) și *Flora Europaea* (1964-1980,1993).

Pentru identificarea bioformelor, elementelor floristice, indicilor ecologici și a structurii cariologice s-au folosit lucrările: *Plante Vasculare din România. Determinator ilustrat de teren* (Sârbu et al., 2013) și *Flora Ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta* (Ciocârlan, 2009).

3.1.2. Metodologie de lucru pentru analiza calitativă și cantitativă a florei însoțitoare a speciei relicte *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

Pentru a fi analizată importanța și gradul de biodiversitate al celor 4 situri studiate, a fost necesară cunoașterea florei însoțitoare, ce conturează comunitățile vegetale în care este prezentă specia *Ligularia sibirica*, dar și eventualele categorii zoologice (Oprea, 2005), precum și enumerarea speciilor menționate în *Programul – Identificarea Importanțelor Ariei pentru protecția plantelor din Europa (IPAs), Criteriul A – specii amenințate* (Sârbu, 2007), la care s-au adăugat speciile menționate în *Lista Roșie a plantelor vasculare din Carpați* (BioRegio, 2014), completată cu prezența endemitelor carpatice (Alexiu, 2013) și a speciilor relicte (Pop, 1960; Pop, 1965).

Lista Roșie a plantelor vasculare din Carpați încadrează speciile în variate categorii și criterii corespunzătoare IUCN. Descrierea speciilor încadrate în categoriile și criteriile aferente și interpretarea criteriilor a fost efectuată conform IUCN: http://www.iucnredlist.org/static/categories_criteria_3_1

Exprimarea bioformelor pe baza abundenței-dominanței medii a speciilor prin intermediul metodei Diemont redă mai exact rolul fiecărei bioforme în edificarea fitocenozelor analizate (Cristea *et al.*, 2004).

În funcție de indicii abundență-dominanță (AD) a fost calculat și gradul de sinantropizare al grupărilor vegetale prin calcularea coeficientului de destrucție (K_d). Balashev (1988). Acesta, reprezintă valoarea relativă a procentului de acoperire realizat de speciile invadante (Cristea *et al.*, 2004).

Pentru a se obține mai multe informații despre caracteristicile zonelor în care se află prezentă specia relictă *Ligularia sibirica*, s-au calculat indicii altitudinal (K_a) și (K_{a2}) (Pop *et Drăgulescu*, 1983, reformulat de Drăgulescu, 1995), precum și indicii botanic de ariditate (I_{ba}) (Drăgulescu, 1995).

Pentru caracterizarea amplă a unei fitocenoză, pe lângă analiza structurii genetice, care oferă o perspectivă asupra distribuției și evoluției în timp a cormoflorei unei regiuni, s-a mai calculat și indicii de diploidie, acesta reprezentând raportul dintre numărul diploizilor și cel al poliploizilor din cadrul florei unei regiuni sau al unei fitocenoză.

Observațiile cenotice asupra speciei *Ligularia sibirica* (L.) Cass. s-au efectuat pe baza celor 134 de relevee efectuate personal în Cheile Brusturețului, Cheile Zănoagei, Scropoasa, Șapte Izvoare, Mlaștina Hărman și Tinovul Apa Roșie. Analiza cenotică a urmat metodele descrise de către școala Central-Europeană de la Zürich-Montpellier, elaborată de către J. Braun-Blanquet.

Denumirea asociațiilor a fost adoptată conform prevederilor stabilite de Codul Internațional de Nomenclatură Fitosociologică, elaborat de H. E. Weber, J. Moraveç, J.-P. Theurillat (2000).

Pentru fiecare fitocenoză, releveele au fost efectuate în perioada de anteză a majorității speciilor componente. Suprafața de probă a variat de la 1 până la 25m²

În cadrul asociațiilor unde au fost efectuate relevee în situri distincte, am redat prin dendrograme de similaritate distribuția asociației în cadrul siturilor luate în studiu, utilizând indicii de similaritate *Bray-Curtys* din programul de statistică *Past*.

3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.2.1 Conspectul floristic

Conspectul floristic al fiecărei încrângături este detaliat la nivel de clasă, ordin, familie și specie.

În perioada studiului, în cele 4 situri cercetate au fost identificați 367 de taxoni, recunoscuți ca floră însoțitoare speciei relicte *Ligularia sibirica*. Cu cele mai multe specii contribuie la flora totală familiile: *Asteraceae*, *Poaceae*, *Cyperaceae* și *Ranunculaceae*.

Evaluând diversitatea specifică a siturilor studiate, se constată că cel mai mare nivel al acestui parametru a fost înregistrat în situl Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare (197 specii), urmat de Mlaștina Hărman (139 specii), Tinovul Apa Roșie (106 specii) și Cheile Brusturețului (59 specii).

3.2.2. Analiza calitativă și cantitativă a florei însoțitoare speciei relicte *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

3.2.2.1. Cheile Brusturețului

3.2.2.1.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european

Prin întocmirea conspectului floristic de la Cheile Brustureului, au fost identificați doi taxoni încadrați în categoria zoologică a speciilor aproape amenințate. Așadar, specia endemică *Plantago gentianoides* deține o frecvență rară în România, în timp ce specia relictă *Ligularia sibirica* crește sporadic și este protejată, în conformitate cu reglementările internaționale. În programul internațional *Identificarea Importantelor Aarii pentru protecția plantelor din Europa* (IPA), specia *Ligularia sibirica* este încadrată în categoria taxonilor europeni amenințați. *Lista Roșie a plantelor superioare din Carpați* (Oltean et al.1994), menționează taxonul ca fiind aproape amenințat.

3.2.2.1.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat

În urma cercetărilor efectuate în teren în perioada 2014-2016, pentru cunoașterea fizionomiei, structurii calitative și cantitative a principalelor fitocenoze în care este prezentă specia *Ligularia sibirica*, au fost identificați 59 de taxoni, încadrați în 29 de familii. Printre cele mai bine reprezentate familii se pot enumera: *Asteraceae* (7 sp.), *Juncaceae* (4 sp.), *Lamiaceae* (4 sp.), *Brassicaceae* (3 sp.), *Cyperaceae* (3 sp.), *Fabaceae* (3 sp.), *Plantaginaceae* (3 sp.), *Poaceae* (3 sp.), *Ranunculaceae* (3 sp.), etc.

3.2.2.1.3. Analiza bioformelor

Pentru a expune trăsăturile caracteristice biotopului speciei *Ligularia sibirica*, identificată în Cheile Brustureului, a fost necesară menționarea ponderii fiecărei forme biologice, completată de calcularea indicelui altitudinal.

Spectrul bioformelor evidențiază că ponderea principală aparține categoriei speciilor hemicriptofite (81%), pondere care este strâns legată de poziția teritoriului studiat, cu deficit termic și abundența formațiilor ierboase specifice pajiștilor. Flora analizată cuprinde și alte categorii de bioforme cu valori procentuale mici, precum: geofite (8.47%) și terofite (6.78%), care sugerează prezența unui climat mai mult sau mai puțin arid, ce deține un grad semnificativ de antropizare a florei și, totodată, prezența unei vegetații discontinue, alcătuită în mare parte din plante anuale.

3.2.2.1.4. Analiza elementelor floristice

Analiza elementelor floristice relevă informații importante asupra macro- și microclimatelor și, totodată, asupra ambianței eco-cenotice în care vegetează speciile identificate (Cristea, 2008).

Prin analiza spectrului elementelor floristice rezultă următoarele aspecte: teritoriul studiat aparține domeniului eurasiatic, fapt ce poate fi remarcat prin ponderea semnificativă (32.20%) a elementelor eurasiatice, la care se adaugă elementele circumpolare specifice unui climat răcoros (23.73%). Alături de acestea își fac remarcată prezența, elementele europene și elementele cosmopolite.

3.2.2.1.5. Analiza ecologică a cormofitelor

Ponderea categoriilor ecologice, conform indiciilor Ellenberg, s-a bazat pe raportul dintre numărul de specii din cadrul fiecărei categorii ecologice și numărul total de specii însoțitoare taxonului *Ligularia sibirica* din arealul cercetat.

În ceea ce privește factorul lumină, în flora analizată de la Cheile Brustureului predomină speciile iubitoare de lumină, care pot suporta slab umbrirea, fiind urmate de speciile

care suportă o umbră relativ slabă și speciile care suportă, pentru puțin timp, condițiile de umbră.

Raportat la cerințele față de temperatură, în cadrul subasociației studiate în Cheile Brusturetului predomină speciile răspândite în zonele temperate din etajul submontan până la etajul montan înalt. O pondere însemnată o au elementele euriterme.

Raportându-ne la toleranța speciilor față de reacția solului, în sit predomină speciile care preferă solurile moderat-slab acide.

În ceea ce privește distribuția speciilor față de cantitatea de azot mineral din sol (N), se poate observa, în cadrul speciilor studiate, ponderea semnificativă a celor răspândite pe soluri bogate în azot mineral, plante răspândite pe soluri cu conținut moderat în azot mineral, la care se adaugă plantele cu cerințe intermediare pentru soluri bogate în azot mineral și cele răspândite numai pe soluri excesiv de bogate în azot mineral, indicând zonele de depozitare, de poluare. O pondere însemnată o au speciile eurinitrofile.

În funcție de indicii de halofilie, 2 taxoni fac referire la preferința pentru solurile oligohaline, ce dețin un conținut foarte sărac în săruri clorurice.

3.2.2.1.6. Analiza cariologică

Din punct de vedere cariologic poate fi remarcată ponderea mare a elementelor poliploide (55.93%), rezistente la condiții ecologice extreme, urmată de ponderea elementelor diploide (33.89%) care poate fi corelată cu vechimea și gradul de conservare al florei studiate. La acestea se adaugă, cu valori procentuale mai mici, elementele diplo-poliploide. Valoarea scăzută a indicelui de diploidie este direct corelată cu altitudinea, dar poate indica, totodată, și existența unor factori perturbatori în gruparea vegetală luată în studiu.

3.2.2.2. Cheile Zănoagei, Scropoasa, Șapte Izvoare

3.2.2.2.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european

În funcție de gradul de periclitate al speciilor în România, în arealul studiat au fost identificați 3 taxoni care au statut de specie rară: *Angelica archangelica*, *Coeloglossum viride*, *Gentianella bulgarica* și 18 taxoni care cresc sporadic în flora României: *Clematis alpina*, *Delphinium elatum* ssp. *elatum*, *Epilobium alpestre*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis palustris*, *Epipactis purpurata*, *Galium lucidum*, *Hepatica transsilvanica*, *Heracleum palmatum*, *Ligularia sibirica*, *Ribes petraeum*, *Saxifraga mutata* ssp. *demissa*, *Scabiosa columbaria*, *Sesleria rigida*, *Silene nutans* ssp. *dubia*, *Streptopus amplexifolius*, *Thelypteris palustris*, *Thymus pulcherrimus*. Printre taxonii cu creștere sporadică se află și două specii considerate relict glaciare: *Ligularia sibirica* și *Ribes petraeum*.

Din analiza categoriilor sozologice, a fost semnalată prezența a patru taxoni care aparțin categoriei speciilor vulnerabile în flora României: *Achillea oxyloba* ssp. *schurii*, *Angelica archangelica*, *Saxifraga mutata* ssp. *demissa*, *Sesleria rigida* și 16 taxoni încadrați în categoria de specii aproape amenințate: *Campanula carpatica*, *Coeloglossum viride*, *Dianthus spiculifolius*, *Epilobium alpestre*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis palustris*, *Epipactis purpurata*, *Festuca versicolor*, *Galium lucidum*, *Gentianella bulgarica*, *Ligularia sibirica*, *Scabiosa columbaria*, *Scabiosa lucida*, *Silene nutans* ssp. *dubia*, *Streptopus amplexifolius* și *Thymus pulcherrimus*.

În teritoriul studiat sunt prezenți următorii 24 de taxoni endemici pentru Munții Carpați: *Achillea oxyloba* ssp. *schurii*, *Aconitum tauricum*, *Alnus viridis*, *Asperula capitata*, *Campanula patula* ssp. *abietina*, *Campanula carpatica*, *Delphinium elatum* ssp. *elatum*, *Dianthus*

spiculifolius, *Euphorbia carniolica*, *Festuca versicolor*, *Hepatica transsilvanica*, *Heracleum palmatum*, *Leucanthemum rotundifolium*, *Melica ciliata*, *Petasites kablikianus*, *Pulmonaria rubra*, *Rhinanthus alpinus*, *Salix silesiaca*, *Saxifraga mutata* ssp. *demissa*, *Scabiosa columbaria*, *Sesleria rigida*, *Silene nutans* ssp. *dubia*, *Thymus comosus* și *Thymus pulcherrimus*.

3.2.2.2.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat

Din sectorul vestic al Munților Bucegi au fost analizate trei zone: Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare, zone în care a fost regăsită specia de importanță comunitară *Ligularia sibirica*. Astfel, analiza floristică efectuată în perioada 2014-2016 indică prezența în teren a 197 specii, încadrate în 54 de familii. Cele mai bine reprezentate familii sunt: *Asteraceae* (26 sp.), urmată de *Poaceae* (16 sp.), *Ranunculaceae* (12 sp.), *Apiaceae* (11 sp.), *Rosaceae* (10 sp.), *Campanulaceae* (9 sp.), *Scrophulariaceae* (8 sp.) și *Caryophyllaceae* (7 sp).

3.2.2.2.3. Analiza bioformelor

Spectrul bioformelor relevă ponderea principală a elementelor hemicriptofite (66.83%), categorie ce exprimă un climat cu deficit termic sau hidric, caracteristic formațiunilor ierboase prezente în stratul ierbos al pădurilor, fiind urmate de elementele fanerofite și elemente geofite. Acestea din urmă indică prezența unor perioade de vegetație scurte, cu o durată limitată a condițiilor de optim ecologic din cadrul sitului.

Indicele altitudinal (Pop *et* Drăgulescu, 1983; Drăgulescu, 1995) pentru flora Cheilor Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare afirmă prezența unui climat montan, aferent etajului montan ce a fost supus unor influențe antropice moderate. Indicele botanic al aridității atinge, în cadrul florei analizate, valoarea de $I_{ba}=1.93$. Diferența de altitudine rezultată din calculul celor doi indici și altitudinea reală poate fi atribuită condițiilor ecologice specifice climatului complex, cât și condițiilor de antropizare prezente în teritoriul studiat.

3.2.2.2.4. Analiza elementelor floristice

Structura areal-geografică complexă a florei munțiilor Bucegi, este evidențiată și prin intermediul analizei florei însoțitoare speciei *L. sibirica* din Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare. Astfel, prin intermediul spectrului elementelor floristice, remarcăm diversitatea categoriilor prezente în arealul cercetat, în care predomină elementele eurasiatice (29.08%), urmate de cele europene (15.82%) provenite din regiunile ce dețin un climat temperat-moderat. Elementele specifice climatului răcoros sunt prezente prin intermediul speciilor cu caracter circumpolar, acestea fiind urmate de speciile central-europene care au migrat treptat către un climat temperat continental. În sit sunt prezente și elementele alpino-carpatică, la care se alătură speciile de proveniență carpato-balcanică, cele carpatice și cele cosmopolite.

3.2.2.2.5. Analiza ecologică a cormofitelor

Astfel, cerințele speciilor față de factorul lumină indică ponderea principală a speciilor heliofile, dar care pot suporta puțin condițiile de umbră, fiind urmate de categoria speciilor care numai în condiții extreme pot suporta, pentru scurt timp, umbră, și de speciile care preferă o umbră moderată.

În ceea ce privește răspândirea indivizilor fitocenozelor integratoare speciei *Ligularia sibirica* în concordanță cu factorul temperatură, se poate distinge prezența speciilor cu o pondere însemnată în etajul montan sau montan înalt, urmate de speciile răspândite preponderent în zone temperate și de speciile euriterme.

În funcție de cerințele față de umiditatea solului, în cadrul fitocenozelor au fost identificate, cu o pondere mare, speciile care preferă solurile moderat umede, reavăne, urmate de speciile cu preferințe pentru solurile jilav-umede, bine drenate dar nu ude. Totodată, prezența taxonilor cu cerințe intermediare, relevă condițiile necesare pentru dezvoltarea speciilor xero-mezofile de pe versanții însoriți.

În cadrul florei studiate, majoritare sunt speciile răspândite pe soluri moderat-slab acide și speciile euriionice.

În fitocenozele studiate predomină speciile cu preferință pentru solurile cu un conținut mic sau moderat de azot mineral.

3.2.2.2.6. Analiza cariologică

Prin intermediul analizei cariologice a florei însoțitoare pentru specia *Ligularia sibirica*, a fost observată ponderea aproape egală a elementelor poliploide (46.94%) și a celor diploide (41.84%). Pentru flora însoțitoare speciei relict, în teritoriul studiat a fost calculat și indicele de diploidie (Pignatti, 1960), a cărei valoare, 0.89, relevă prezența unor grupări vechi, diploide, care au susținut dezvoltarea speciilor poliploide cu o capacitate de competiție interspecifică ridicată, fiind, totodată, mult mai rezistente condițiilor ecologice prezente în teritoriul studiat.

3.2.2.3. Mlaștina Hărman

3.2.2.3.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european

Mlaștina eutrofă de la Hărman conservatoare de relict glaciare, deține pe teritoriul ei 11 taxoni considerați a fi rari pentru flora României: *Armeria maritima* ssp. *barcensis*, *Cytisus procumbens*, *Eleocharis quinqueflora*, *Euphrasia hirtella*, *Juncus castaneus*, *Jurinea mollis*, *Pedicularis sceptrum-carolinum*, *Primula farinosa*, *Schoenus ferrugineus*, *Sesleria caerulea* și *Tofieldia calyculata*. În completarea acestora, vin 18 specii cu o frecvență sporadică pentru flora României, precum: *Achillea asplenifolia*, *Carex appropinquata*, *Carex cespitosa*, *Carex davalliana*, *Carex hostiana*, *Carex lasiocarpa*, *Cicuta virosa*, *Cladium mariscus*, *Epilobium palustre*, *Epipactis palustris*, *Galium boreale*, *Gentiana pneumonanthe*, *Ligularia sibirica*, *Liparis loeselii*, *Schoenus nigricans*, *Sesleria rigida*, *Thelypteris limbosperma*, *Thelypteris palustris* și *Valeriana dioica* ssp. *simplicifolia*.

Din punct de vedere zoologic, flora însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica* cuprinde 7 taxoni integrați în categoria speciilor vulnerabile: *Armeria maritima* ssp. *barcensis*, *Carex davalliana*, *Pedicularis sceptrum-carolinum*, *Primula farinosa*, *Sesleria caerulea*, *Sesleria rigida* și *Valeriana dioica* ssp. *simplicifolia*, la care se alătură 10 taxoni integrați în categoria speciilor aproape amenințate: *Cytisus procumbens*, *Dactylorhiza incarnata*, *Eleocharis quinqueflora*, *Epipactis palustris*, *Juncus castaneus*, *Ligularia sibirica*, *Liparis loeselii*, *Pinguicula vulgaris*, *Schoenus ferrugineus* și *Tofieldia calyculata*.

Lista Roșie a plantelor vasculare din Carpați indică apartenența a 4 taxoni din cadrul florei analizate de la Mlaștina Hărman în categoria taxonilor amenințați cu dispariția, precum: *Cladium mariscus*, *Galium boreale*, *Juncus castaneus* și *Schoenus nigricans* (IUCN, 2018).

Speciile aparținând categoriei de specii aproape amenințate, conform Listei Roșii a plantelor vasculare din Carpați sunt: *Allium ericetorum*, *Carex appropinquata*, *Carex hostiana*, *Carex lasiocarpa*, *Cicuta virosa*, *Dactylorhiza maculata*, *Genista tinctoria*, *Gentiana pneumonanthe*, *Ligularia sibirica*, *Pinguicula vulgaris*, *Schoenus ferrugineus*, *Thalictrum simplex*, *Thelypteris palustris* și *Triglochin palustris*.

3.2.2.3.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat

Prin analiza taxonomică efectuată la Mlaștina Hărman, au fost identificați 139 taxoni încadrați în 41 de familii. Familiile cele mai reprezentative din cadrul florei analizate sunt: *Poaceae* (20 sp.), *Cyperaceae* (19 sp.), *Asteraceae* (17 sp.), *Fabaceae* (9 sp.), *Lamiaceae* (5 sp.), *Orchidaceae* (5 sp.) și *Rosaceae* (5 sp.).

3.2.2.3.3. Analiza bioformelor

Prin intermediul analizei bioformelor florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica*, a rezultat că cea mai mare pondere a covorului vegetal este ocupată de hemicriptofite (69.78%), fiind în strânsă legătură cu Mlaștina Hărman prin prisma locurilor neinundate, a pajiștilor, urmate de speciile geofite care relevă prezența condițiilor ecologice optime pentru o scurtă perioadă de timp și elementele terofite care indică prezența unui climat arid cu un grad ridicat de antropizare.

Indicele altitudinal (Pop *et* Drăgulescu, 1983; Drăgulescu, 1995) pentru flora însoțitoare speciei *Ligularia sibirica* de la Mlaștina Hărman are valoarea $K_a=13.40$, respectiv $K_a=13.13$, care vine să afirme prezența unui climat montan cu influențe antropice moderate.

3.2.2.3.4. Analiza elementelor floristice

Fondul de bază al elementelor floristice de la Mlaștina Hărman, se face remarcat prin diversitatea categoriilor prezente pe o suprafață relativ mică. Ponderea elementelor eurasiatice (39.57%) este cea mai bine reprezentată pentru flora analizată, fiind, totodată, și cea mai bine reprezentată categorie din cormoflora României. Cu un număr semnificativ de specii specifice climatului răcoros, taxonii cu caracter circumpolar se regăsesc în mlaștina eutrofă într-o pondere semnificativă (20.86%), fiind urmate îndeaproape de speciile europene și central-europene. Speciile cosmopolite, care în general ocupă mlaștinile, apele stătătoare și stațiunile ruderales la nivel Global, se regăsesc și la mlaștina eutrofă de la Hărman.

3.2.2.3.5. Analiza ecologică a cormofitelor

Prin intermediul analizei indicilor ecologici, putem observa ponderea crescută a plantelor de lumină care suportă slab umbrirea, fiind urmate de categoria speciilor de lumina, care pot suporta pentru foarte puțin timp condițiile de umbrire.

În ceea ce privește preferințele taxonilor față de factorul temperatură, în sit se disting speciile răspândite în zonele temperate, deluroase, completate de speciile răspândite în etajul colinar, majoritare fiind însă speciile euriterme.

Datorită existenței pârâurilor de suprafață și, totodată, a porțiunilor mai ridicate de teren, flora și vegetația din cadrul mlaștinii eutrofe de la Hărman este destul de diversificată în ceea ce privește condițiile de umiditate ale solului. Astfel, poate fi remarcată ponderea semnificativă a speciilor cu preferințe pentru soluri umede, slab aerisite și a speciilor ce cresc pe soluri jilav-umede, bine drenate.

Distribuția speciilor în funcție de reacția solului, relevă prezența semnificativă a speciilor care preferă solurile neutre, de la slab acide până la slab alcaline și prezența speciilor răspândite pe solurile moderat slab-acide. Majoritare sunt însă speciile eurionice.

În ceea ce privește preferința speciilor pentru azotul mineral, este de remarcat apartenența speciilor răspândite pe soluri sărace în azot mineral și a celor răspândite pe solurile cu un conținut moderat în azot mineral. Majoritare sunt, și în acest caz, plantele eurinitrofile.

Preferința speciilor raportată la condițiile de salinitate generate de culturile agricole situate în proximitatea sitului, relevă prezența speciilor răspândite pe soluri oligohaline, până la cele mezohaline.

3.2.2.3.6. Analiza cariologică

Analiza cariologică indică ponderea semnificativă a elementelor poliploide (53.24%), urmate de cele diploide (36.60%), diplo-poliploide (7.91%) și a elementelor pentru care nu au fost găsite informații în literatura de specialitate (2.16%). Ponderea mare a elementelor poliploide poate fi argumentată prin capacitatea mare de adaptare la condițiile ecologice din Țara Bârsei, corelată cu capacitatea de colonizare datorată potențialului de competiție interspecifică. Prezența unui număr mic de specii diploide reflectă modul în care glaciațiunile și-au pus amprenta asupra speciilor diploide, mai puțin rezistente condițiilor ecologice extreme. Indicele de poliploidie are valoarea de 0.68, ceea ce indică prezența într-un număr mare a poliploizilor dintre care fac parte și speciile relict, care dețin o capacitate fitocenotică de adaptabilitate mult mai mare decât cea a speciilor diploide.

3.2.2.4. Tinovul Apa Roșie

3.2.2.4.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european

În ceea ce privește frecvența speciilor periclitare în România, în cadrul florei analizate de la Tinovul Apa Roșie, 3 taxoni apar cu o frecvență rară în flora României: *Angelica palustris*, *Stellaria longifolia*, *Viola epipsila*, iar 16 taxoni apar sporadic: *Alnus viridis*, *Betula pubescens*, *Calamagrostis canescens*, *Carex lasiocarpa*, *Dryopteris cristata*, *Epilobium palustre*, *Galium boreale*, *Ligularia sibirica*, *Oreopteris limbosperma*, *Pinus sylvestris*, *Plantago gentianoides*, *Potentilla palustris*, *Salix daphnoides*, *Salix pentandra*, *Spiraea salicifolia*, *Valeriana dioica* ssp. *simplicifolia*.

Având în vedere apartenența taxonilor la diferite categorii zoologice, putem menționa prezența a două specii considerate vulnerabile în flora României: *Angelica palustris*, *Viola epipsila* și, totodată, putem remarca prezența a 10 taxoni din categoria speciilor aproape amenințate în flora României: *Betula pubescens*, *Dryopteris cristata*, *Potentilla palustris*, *Ligularia sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Plantago gentianoides*, *Ribes alpinum*, *Salix daphnoides*, *Spiraea salicifolia*, *Stellaria longifolia*.

Urmărind Lista Roșie a plantelor vasculare din Carpați, în Tinovul Apa Roșie poate fi remarcată prezența a 2 taxoni din categoria speciilor critic amenințate cu dispariția din Carpați, respectiv *Angelica palustris* și *Thymus pulegioides*.

3.2.2.4.2. Analiza taxonomică a florei din teritoriul cercetat

Analiza taxonomică a florei însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica*, întâlnită în 3 asociații vegetale: *Caricetum rostratae*, *Junco-Caricetum fuscae* și *Lysimachio vulgaris Filipenduletum ulmariae*, de la marginea de nord a Tinovului Apa Roșie, s-a desfășurat în perioada 2015-2016. Astfel, din studiul floristic a rezultat un număr de 106 specii încadrate în 40 de familii. Familiile cu prezența cea mai mare a speciilor în teren fiind: *Poaceae* (11 sp.), *Cyperaceae* (10 sp.), *Rosaceae* (9 sp.), *Asteraceae* (8 sp.), *Salicaceae* (8 sp.) și *Juncaceae* (5 sp.).

3.2.2.4.3. Analiza bioformelor

Analiza spectrului bioformelor relevă ponderea elementelor hemicriptofite care predomină în covorul vegetal din pădurile limitrofe și cel al pajiștilor de la Tinovul Apa Roșie.

Elementele fanerofite dețin o pondere semnificativă (18.87%), fiind caracteristice vegetației lemnoase, iar prezența geofitelor indică o perioadă limitată a condițiilor de optim ecologic în sit.

Indicele altitudinal (Pop *et* Drăgulescu, 1983; Drăgulescu, 1995) pentru flora Tinovului Apa Roșie are valoarea $K_a=6.06$, respectiv $K_a=5.88$, care, conform treptelor de variație, menționează prezența unui climat răcoros, cu influențe antropice reduse. Indicele botanic al aridității are o valoare de $I_{ba}=0.53$. Diferența de altitudine rezultată din calculul celor doi indici și altitudinea reală poate fi atribuită complexității condițiilor climatice și de habitat caracteristice florei tinovului.

3.2.2.4.4. Analiza elementelor floristice

Analiza spectrului elementelor floristice evidențiază prezența unui număr relativ mic de elemente floristice, dar cu o pondere destul de mare. Elementele eurasiatice, care își au originea, dar și arealul actual în Asia și Europa, dețin ponderea cea mai mare. Din această categorie face parte și specia *Ligularia sibirica*. Elementele circumpolare, caracteristice climatului răcoros, dețin o pondere considerabilă, fiind urmate de elementele europene și de cele cosmopolite care însumează cel mai mare grad de răspândire pe Glob în stațiuni precum mlaștinile, apele stătătoare dar și stațiunile segetale.

3.2.2.4.5. Analiza ecologică a cormofitelor

În ceea ce privește factorul lumină, este de remarcat ponderea semnificativă a speciilor de lumină care suportă slab condițiile de umbră din sit, fiind urmate de către speciile cu preferințe intermediare și de către speciile iubitoare de lumină și care suportă slab condițiile de umbră.

Distribuția florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica* în sit în funcție de factorul temperatură relevă ponderea relativ mare a speciilor răspândite în zone temperate, submontane și a speciilor răspândite în etajele montane și montane înalte. Pondere majoră o au speciile euriterme.

Preferința speciilor pentru factorul ecologic umiditate deține o plasticitate mare aferentă fitocenozelor integratoare în Tinovul Apa Roșie, incluzând prezența plantelor pe soluri moderat umede, reavăne până la soluri umed-ude.

În funcție de reacția solului, aproape jumătate din speciile însoțitoare relictului *Ligularia sibirica* sunt eurionice. Speciile indicatoare pentru acest parametru au un procentaj mai mic, datorat prezenței plantelor răspândite pe soluri moderat-slab acide.

Cerințele florei față de conținutul în azot mineral relevă prezența speciilor cu preferință pentru solurile sărace în azot mineral până la cele răspândite pe soluri bogate în azot mineral. Ponderea principală o dețin speciile eurinitrofile.

Pentru patru din cele 106 specii analizate a fost menționată preferința pentru solurile cu un conținut foarte mic de săruri clorurice.

3.2.2.4.6. Analiza cariologică

Prin intermediul analizei cariologice a speciilor însoțitoare relictului *Ligularia sibirica* a rezultat frecvența mare a speciilor poliploide (61.32%), urmate semnificativ de cele diploide (32.10%) și într-un procent mic de cele diplo-poliploide (5.66%). Numărul mare al speciilor poliploide de la Tinovul Apa Roșie se datorează caracteristicilor de adaptare și competiție

inerspecifică, precum și conservării în sit a unui număr mare de specii relict. Prezența speciilor diploide asigură evoluția în timp, datorată potențialului genetic.

Indicile de diploidie ne indică prezența unor grupări poliploide în tinov, ceea ce coincide cu prezența unui număr mare de specii relict și totodată adaptabilitatea speciilor la condițiile ecologice.

3.2.2.5. Analiza calitativă și cantitativă a florei însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica* (L.) Cass. în cele patru situri cercetate

3.2.2.5.1. Taxoni rari, periclitați, importanți în Flora României și la nivel european

Dintr-un număr total de 367 taxoni identificați ca floră însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica*, 4.9 % dintre aceștia sunt considerați a fi rari pentru flora României și 13.9% prezintă o apariție sporadică. Taxonii rari prezenți în cadrul florei analizate sunt: *Angelica archangelica*, *Angelica palustris*, *Armeria maritima* ssp. *barcensis*, *Coeloglossum viride*, *Cytisus procumbens*, *Eleocharis quinqueflora*, *Euphrasia hirtella*, *Gentianella bulgarica*, *Juncus castaneus*, *Jurinea mollis*, *Pedicularis sceptrum-carolinum*, *Plantago gentianoides*, *Primula farinosa*, *Schoenus ferrugineus*, *Sesleria caerulea*, *Stellaria longifolia*, *Tofieldia calyculata* și *Viola epipsila*.

Speciile sporadice, prezente în minimul 2 dintre cele 4 situri luate în studiu, sunt: *Carex lasiocarpa*, *Epilobium palustre*, *Epipactis palustris*, *Galium boreale*, *Sesleria rigida*, *Thelypteris palustris*, în timp ce taxonul *Ligularia sibirica*, care face obiectul prezentului studiu, apare în toate cele 4 situri analizate.

Din flora analizată, situl cu cel mai mare procent de specii relict este Mlaștina Hărman 7.91%, în timp ce Tinovul Apa Roșie deține cel mai mare procent de specii apărute sporadic, 13.2%, în flora României.

Din punct de vedere zoologic, 4.8% din totalul speciilor analizate sunt considerate a fi vulnerabile și 7.62% aparțin categoriei taxonilor aproape amenințați. Situl cu cel mai mare procent de specii vulnerabile este Mlaștina Hărman, 5.75%, în timp ce Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare dețin cel mai mare procent, 8.16%, de specii amenințate cu dispariția. Dintre speciile amenințate cu dispariția putem remarca apariția unor taxoni în cel puțin 2 situri: *Epipactis palustris*, *Plantago gentianoides* și *Ligularia sibirica*.

Speciile analizate sunt încadrate în categoria speciilor critice (4 sp.), amenințate (4 sp.), vulnerabile (10 sp.) și aproape amenințate (22 sp.). Din această ultimă categorie face parte și taxonul *Ligularia sibirica*. În cadrul speciilor analizate, situl cu cel mai mare număr de specii critice (2 sp.) și specii vulnerabile (10 sp.) din categoria Munților Carpați aparține Tinovului Apa Roșie, Mlaștina Hărman deținând pe teritoriul ei cel mai mare număr de specii amenințate (4 sp.) și aproape amenințate (15 sp.).

3.2.2.5.2. Analiza taxonomică a florei însoțitoare speciei relict *Ligularia sibirica* (L.) Cass. în siturile cercetate

Prin intermediul analizei taxonomice a florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica* au fost identificați 367 de taxoni, integrați în 201 genuri și 68 de familii. Familiile cu ponderea cea mai mare sunt: *Asteraceae* (39 sp.), *Poaceae* (35 sp.), *Cyperaceae* (29 sp.), *Fabaceae* (16 sp.), *Rosaceae* (16 sp.) și *Apiaceae* (15 sp.).

3.2.2.5.3. Analiza bioformelor în siturile cercetate

Prin intermediul analizei bioformelor din cadrul florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica*, elementele hemicriptofite (65.40%) ocupă ponderea cea mai mare din covorul vegetal, reflectând prezența speciilor ierboase în cadrul pajiștilor adaptate unui climat cu deficit termic sau hidric. Prezența elementelor geofite (13.35%) în convorul vegetal format din speciile însoțitoare relictului *Ligularia sibirica* relevă perioada de vegetație scurtă de optim ecologic a speciilor analizate. Ponderea elementelor terofite (8.44%) indică prezența unui climat arid în siturile analizate, precum și prezența unui anumit grad de antropizare al vegetației. Trebuie menționată prezența elementelor fanerofite (7.91%), a elementelor camefite (3.54%), rezistente la condițiile unor ierni geroase și bogate în precipitații, dar și prezența elementelor helohidatofite (1.36%), caracteristice zonelor umede din Tinovul Apa Roșie sau Mlaștina Hărman.

3.2.2.5.4. Analiza elementelor floristice în siturile cercetate

Prin intermediul analizei elementelor floristice ale fitocenozelor integratoare speciei *Ligularia sibirica* din Cheile Brusturețului, Cheile Zănoagei, Scropoasa, Șapte Izvoare, Mlaștina Hărman și Tinovul Apa Roșie rezultă următoarele aspecte:

- fondul de bază al cormoflorei este evidențiat de către ponderea substanțială a elementelor eurasiatice (35.97%) pentru toate regiunile analizate, în care este integrată și specia de importanță comunitară *Ligularia sibirica*;
- climatul răcoros a făcut posibilă prezența elementelor circumpolare (18.25%), fiind prezente într-o pondere semnificativă la Tinovul Apa Roșie (27.36%): *Carex acuta*, *Carex nigra*, *Dryopteris cristata*, *Epilobium angustifolium*, *Eriophorum vaginatum* și la Cheile Brusturețului (23.73%): *Adoxa moschatellina*, *Caltha palustris* ssp. *laeta*, *Epilobium angustifolium*, *Juncus articulatus*, *Scirpus sylvaticus*, etc.;
- prezența elementelor europene și central europene evidențiază caracterul european al cormoflorei studiate. Elementele europene fiind cel mai bine reprezentate procentual în Cheile Brusturețului: *Cardamine pratensis* ssp. *matthioli*, *Carduus personata*, *Mycelis muralis*, *Mentha aquatica*, *Stellaria nemorum*, etc. iar cele central-europene la Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare: *Acinos alpinus*, *Digitalis grandiflora*, *Epipactis purpurata*, *Galium lucidum*, *Poa chaixii*, etc.;
- Ponderea semnificativă a elementelor comsopolite își face remarcată prezența în Mlaștina Hărman: *Eleocharis palustris*, *Equisetum ramosissimum*, *Juncus conglomeratus*, *Setaria pumila*, etc. și Tinovul Apa Roșie: *Deschampsia cespitosa*, *Holcus lanatus*, *Potentilla anserina*, etc.;
- Prezența elementelor alpic-carpatic, a elementelor cu caracter carpatic și carpatobalcanic este evidențiată în Cheile Brusturețului, Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare. Prezența unor specii, precum: *Campanula patula* ssp. *abietina*, *Campanula carpatica*, *Epilobium alpestre*, *Gentianella bulgarica*, *Hepatica transsilvanica*, *Leucanthemum rotundifolium*, *Plantago gentianoides*, *Silene nutans* ssp. *dubia*, *Soldanella hungarica*, *Thymus pullcherimus*, etc. imprimă un aspect particular, demonstrând intensitatea procesului de diferențiere și conservare a acestora din flora de origine terțiară sau pleistocenă (Alexiu, 2008).

3.2.2.5.5. Analiza ecologică a cormofitelor din siturile cercetate

Din punct de vedere al indicilor ecologici Ellenberg, specia *Ligularia sibirica* (L₇T₅U₇R₆N₀) este caracterizată ca fiind o plantă de lumină care poate suporta slab condițiile de umbrire, răspândită în zonele temperate pe soluri jilav-umede, moderat-slab acide, neutre sau chiar slab alcaline. Plasticitatea mare a speciei îi permite dezvoltarea în mai multe ecotopuri, nedepinzând de cantitatea de azot mineral din sol.

În ceea ce privește factorul lumină, plantele care suportă slab condițiile de umbrire treaptă, în care este inclusă și *Ligularia sibirica*, dețin ponderea cea mai mare din totalul florei analizate: *Achillea oxyloba* ssp. *schurii*, *Dactylorhiza maculata*, *Galium mollugo*. Acestea sunt urmate, cu o pondere considerabilă, de către elementele care suportă doar în mod excepțional, pentru scurt timp, condițiile de umbrire precum: *Calystegia sepium*, *Festuca rubra*, *Juncus effusus*.

Cerințele față de temperatură ale florei studiate sunt exprimate prin ponderea mare, în funcție de sit, a plantelor răspândite în etajul montan înalt: *Delphinium elatum* ssp. *elatum*, *Gymnocarpium robertianum*, *Luzula sylvatica*, în Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare. Speciile răspândite în etajele submontane și deluroase (*Euphrasia hirtella*, *Holcus lanatus*, *Molinia caerulea* ssp. *arundinacea*) alături de *Ligularia sibirica*, își fac simțită prezența în toate siturile, dar într-o pondere considerabilă doar la Cheile Brusturețului și Mlaștina Hărman. În funcție de cerințele florei studiate pentru temperatură, ponderea principală o dețin plantele euriterme precum: *Betula pendula*, *Eleocharis palustris* și *Hypericum tetrapterum*.

În funcție de umiditatea solului și de condițiile pedologice, din totalul florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica*, speciile cu preferințe pentru solurile moderat umede, reavăne (*Fragaria vesca*, *Leontodon autumnalis*, *Poa nemoralis*, etc.) dețin ponderea cea mai mare în Cheile Zănoagei, Scropoasa și Șapte Izvoare. Acestea sunt urmate de prezența semnificativă a ecotopurilor speciilor mezofile și mezo-higrofile, uneori chiar higrofile la Cheile Brusturețului și Tinovul Apa Roșie (*Gentiana asclepiadea*, *Lysimachia nummularia*, *Paris quadrifolia*, etc.). Totodată trebuie luată în considerare și ponderea semnificativă a plantelor pentru solurile jilav-umede și bine drenate (*Impatiens noli-tangere*, *Petasites kablikianum*, *Valeriana officinalis*) în care este încadrată specia *Ligularia sibirica*. Prezența ecotopurilor care permit dezvoltarea speciilor mezo-higrofile și higrofile, reprezentate într-o bună măsură la Mlaștina Hărman, este evidențiată prin categoria intermediară a speciilor: *Juncus articulatus*, *Primula farinosa*, *Thalictrum aquilegifolium*.

Cerințele florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica* din cadrul arealelor studiate, relevă ponderea mare a elementelor eurionice (*Myosotis scorpioides*, *Rumex obtusifolius*, *Vicia cracca*, etc.) și a celor răspândite pe solurile moderat-slab acide (*Asperula capitata*, *Pedicularis sceptrum-carolinum*, *Senecio hercynicus*, etc.).

Având în vedere rezerva de amoniu sau de nitrat din asociațiile integratoare, putem observa prezența speciilor cu preferințe ce variază de la solurile foarte sărace în azot mineral până la cele sărace în azot mineral: *Cirsium palustre*, *Epipactis palustris*, *Jurinea mollis*, *Viola epipsila*, etc.. Un procent însemnat îl au elementele eurinitrofile precum: *Carex remota*, *Scrophularia scopolii*, *Tussilago farfara*.

Datorită numărului mic de studii ce fac referire la halofilia speciilor, în literatura de specialitate au fost găsite informații doar pentru 10 specii care indică prezența elementelor pe solurile ce conțin ocazional cantități mici de săruri clorurice (*Epilobium hirsutum*, *Lythrum*

salicaria, *Potentilla anserina*, etc.) și pentru speciile oligohaline cu un conținut foarte sărac în săruri clorurice (*Festuca arundinacea*, *Pulicaria dysenterica*, *Tetragonolobus maritimus*, etc.).

3.2.2.5.6. Analiza cariologică a speciilor floristice din siturile cercetate

Au fost luate în calcul toate speciile de plante însoțitoare a relictului *Ligularia sibirica* cu număr de cromozomi cunoscut, din Cheile Brusturețului, Cheile Zănoagei, Scropoasa, Șapte Izvoare, Mlaștina Hărman și Tinovul Apa Roșie. În urma analizei spectrului cariologic, putem observa că speciile poliploide (aproximativ 50% din totalul florei) se distanțează destul de mult de cele diploide și cele diplo-poliploide. Frecvența speciilor poliploide poate fi datorată presiunii factorului antro-po-zoogen, precum și a competitivității interspecifică, în timp ce ponderea considerabilă a elementelor diploide asigură potențialul genetic pentru evoluție, exprimând vechimea teritoriului studiat și, totodată, o bază pentru dezvoltarea speciilor poliploide (Cristea, 2004).

Indice de diploidie Pignatti pentru ansamblul florei însoțitoare speciei relicte *Ligularia sibirica* are valoarea de 0.79, putându-se remarca prezența unor specii vechi diploide. În calculul acestui indice au fost excluse speciile diplo-poliploide, acestea având un statut cariologic variabil (Mihăilescu, 2001).

CAPITOLUL 5

COMPOZIȚIA CHIMICĂ, ANTIOXIDANTĂ ȘI ACTIVITATEA CITOGENETICĂ A EXTRACTELOR OBTINUTE DIN RĂDĂCINILE ȘI RIZOMII DE *LIGULARIA SIBIRICA* (L.). CASS.

INTRODUCERE

Speciile aparținente genului *Ligularia* dețin multe proprietăți în ceea ce privește activitatea biologică, precum: proprietăți antibacteriene, citotoxice, activitate inhibitoare pentru proteină tirozin fosfatază, proprietăți de insecticid, antihepatotoxicitate și activități antioxidative, antitrombonice și anticoagulante. Studiile farmaceutice precum și cele chimice, efectuate asupra speciilor aparținente genului *Ligularia*, demonstrează prezența unor constituenți specifici precum sesquiterpenele (Ling *et al.*, 2016).

Datorită faptului că nu există în prezent o situație clară în ceea ce privește distribuția populațiilor precum și densitatea indivizilor de *L. sibirica*, la care se adaugă și gradul de protecție al speciei prin Convenția de la Berna, completată de statusul UICN și Directiva Habitate (Bilz *et al.*, 2011; Brînzan *et al.*, 2013; Kadlečík, 2014; Mihăilescu *et al.*, 2015), materialul utilizat pentru studiul aferent a fost colectat după efectuarea unui studiu ecologic calitativ și cantitativ asupra speciei, din trei situri diferite precum: Tinovul Apa Roșie, Mlaștina Hărman și Cheile Zănoagei. Materialul a fost colectat în probe minime, pentru a nu afecta comunitățile existente, obiectivul final al studiului fiind reprezentat de determinarea rentabilității introducerii în cultură ca specie medicinală.

Scopul prezentei lucrări, urmărește determinarea compușilor chimici și a capacității antioxidante, fiind completat de evaluarea potențialului fitoterapeutic al extractelor obținute din rizomii și rădăcinile de *L. sibirica* (L.) Cass, începând prin evaluarea efectelor citogenetice utilizând testul *in vitro* cu *Allium cepa* L.

5.1. MATERIALE ȘI METODE

5.1.1. Compoziția chimică, antioxidantă și activitatea citogenetică a extractelor de *Ligularia sibirica*

S-au pregătit 5 probe de extract: Mlaștina Hărman – 1, Cheile Zănoagei – 2 și Tinovul Apa Roșie – 3 prin extracția cu fluide supercritice SFE cu CO₂ și extracție cu fluide supercritice la care s-a adăugat cosolventul EtOH, extracție reprezentată de proba 4, Tinovul Apa Roșie – 4; ultima probă a fost reprezentată de extracția cu etanol absolut, Tinovul Apa Roșie – 5. Extractele obținute în urma fiecărui protocol, au fost caracterizate prin analiza capacității antioxidante: compușii fenolici totali, flavonoidele totale, DPPH, Echivalentul Capacității Antioxidante Trolox (TEAC). Grupurile funcționale au fost analizate prin utilizarea Spectroscopiei în infraroșu cu transformata Fourier FT-IR între regiunile 4000-400 cm⁻¹. Extractul etanolic, reprezentat de proba 5, s-a utilizat pentru evaluarea activității citogenetice.

5.1.2. Material vegetal

Rădăcinile și rizomii de *L. sibirica* au fost recoltați în august 2016, din 4 situri distincte, atât în ceea ce privește habitatul, condițiile pedo-climatice dar și un grad asemănător din punct de vedere antropogenic: Cheile Zănoagei, Mlaștina Hărman și Tinovul Apa Roșie. Rizomii proaspăt recoltați, au fost cântăriți și spălați cu apa de la robinet, ulterior au fost clătiți bine cu apă distilată și uscați pe un pat de șervet de hârtie la temperatura camerei.

5.1.3. Reactivi și substanțe chimice

Reactivii utilizați au fost: Sigma Aldrich, acid galic monohidrat ACS ≥ 98% și reactivul fenolic Folin-Ciocalteu cu o concentrație de 2M. Etanolul (grad HPLC) s-a obținut din Merck Co. (Darmstadt, Germania). Apa utilizată pe tot parcursul protocoalelor de lucru a fost dublu-distilată. Dioxidul de carbon (cu o puritate de 99.5%) utilizat în extracția SFE și restul reagenților utilizați în experimente au fost procurați din diverse surse comerciale. Cântărirea probelor s-a efectuat utilizând o balanță analitică Shimadzu Corporation cu o precizie de 0.1 mg.

5.1.4. Proceduri de extracție

Extractele etanolice au fost pregătite prin amestecarea a 5 g de material vegetal, rădăcini și rizomi din fiecare sit, în 50 mL etanol absolut, menținute la temperatura camerei (22°C). Extractele obținute au fost filtrate utilizând hârtia de filtru Whatman no.1, filtratul obținut fiind utilizat, în determinarea potențialului citotoxic al speciei, respectiv în testul cu *Allium cepa*.

Echipamentul utilizat pentru obținerea extractelor SFE, a fost reprezentat de unitatea pilot numită SFT-10 Supercritical Fluid Extractor (Supercritical Fluid Technologies, Inc.).

5.1.4.1. Evaluarea compoziției chimice a extractelor de rizom și rădăcini prin analiza FT-MIR

Extractele de *L. sibirica* au fost evaluate pentru compoziția lor chimică: extract cu CO₂ (1, 2, 3), CO₂ și etanol (4), extract etanolic (5). Pentru Spectroscopia Infraroșie cu Transformare Fourier (FTIR) a fost utilizat un spectrometru Jasco 6300. Un accesoriu ATR echipat cu un cristal de diamant (Pike Technologies) a fost utilizat pentru eșantionare. Datele spectrale au fost procesate cu software-ul JASCO Spectra Manager II. Probele au fost supuse la 100 de scanări cu o rezoluție de 4 cm⁻¹ utilizând apodizarea Cosine în regiunile cu o frecvență de 4000-400 cm⁻¹.

5.1.4.2. Compuși fenolici totali – metodă de analiză

Determinarea fenolului total s-a realizat prin metoda Folin-Ciocalteu (TPC) (Singleton *et al.*, 1975). Conținutul total de fenoli (TPC) a fost realizat prin amestecarea probei standard (acid galic) cu o cantitate de reactiv Folin-Ciocalteu și cu o cantitate de carbonat de sodiu. S-a măsurat absorbanta cu spectrofotometrul Shimadzu UV-1800 și s-a obținut curba de calibrare cu soluții standard de acid galic. Rezultatele au fost exprimate în mg echivalenți de acidului galic (GAE) în 100 g de rizomi și rădăcini.

5.1.4.3. Conținutul total de flavonoizi – analiză

Conținutul total de flavonoide a fost determinat prin metoda clorurii de aluminiu. (Woisky *et al.*, 1988). După agitare și incubare la temperatura camerei, absorbanta a fost măsurată cu spectrometrul Shimadzu UV-1800. Pentru soluția martor s-a folosit în loc de clorură de aluminiu aceeași cantitate de metanol. Rezultatele au fost exprimate în mg de quercetin (QE) / 100 g de rizom și rădăcină.

5.1.4.4. Determinarea activității antioxidante – metodă de analiză

5.1.4.4.1. Activitatea antioxidantă DPPH

Analiza DPPH, raportată mai întâi de către Brand-Williams și colegii (Brand-Williams *et al.*, 1995), a fost utilizată pentru a determina activitatea de curățare radicală a extractului etanolic din *L. sibirica*. Metoda se bazează pe măsurarea capacității de reducere a antioxidanților față de acest radical. Capacitatea antioxidantă poate fi evaluată prin măsurarea scăderii absorbantei DPPH.

Rezultatele au fost exprimate ca IC50 (concentrația de extract care inhibă activitatea DPPH cu 50%). După incubare la întuneric, absorbția soluțiilor rezultate a fost măsurată folosind Spectrofotometrul UV-VIS Jasco 730 (Kedare *et al.*, 2011; Bukhari *et al.*, 2014).

5.1.4.4.2. Testul TEAC (Capacitatea echivalentă antioxidantă Trolox)

O soluție stoc de ABTS •+ a fost obținută după reacția compusului chimic ABTS cu persulfat de potasiu (Pellegrini *et al.*, 2003). Soluția ABTS•+ utilizată a fost preparată prin diluarea acestei soluții cu etanol până când absorbanta a fost de aproximativ 0,70, conform Pellegrini (Pellegrini *et al.*, 2003). Curba de calibrare a fost realizată cu Trolox, iar rezultatele au fost efectuate în mmol de Trolox pe rizomi și rădăcină.

5.1.4.5. Evaluarea efectelor citogenetice ale extractului de etanol de *L. sibirica* – metodă de analiză

Efectele citogenetice ale extractelor etanolice de *L. sibirica*, au fost evaluate prin prisma modificărilor indicelui mitotic și al fazelor diviziunii mitotice (profază, metafază, anafază, telofază), precum și a frecvenței aberațiilor cromozomiale, respectiv a anomaliilor nucleare induse în celulele meristemate radiculare de *Allium cepa* L..

Bulbii de ceapă (o varietate locală), au fost verificați pentru îndeplinirea standardelor fitosanitare. Pentru expunerea primordiilor radiculare, catafilele au fost îndepărtate cu grijă, iar bulbii au fost plasați în recipiente, cu tulpina discoidală în contact cu apă distilată. Analiza fitotoxicității a fost efectuată prin expunerea statică a bulbilor de ceapă la acțiunea apei distilate și a unor concentrații variate ale extractelor etanolice de *L. sibirica*.

Pentru analiza citogenetică au fost folosite rădăcini cu lungimea de aproximativ 10 mm. Pentru fiecare variantă experimentală un număr de 5 rădăcini au fost supuse unei hidrolize

atenuate. Pe lame de microscop au fost secționare vârfurile meristemate, care au fost utilizate pentru a efectua preparate microscopice prin tehnica squash.

Preparatele microscopice au fost analizate la un microscop Olympus CX-31, la o mărire de 400×. Analiza microscopică a constat în determinarea numărului de celule aflate în diferite stadii ale mitozei, a frecvenței aberațiilor cromozomiale și nucleare raportat la un număr de aproximativ 3000 de celule pentru fiecare probă experimentală. În funcție de numărul total al celulelor aflate în mitoză a fost determinat raportul procentual al celulelor aflate în profază, metafază, anafază sau telofază.

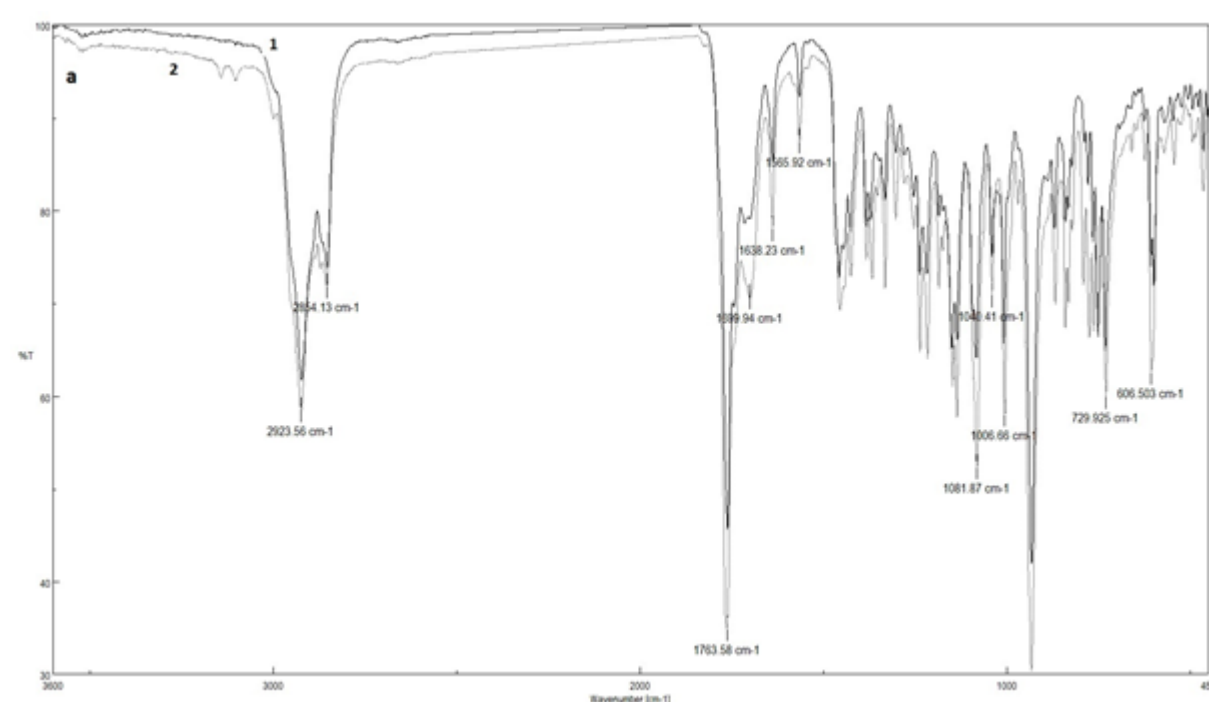
Pentru fiecare variantă experimentală au fost analizate aproximativ 3000 de celule. Semnificația statistică și diferențele semnificative între variabile au fost determinate folosind analiza de varianță (metoda – one way ANOVA) și respectiv, testul Duncan pentru comparații multiple.

5.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.2.1. Evaluarea compoziției chimice a extractelor prin metoda FT-MIR

S-au înregistrat spectrele FT-MIR (4000-400 cm⁻¹), astfel pentru fiecare extract au fost înregistrate numărul de unde au fost luate în considerare și intensitățile specifice pentru a se prezenta spectrele FTIR-ATR ale extractelor alcoolice și cu CO₂ (Figura 1), precum și benzile de absorbție FT-IR pentru extractele de rizomi și rădăcini. Alocările vibraționale pentru extracte au fost comparate cu datele din literatură (Szymanska-Chargot *et Zdune*, 2013). Identificarea grupurilor funcționale s-a bazat pe vârfurile FTIR atribuite vibrațiilor de întindere și îndoire (Zăvoi *et al.*, 2011).

Spectrele prezintă relativ mai multe benzi în regiunea de 400-700 cm⁻¹. Constituenții anorganici pot fi observați în regiunea dintre 470-480 și 530-540 cm⁻¹. Variația se poate datora diferențelor dintre procedurile de extracție și de purificare (Fong *et al.*, 2006).



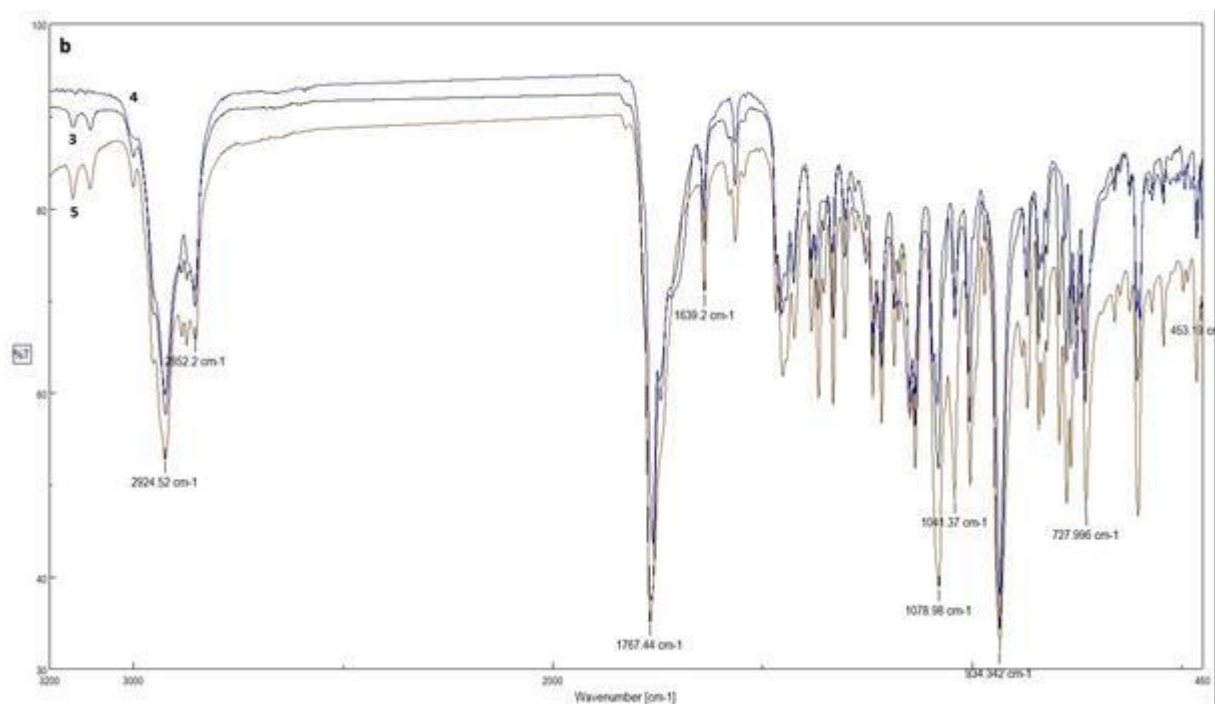


Figura 1. Amprenta FTIR a extractelor obținute din *L. sibirica* (L.) Cass.: **a** extract de la Mlaștina Hărman 1, extract de la Cheile Zănoagei 2, **b** extract de la Tinovul Apa Roșie cu CO₂ 3; CO₂ cu etanol 4 și extract etanolic 5

5.2.2. Determinarea activității antioxidante

Există câteva studii despre compușii cu activitate antioxidantă din genul *Ligularia*. Potrivit acestora, *L. fischeri* a arătat un conținut total ridicat de fenol ($215,8 \pm 14,2$ mg acid galic echivalent/gram) cu un conținut scăzut al totalului de flavonoide ($86,9 \pm 3,8$ mg quercetină echivalent/gram) (Lee *et al.*, 2013). În 2010 Liu (Liu *et al.*, 2010) a raportat izolarea și elucidarea structurală a sesquiterpenelor de tip furanoeremofilan și a derivatelor de benzofuran (o parte din acestea cu grupe fenolice) din *L. veitchiana* și unele rezultate despre activitatea biologică. S-a demonstrat că *L. macrophylla* conține cel puțin două flavonoide: 6-acetil-8-metoxi-2,3-dimetilchromen-4-one și 4-14 (2S)-3'-hidroxi-5', 7-dimetoxiflavanonă în rădăcină și rizom. De asemenea, în rădăcina de *L. duciformis* au fost identificați unii derivați de alcool sinapilic și alcool coniferilic, cu activități antioxidante cunoscute (Yang *et al.*, 2011). Din cunoștințele noastre, în literatură nu au fost descriși fenoli, flavonoide sau alți compuși cu activitate antioxidantă din *L. sibirica*.

În urma studiilor efectuate, cele mai bune rezultate obținute au fost pentru extracția supercritică de CO₂ cu cosolvent (EtOH) pentru fenoli totali și flavonoide totale din *L. sibirica*, așa cum era de așteptat.

Activitatea de curățare a radicalilor liberi, evaluată utilizând testul DPPH, a evidențiat o bună activitate antiradicală pentru extractul etanolic. Inhibarea procentuală (procentul inhibitor) a DPPH crește cu timpul de reacție și cu cantitatea de extract.

5.2.3. Evaluarea efectelor citogenetice ale extractului etanolic de *L. sibirica*

Pentru fiecare variantă experimentală, rezultatele au fost comparate cu varianta martor. Conform interpretării statistice a rezultatelor microscopice, extractele de *L. sibirica* au determinat reducerea semnificativă a frecvenței celulelor meristemice aflate în mitoză. În comparație cu martorul, extractele de *L. sibirica* au avut un efect mitoinhibitor statistic

semnificativ, invers corelat cu concentrația acestora. Interpretarea de ansamblu a rezultatelor microscopice a relevat faptul că variația indicelui mitotic a fost independentă de variabila timp.

Reducerea indicelui mitotic în vârfurile meristemate radiculare de ceapă indică prezența substanțelor bioactive cu potențial chemoterapeutic.

Efectele extractelor de *L. sibirica* asupra distribuției fazelor diviziunii mitotice în vârfurile meristemate de ceapă au fost rezumate în această secțiune. Frecvența profazelor și metafazelor a variat semnificativ, în funcție de concentrația testată a extractului. Comparativ cu martorul, extractele de *L. sibirica* au indus creșterea și creșterea semnificativă a frecvenței metafazelor.

Interpretarea de ansamblu a rezultatelor evidențiază totodată o încetinire globală a progresiei celulare în mitoză (Yuet-Ping *et al.*, 2012). După Nieva-Moreno *et al.* (2005), citat de Stojković *et al.* (2013), principalele mecanisme de chemoprevenție a cancerului sunt antimutageneza și antiproliferarea sau antiprogresia mitotică.

O recenzie amplă realizată de Yang *et al.* în 2011, precum și alte studii mai recente (Dong *et al.*, 2015) arată că dintre constituenții chimici bioactivi ai speciilor de *Ligularia* cele mai comune tipuri fitochimice (phytochemical type) sunt sesquiterpenele, care au demonstrat o puternică activitate citotoxică sau inhibitorie asupra unor linii tumorale (Wu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010, citați de Yang *et al.*, 2011).

Printre compușii volatili identificați de Yang *et al.* 2011 și Kapás *et al.* 2009, prin cromatografia de gaze cu detecție spectrofotometrică în extractele de *L. sibirica* obținute prin hidrodistilare asistată de microunde, au fost sabinene, limonene și terpinolene (monoterpenoide), precum și alcaloizi care au fost cel mai probabil tussilagine și iso-tussilagine. În studiul realizat de noi, efectul statmochinetic poate fi atribuit acestor terpenoide. Multe dintre terpenoidele izolate din surse naturale au efecte chemopreventive (Akihisa *et al.*, 2003).

De altfel, analiza FT-MIR a evidențiat existența grupărilor OH caracteristice fenolilor cărora le poate fi atribuită activitatea genoprotectoare. Stresul oxidativ al ADN poate contribui la formarea unei pauze în secțiune sau la oxidarea bazelor putinice sau pirimidinice, inducând o instabilitate a genomului și implicit dezvoltarea tumorilor canceroase (Chobotokova, 2009). Fenolii activi din punct de vedere biologic sunt recunoscuți pentru proprietățile antioxidante exercitate prin absorbția radicalilor liberi (Shahidi *et al.* Ambigaipalan, 2015; Hidalgo *et al.* Almajano, 2017), precum și pentru spectrul larg al acțiunilor biologice și fiziologice (Durazzo, 2017).

Efectul mitoinhibitor evidențiat prin reducerea frecvenței celulelor în mitoză a fost susținut de ponderea ridicată a C-mitozei, care indică perturbarea formării sau organizării fusului de diviziune (spindle) sub acțiunea extractelor de *L. sibirica*.

Totuși, aberațiile nucleare identificate în celulele meristemate radiculare expuse tartamentului cu extracte de *L. sibirica* au fost mult mai variate și au avut o frecvență mai ridicată, comparativ cu aberațiile cromozomiale. Anomaliile nucleare definte de alterările morfologice ale nucleului în interfază, precum micronuclei, muguri nucleari (nuclear bds), nucleii cu formă alterată pot fi un indicator al unor procese precum moartea celulară sau *tumorigenesis* (Webster *et al.*, 2009; Nefic *et al.*, 2013).

Mai mult, aberațiile cromozomiale și anomaliile nucleare identificate prin analiza microscopică sunt indicative ale efectelor clastogenice (clastogenic effects) și a leziunilor genotoxice (genotoxic damage). În acest context, pentru o valorificare cât mai profundă a potențialului acestei specii se impun studii suplimentare *in vitro* și *in vivo*, care să vizeze condițiile de obținere a extractelor, concentrația extractelor și timpul de expunere.

CAPITOLUL 6

EFECTELE STRESULUI SALIN ȘI HIDRIC ASUPRA SPECIEI RELICTE *LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS.

INTRODUCERE

Schimbările climatice și activitățile antropice sporesc severitatea factorilor de stres din mediu, care afectează distribuția și supraviețuirea plantelor în diferite habitate. *Ligularia sibirica* (L.) Cass. este un relict postglacial puternic afectat de aceste schimbări, în măsura în care este considerat o specie pe cale de dispariție critică în Europa. Pe lângă problemele legate de biodiversitate, *L. sibirica* are o importanță economică, ca plantă ornamentală și medicină.

Au fost analizate mai multe răspunsuri fiziologice și biochimice ale speciei *L. sibirica* la tratamentele cu apă controlată și la tratamentele de stres la sare, pentru a obține o anumită perspectivă asupra posibilelor mecanisme de toleranță la această specie.

6.1. MATERIALE ȘI METODE

6.1.1. Materialul genetic luat în studiu

Probele de semințe au fost recoltate din 3 situri distincte, atât în ceea ce privește habitatul, condițiile pedo-climatice, cât și ponderea factorului antropogenic: *Mlaștina Hărman*, *Cheile Zănoagei* și *Tinovul Apa Roșie*. Prima populație luată în studiu este reprezentată de Mlaștina Hărman, o mlaștină de tip eutrof care se află localizată în zona colinară a județului Brașov, la o altitudine de 520 m. Aceasta este urmată de populația a doua, care a vizat zonele de vegetație herbacee situate de-a lungul malurilor râului Ialomița din Cheile Zănoagei din județul Dâmbovița, la o altitudine de 1329 m. Ultima populație luată în studiu este cea din cadrul mlaștinii oligotrofe de la Tinovul Apa Roșie, specia relictă fiind situată în extremitatea nordică a acesteia, la marginea eutrofă a sitului de pe teritoriul județului Covasna, la o altitudine de 996 m.

Deținerea informațiilor de ordin climatologic ROCADA (precipitațiile, umiditatea relativă, temperatura și temperatura solului), poate reprezenta un real ajutor pentru interpretarea rezultatelor obținute în urma stresului hidric efectuat în mod controlat, precum și pentru obținerea informațiilor referitoare la toleranța speciei la condițiile de secetă.

Studiile agrochimice furnizează informații cu privire la principalii macronutrienți (azot, fosfor, potasiu, calciu și magneziu) care în funcție de forma prezentă în sol pot furniza informații cu privire la disponibilitatea unui nutrient ca hrană directă pentru speciile vegetale. Datele agrochimice utilizate în această lucrare au fost obținute prin colaborarea cu Alchimex, București.

Probele de sol au fost recoltate din cadrul fiecărui sit studiat având în vedere asociațiile în care specia *Ligularia sibirica* a fost identificată.

Având în vedere faptul că specia *Ligularia sibirica* (L.) Cass. are perioada de anteză, în România, în decursul lunilor iulie și august (Sârbu *et al.*, 2013), semințele au fost recoltate la sfârșitul lunii septembrie 2015, de pe 5 tulpini florifere alese aleatoriu din cadrul fiecărei populații. Până în momentul utilizării, materialul a fost păstrat în pungi cu silica gel la temperatura camerei.

Ulterior, semințele au fost clătite cu apă Milli-Q (deionizată) și au fost lăsate să se usuce pe hârtie de filtru la temperatura camerei. Germinația a avut loc în cutii Petri standard în camera

de creștere la o temperatură de 25°C. Semințele au început să germineze la un interval de 9-10 zile pentru cele trei populații luate în studiu. După 7 zile de la germinare, plântuțele au fost transplantate în tăvi alveolare și, ulterior, după 12 zile în ghivece de 0.5 litri ($\varnothing = 11$ cm), pe un substrat umed alcătuit din: turbă, perlit și vermiculit, unde au fost menținute timp de 12 zile.

Tratamentele saline și cele cu stres hidric au fost aplicate la 6 săptămâni de la transplantarea din vasele Petri în ghivece. Pentru experimentele în care a fost aplicat stresul la sare, plantele au fost udate din 5 în 5 zile o soluție apoasă de NaCl. Tratamentul la stres hidric a constat în sistarea completă a irigației. Plantele care nu au fost supuse nici unui stres au fost udate în paralel doar cu soluție Hoagland. Toate experimentele au fost efectuate într-o cameră cu mediu controlat din cadrul serelor Institutului de Biologie Moleculară și Celulară a Plantelor din Valencia, Spania.

6.1.2. Analiza solului

După cele trei săptămâni de tratament, conductivitatea electrică (EC) și pH-ul solului au fost măsurate pentru plantele supuse tratamentelor prin utilizarea unui conductometru și a unui pH-metru. Probele de sol au fost prelevate din ghivecele aferente plantelor cu același tratament în flacoane de 15 ml.

6.1.3. Procentul de apă conținut

După finalizarea tratamentelor, parametrii de creștere au fost mășurați pentru partea aeriană a fiecărei plante constituită din rozeta de frunze. Măsurarea parametrilor a inclus: numărul de frunze (NL), greutatea în stare proaspătă (FW), la care s-a adăugat măsurarea procentului de apă conținut (WC%).

6.1.4. Determinarea conținutului în ioni la nivelul frunzelor și al rădăcinilor

Conținutul de ioni de potasiu (K^+), sodiu (Na^+) și clor (Cl^-) a fost determinat pentru frunzele și rădăcina plantelor luate în studiu. Pentru analiza ionilor, suspensia analizată a fost pregătită astfel: probele au fost uscate timp de o zi la etuvă la temperatura de 65°C. S-a utilizat o cantitate de material uscat mărunțit prin intermediul bilelor metalice, după care a fost adăugată apă Mili-Q (deionizată). La finalul procedurii suspensia a fost centrifugată timp de 10 minute. Rezultatele au fost exprimate în $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$.

6.1.5. Cuantificarea osmoliților

Referitor la conținutul în osmoliți, a fost analizat conținutul în prolină care a avut la bază folosirea metodei descrisă de Bates *et al.* (1973) cu modificările ulterioare, iar analizarea conținutului în zaharuri totale a fost determinat prin tehnica descrisă de către Dubois *et al.* (1956).

- **Prolina** a fost extrasă cu acid sulfo-salicilic din materialul uscat. Probele obținute au stat pe baie de apă la 100°C. Reacția a fost oprită prin îndepărtarea probelor de pe baia de apă și așezarea acestora într-o tavă cu gheață, ulterior proba fiind extrasă cu două volume de toluen (1000 μl). Concentrația de prolină a fost exprimată în $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$.
- **Conținutul în zaharuri totale** a fost cuantificat prin utilizarea metodei descrisă de către Dubois *et al.* (1956). Materialul uscat a fost măcinat și amestecat cu metanol, după care a fost ținut pe un agitator și centrifugat. Au fost create probe de 50 μl de extract la care s-au adăugat apă Mili-Q, fenol și acid sulfuric. Fiecare probă a fost agitată timp de câteva

secunde și s-a lăsat la temperatura camerei, după care absorbanta a fost măsurată la spectrofotometru.

6.1.6. Malondialdehida (MDA – un biomarker al stresului oxidativ)

Malondialdehida a fost extrasă din materialul vegetal uscat măcinat și amestecat cu metanol, după care a fost ținut pe un agitator și centrifugat la timp de 15 minute. Conținutul de MDA a fost determinat conform metodei descrise de către Hodges *et al.* (1999) ca o indicație a peroxidării lipidelor în frunze. Toate probele incluzând și proba martor au fost lăsate în baie de apă la 95°C, reacția fiind oprită ulterior prin așezarea acestora pe gheață. Absorbanta supernatantului exprimată în $\text{nmol g}^{-1}\text{DW}$.

6.1.7. Antioxidanți non-enzimatici

Dintre antioxidanții non-enzimatici, pentru materialul obținut au fost analizați: compușii fenolici totali determinați conform protocolului descris de Blainski *et al.* (2013) și conținutul în flavonoide cuantificat prin metoda descrisă de către Zhishen *et al.* (1999). Pentru ambele tipuri de antioxidanți au fost utilizate extractele obținute din material vegetal uscat, măcinat și amestecat cu metanol, după care a fost ținut pe un agitator și centrifugat timp de 15 minute.

- **Compușii fenolici totali** au fost cuantificați prin intermediul reactivului Folin-Ciocalteu. Astfel, pentru efectuarea probelor a fost utilizat extract metanolic, la care s-au adăugat apă Mili-Q și reactiv Folin-Ciocalteu. După centrifugare supernatantul a fost lăsat la temperatura camerei. Probele au fost centrifugate și ținute la întuneric înainte de a se măsura densitatea optică. Acidul Galic s-a folosit pentru curba etalon și valoarea finală a fost exprimată în miligrame echivalent acid Galic ($\text{mg. eq. GA. g}^{-1}\text{DW}$).
- Conținutul în **flavonoide** a fost determinat prin următoarea metodă: la 100 μl extract s-au adăugat metanol, la acest amestec s-au adăugat apă Mili-Q și NaNO_2 . Curba etalon a fost reprezentată de catechină, valoarea finală fiind exprimată în $\text{mg. eg. C.g}^{-1}\text{DW}$.

6.1.8. Cuantificarea pigmentilor fotosintetici

Pigmenții fotosintetici au fost măsurați utilizând metoda descrisă de către Lichtenthaler și Welburn în 1983 astfel: materialul proaspăt a fost zdrobit în tuburile Eppendorf și diluat cu acetonă rece. Pentru luarea măsurătorilor probele au fost constituite din: supernatant și acetonă. Concentrația totală de carotenoizi, clorofila a și clorofila b au fost calculate și convertite ulterior în $\text{mg g}^{-1}\text{DW}$:

6.1.9. Analiza statistică

Datele statistice au fost analizate prin intermediul programului Statgraphics Centurion XVI pentru Windows. Semnificația diferențelor dintre tratamentele aplicate a fost evaluată utilizând ANOVA one-way. Testul post-hoc HSD Tukey a fost utilizat pentru a evidenția grupurile omogene, atunci când au fost comparate mai mult de două probe. Toate mediile prezentate în text au fost urmate de calculul deviației standard (SD) unde $n=2$.

6.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.2.1. Markeri morfologici și biochimici ai stresului salin pentru specia *Ligularia sibirica* (L.) Cass..

6.2.1.1. Analiza solului

Valorile conductivității electrice măsurate la sfârșitul fiecărui tratament, sunt similare pentru toate cele trei populații de *Ligularia sibirica*, salinitatea din sol crescând în paralel cu concentrația de NaCl aplicată. În cazul tratamentelor de stres hidric aplicate, nu s-au înregistrat modificări semnificative din punct de vedere al conductivității electrice, exact cum era de așteptat.

6.2.1.2. Procentul de apă conținut

Identificarea efectului factorilor de stres la plante este reprezentat în mare parte de inhibarea creșterii plantei, care poate fi cuantificată prin diferite măsurători precum: descreșterea numărului de frunze, măsurarea masei proaspete a frunzelor recoltate, măsurarea procentului de apă conținută la care se adaugă măsurarea lamei și a pețiolului.

În urma măsurătorilor realizate, poate fi observată descreșterea înălțimii plantei concomitent cu creșterea concentrației de sare. Populațiile 1 și 2 au înregistrat în urma măsurătorilor valori mai ridicate pentru plantele de tip control cât și pentru cele tratate cu concentrație maximă de NaCl.

O dată cu creșterea concentrației de sare și conținutul în apă a fost redus pentru cele trei populații pentru concentrația cea mai mare de NaCl. Diferențele nesemnificative în ceea ce privește conținutul în apă dintre cele trei populații reflectă mecanismul eficient prin care specia evită deshidratarea frunzelor în prezența concentrațiilor mari de sare.

6.2.1.3. Determinarea conținutului în ioni la nivelul frunzelor și al rădăcinilor (Anexa 7)

În prezent se cunoaște faptul că plantele reacționează la creșterea salinității solului prin activarea unor răspunsuri de bază care se suprapun cu răspunsurile la alte stresuri abiotice, precum stresul la secetă, la frig, la temperaturi înalte. Aceste răspunsuri includ transportul ionic și compartimentarea ionilor toxici în vacuole, acumularea de osmoliți în citozol, pentru menținerea echilibrului osmotic celular și sinteza metaboliților și proteinelor "protectoare" sau prin activarea sistemelor antioxidante.

Nivelul de Na^+ crește în rădăcinile și frunzele celor trei populații de *Ligularia sibirica*, odata cu creșterea concentrației de sare aplicată conform fiecărui tratament. Același tip de model de acumulare a Cl^- în rădăcini a fost observat pentru toate cele trei populații atingând concentrații minime pentru indivizii control din populația 3.

Prezența K^+ în rădăcini a scăzut semnificativ pentru tratamentele de NaCl comparativ cu cel de control. Raportul K^+/Na^+ înregistrat în rădăcinile plantelor control a fost mai mare pentru populația de la Mlaștina Hărman decât cea de la Cheile Zănoagei. Aceste valori au crescut o dată cu aplicarea tratamentelor de NaCl asupra speciei *Ligularia sibirica*. Prezența ionilor de K^+ la nivelul frunzelor nu prezintă diferențe mari între control și tratamentul cu concentrație maximă de NaCl.

6.2.1.4. Cuantificarea osmoliților

Nivelul osmolitelor precum prolina și totalul zaharurilor solubile au fost determinate prin intermediul frunzelor de *Ligularia sibirica*, după ce tratamentul cu NaCl a luat sfârșit

Acumularea indusă de sare a celor doi dizolvanți compatibili a fost observată în ambele cazuri, cu mici diferențe de ordin cantitativ prezente pentru fiecare populație. Cea mai mare creștere a nivelului de prolină a fost observată la populația 2, pentru speciile tratate cu soluție de NaCl. Cel mai mic nivel de prolină a fost înregistrat de probele de la populația 3 pentru tratamentul cel mai mare cu NaCl.

În ceea ce privește conținutul în zaharuri totale solubile, acestea au crescut urmând același model ca în cazul prolinei dar nu au prezentat diferențe considerabile între cele trei populații.

6.2.1.5. Malondiladehidă (MDA – un biomarker al stresului oxidativ)

Concentrația de MDA a fost utilizată ca un marker al stresului oxidativ în plante și în cadrul celor trei populații luate în studiu. Populația 1 nu a prezentat diferențe semnificative nici în control și nici în tratamentul cu cea mai mare concentrație de sare. Pentru populațiile 2 și 3 MDA poate fi considerat ca a fi un biomarker al stresului oxidativ.

6.2.1.6. Antioxidanți non-enzimatici

Concentrația flavonoizilor crește semnificativ pentru populația 1 și 2, în timp ce pentru populația 3, controlul nu prezintă diferențe semnificative față de concentrația cea mai mare în săruri aplicate.

Tratamentul de NaCl determină o concentrație de compuși totali fenolici aproape de două ori mai mare decât controlul pentru stresul aplicat populațiilor 1 și 2. Pentru populația 3, cea de la Tinovul Apa Roșie, nu au fost înregistrate modificări semnificative între control și cele 4 tipuri de tratamente de NaCl.

Măsurarea pigmentilor fotosintetici din frunzele de *Ligularia sibirica* nu a înregistrat o descreștere semnificativă pentru cele trei populații luate în studiu. Astfel, Clorofila a, Clorofila b și totalul carotenoizilor au înregistrat o scădere ușoară concomitent cu creșterea concentrației de sare pentru populația 3, în schimb, pentru primele două populații creșterea concentrației de sare a determinat mai degrabă o ușoară creștere a pigmentilor fotosintetici.

6.2.2. Markerii biochimici ai stresului hidric pentru specia *Ligularia sibirica* (L.) Cass.

6.2.2.1. Procentul de apă conținut

Aceiași parametri au fost măsurați pentru plantele care au fost supuse unui tratament de stres la lipsa apei, plantele nefiind udate timp de 3 săptămâni. Lipsa apei a inhibat creșterea înălțimii plantei, a pețiolului și a laminei. Masa proaspătă a descrescut comparativ cu cea a plantelor din control. Având în vedere acest criteriu populațiile de *Ligularia sibirica* sunt sensibile la lipsa apei, prezentând după tratament o reducere a masei pentru fiecare din cele trei populații studiate. Aceste rezultate ne indică faptul că toate cele 3 populații de *Ligularia sibirica* prezintă o rezistență scăzută la lipsa apei și o rezistență oarecum medie în condițiile de stres salin.

6.2.2.2. Determinarea conținutului în ioni la nivelul frunzelor și al rădăcinilor (ANEXA 7)

Cum era de așteptat, nivelul ionilor (Na^+ , Cl^- , K^+) nu a prezentat diferențe semnificative la plantele la care a fost aplicat stresul hidric în comparație cu cele din control.

6.2.2.3. Cuantificarea osmoliților

Cuantificarea osmoliților pentru indivizii din control și cei supuși stresului hidric relevă stresul acumulat în cele trei săptămâni de tratament. Astfel, concentrația de prolină a crescut cu mai mult de două ori în cazul indivizilor stresați hidric față de cei din control. Concentrația prolinei crește semnificativ în cazul stresului hidric pentru toate cele trei populații excelând în cazul populației 2.

Concentrația în zaharuri solubile totale a crescut semnificativ în cazul stresului hidric, excelând pentru populația 1.

6.2.2.5. Antioxidanți non-enzimatici

Totalul flavonoizilor și a compușilor total fenolici indică o creștere considerabilă pentru plantele supuse stresului hidric din populația 1 și 2, în timp ce populația 3 nu pare să fie afectată de stresul hidric, acesta din urmă neînregistrând o diferență semnificativă între control și stresul hidric.

6.2.2.6. Cuantificarea pigmentilor fotosintetici

Cuantificarea pigmentilor fotosintetici (clorofila a, clorofila b și totalul carotenoizilor) a evidențiat creșterea nivelului de pigmenți pentru toate cele trei populații luate în studiu supuse stresului hidric.

CAPITOLUL 7

MONITORIZAREA STĂRII DE CONSERVARE A SPECIEI

***LIGULARIA SIBIRICA* (L.) CASS.**

INTRODUCERE

Ca rezultat al degradării și distrugerii habitatelor, multe specii au devenit amenințate *in situ* și au nevoie în prezent de elaborarea unor planuri de management pentru conservare. Studiarea dinamicii populațiilor reflectă, mărimea, structura și distribuția populațiilor, precum și modul în care o populație se modifică prin migrare și indivizi noi (Rockwood, 2006; Onete, 2008).

Într-un mediu heterogen, plantele ocupă habitate variate cu un efect direct asupra ciclului de viață al fiecărui individ. Totuși în cadrul fiecărui habitat pot fi întâlnite populații locale numite deme, care împărtășesc aceeași rată demografică. Dispersia semințelor este considerată a fi o legătură particulară între diferitele tipuri de habitate dintr-un mediu heterogen (Cain et al., 2000; Garcia, 2003, 2008; Fyn et al., 2005; Onete 2008).

Obiectivul prezentului studiu este reprezentat de investigarea principalelor condiții de mediu ale siturilor în care este integrată specia relictă *Ligularia sibirica* (L.) Cass. și efectul lor asupra parametrilor morfologici ce acționează direct asupra mărimii populațiilor.

7.1. MATERIALE ȘI METODE

7.1.1. Descrierea speciei investigate

Ligularia sibirica este o specie erbacee perennă, datorită prezenței papusului înmulțirea speciei este anemofilă, având nevoie de condiții de lumină și umezeală pentru a germina. Condițiile necesare germinării semințelor se găsesc de-a lungul văilor râurilor din etajul montan

(Cheile Zănoagei), în mlaștinile eutrofe (Mlaștina Hărman) și în mlaștinile oligotrofe (Tinovul Apa Roșie).

Înflorirea propriu-zisă a speciei *Ligularia sibirica* are loc în anul 5, când vitalitatea individului este destul de dezvoltată pentru a susține tulpina floriferă. Funcția de înflorire persistă timp de 2-4 ani succesivi, după care rizomul se divide favorizând înmulțirea vegetativă cu un proces foarte lent de dezvoltare a rizomului de 14-18 mm pe an. De aceea populația este menținută prin înmulțirea prin semințe. Durata de viață a speciei este în medie de 6-9 ani. Specia poate fi afectată de sindromul Oscar, atunci când nu sunt îndeplinite condițiile favorabile de dezvoltare a indivizilor, aceștia păstrându-și caractere imature de-a lungul mai multor ani, fără nici un semn de dezvoltare. (Kobiv, 2005)

7.1.2. Descrierea condițiilor climatice și pedologice ale siturilor luate în studiu

Populațiile luate în studiu au fost din următoarele situri: Cheile Zănoagei, Mlaștina Hărman și Tinovul Apa Roșie. Populația de *Ligularia sibirica* de la Cheile Zănoagei se află localizată în zona de vegetație herbacee situată de-a lungul malurilor râului Ialomița. Studiul populațional a continuat cu Mlaștina Hărman - mlaștină de tip eutrotof care conservă numeroase specii relict, precum și cu Tinovul Apa Roșie - mlaștină de tip oligotrof.

Probele de sol au fost recoltate din cadrul fiecărui sit studiat având în vedere asociațiile în care specia *Ligularia sibirica* a fost identificată. Au fost recoltate 5-15 probe din fiecare sit la o adâncime de 10 – 35 cm. Probele recoltate au fost analizate la sediul Alchimex, București. În urma analizelor efectuate reiese faptul că:

- La Mlaștina Hărman turba activă de tip eutrof prezintă o aciditate moderată și o valoare mică de humus activ, la care se adaugă o concentrație considerabilă de amoniu.
- La Cheile Zănoagei solurile brune prezintă o aciditate mică spre neutră, cu o valoare foarte mică de humus activ și o concentrație mică de amoniu.
- La Tinovul Apa Roșie remarcăm prezența solurilor brun acide cu un pH slab acid, cu o concentrație mică de humus activ și cu o concentrație considerabilă de amoniu.

7.1.3. Metoda de analiză a populațiilor

Suprafețele de eșantionaj corespund fiecărui tip de asociație de pe teritoriul celor trei situri: Cheile Zănoagei, Mlaștina Hărman și Tinovul Apa Roșie. Descrierea propriu-zisă a asociațiilor a fost efectuată în capitolul 4 al prezentei lucrări. Indivizii de *Ligularia sibirica* au fost monitorizați în perioada august-septembrie 2016, care corespunde și perioadei de anteză a speciei în România.

Metoda de eșantionaj utilizată, este cea a releveelor fitosociologice, metodă concepută și perfecționată de școala floristică-fitocenologică de la Zürich – Montpellier. Eșantionajul fitocenozelor pe baza bogăției specifice și a proporției speciei *Ligularia sibirica* în fitocenozele integratoare, a urmărit analiza indicilor (Cristea, 2004):

- calitativi precum:
 - vitalitatea fitoindivizilor - s-a determinat prin efectuarea măsurătorilor organelor vegetative: frunză, tulpină, precum și a celor reproducătoare: inflorescența cu antodii;
 - starea fenologică (Ivan *et* Spiridon, 1983) - cuprinde succesiunea stadiilor de creștere și dezvoltare a speciilor de-a lungul perioadei de vegetație.

Starea fenologică cuprinde 5 faze: starea vegetativă, faza de butonizare (îmbobocire), faza de înflorire, faza de fructificare și faza de repaus.

➤ cantitativi: abundența.

O creștere viguroasă (o formare a organelor vegetative) și o dezvoltare armonioasă (o înflorire și fructificare abundentă) indică existența unui optim ecologic pentru populația unei specii vegetale. Scăderea vitalității (creșterii sau dezvoltării insuficiente) indică acțiunea unor factori limitativi de ordin antropic, climatologic sau edafic, care în timp pot afecta existența populației respective în structura fitocenozelor analizate (Cristea, 2004).

Vitalitatea indivizilor s-a analizat după metoda lui Braun-Blanquet (1964), vitalitatea fiind apreciată după următorii indici:

- Plantele cu creștere și dezvoltare normală;
- Plante cu creștere slabă sau luxuriantă, dar ciclul de dezvoltare este sub valorile normale (fructificare slabă);
- Plante care vegetează sărăcăcios, în care ciclul de dezvoltare nu se desfășoară în întregime;
- Plante care germinează, cresc, dar nu pot atinge stadiul de înmulțire.

Partea de statistică s-a realizat în programul Microsoft Excel utilizând ca etalon de comparație asociația în care specia prezintă cea mai mare vigoare, implicând totodată și starea optimă de conservare.

Localizarea fiecărei asociații a fost efectuată utilizând GPS-ul Trimble Juno SB handheld. Pentru întocmirea hărților toate datele au fost transferate în programul specializat ArcMap.

7.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

7.2.1. Descrierea populațiilor cercetate în funcție de caracterelor morfologice ale speciei *Ligularia sibirica* din fiecare sit

7.2.1.1. Cheile Zănoagei

Specia relictă *Ligularia sibirica* (L.) Cass. a fost studiată în cadrul Cheilor Zănoagei din Parcul Natural Bucegi în cadrul celor patru asociații studiate: *Ligulario sibiricae* - *Ribetum petraei*, *Cirsio waldsteini* - *Heracleetum transsilvanici*, *Asperulo capitatae* - *Seslerietum riigidae*, *Petasito-Cicerbicum*. Asociațiile *Cirsio waldsteini* - *Heracleetum transsilvanici* și *Petasito-Cicerbicum* sunt încadrate în habitatul Natura 2000, 6430 Comunități de lizieră cu ierburi înalte higrofile de la câmpie până în etajele montan și alpin. Astfel, au fost identificați 1191 de indivizi de *Ligularia sibirica*, ponderea cea mai mare de indivizi aparținând asociației *Petasito-Cicerbicum*, pe a cărei suprafață de 200 m² au fost identificați 448 de indivizi.

Vitalitatea indivizilor, analizată în urma măsurătorilor efectuate în teren a evidențiat faptul că indivizii din asociația *Petasito-Cicerbicum* au atins valorile cele mai ridicate din punct de vedere al mediei înălțimii tulpinii, respectiv 111.11 cm, care corespunde fizionomiei asociației.

Din punct de vedere al diametrului tulpinii, indivizii prezenți în asociația *Petasito-Cicerbicum* prezintă o vigoare mai ridicată decât indivizii prezenți în celelalte asociații.

Inflorescențele variază ca mărime în funcție de habitat, în timp ce numărul de antodii este echivalent în toate habitatele.

7.2.1.2. Mlaștina Hărman

Populația de *Ligularia sibirica* de la mlaștina eutrofă de la Hărman, a fost identificată în cadrul următoarelor patru asociații: *Cladietum marisci*, *Orchido-Schoenetum nigricantis*, *Junco effusi-Molinietum caeruleae*, *Lysimachio vulgaris-Filipenduletum ulmariae*. Asociațiile sunt încadrate în patru categorii de habitate Natura 2000: 7210* Mlaștini calcaroase cu *Cladium mariscus* și specii de *Caricion davallianae*, 7230 Mlaștini alcaline, 6410 Pajiști cu *Molinia* pe soluri calcaroase, turboase sau luto-argiloase (*Molinion caeruleae*), 6430 Comunități de lizieră cu ierburi înalte higrofile de la câmpie până în etajele montan și alpin. Asociația cu cea mai mare suprafață ocupată din sit (1211 m²) *Lysimachio vulgaris-Filipenduletum ulmariae*, deține și cel mai mare număr de indivizi (702).

Vitalitatea indivizilor de la Mlaștina Hărman s-a determinat prin efectuarea măsurătorilor organelor vegetative: frunză, tulpină, precum și a celor reproducătoare: inflorescența cu antodii. În urma măsurătorilor efectuate în teren, s-a putut observa faptul că indivizii din asociația *Lysimachio vulgaris-Filipenduletum ulmariae* au atins valorile medii cele mai ridicate din punct de vedere al înălțimii tulpinii, respectiv 170 cm. Acest fapt poate fi datorat fizionomiei asociației și totodată habitatului comunitar 6430 - Comunități de lizieră cu ierburi înalte higrofile.

Inflorescențele variază ca mărime în funcție de habitat, în timp ce numărul de antodii este echivalent în toate habitatele.

7.2.1.2. Tinovul Apa Roșie

Măsurătorile din teren, au permis identificarea speciei *Ligularia sibirica* în sit, dar și în extremitatea nordică a acestuia. Astfel, s-au înregistrat 3 asociații vegetale: *Caricetum rostratae*, *Lysimachio vulagris-Filipenduletum ulmariae* și *Junco-Caricetum fuscae*. Ultimele două asociații sunt corespondente condițiilor habitatului 6430 Comunități de lizieră cu ierburi înalte higrofile de la câmpie până în etajele montan și alpin. Din numărul total de 3052 de indivizi, asociația *Junco-Caricetum fuscae* deține un total de 2147 de indivizi repartizați pe o suprafață de 1003 m².

Vitalitatea indivizilor, analizată prin intermediul măsurătorilor efectuate în teren a evidențiat faptul că indivizii din asociația *Lysimachio vulgaris-Filipenduletum ulmariae* au atins valorile cele mai ridicate din punct de vedere al înălțimii tulpinii, respectiv 190.96 cm, valoare ce corespunde fizionomiei asociației și totodată habitatului comunitar 6430 - Comunități de lizieră cu ierburi înalte higrofile.

Având în vedere analizarea stării fenologice (Ivan et Spiridon, 1983) în asociația *Junco-Caricetum fuscae*, procentul de indivizi aflați în anteză (56.87%), depășește procentul de indivizi aflați în faza vegetativă (24.45%), ceea ce indică un stadiu de conservare adecvat.

CONCLUZII

- Genul *Ligularia* cuprinde specii adaptate diferitelor condiții climatice și de mediu de pe teritoriul continentului European și Asiatic. În urma materialului științific colectat ce cuprinde date despre *L. sibirica*, autorul a găsit un număr total de 168 de surse bibliografice, dintre care 109 aparțin României. Numărul materialelor științifice găsite în România este strâns corelat cu distribuția speciei *L. sibirica* în țară.
- La nivel European și Asiatic s-au efectuat preponderent studii de fitosociologie, genetică, biochimie, biotehnologie și fitopatologie asupra speciei *L. sibirica*. În țara noastră predomină studiile de natură taxonomică, parte a unor lucrări de floră, monografii, etc., care necesită a fi reactualizate.
- În urma studiului celor patru zone, se poate observa faptul că specia relictă *Ligularia sibirica* deține o plasticitate și adaptabilitate destul de amplă în ceea ce privește structura geomorfologică și climatică a unui teritoriu, caracteristică dobândită probabil o dată cu migrarea speciei din timpul perioadei glaciare.
- Având în vedere problema încălzirii globale, dezbătută frecvent în ultimul timp, un studiu recent efectuat de către Mânzu *et al.*, susține că specia *Ligularia sibirica* nu va fi afectată de încălzirea globală în următorii ani (Mânzu *et al.*, 2013).
- Dintr-un număr total de 367 taxoni identificați ca floră însoțitoare speciei relicte *Ligularia sibirica*, 4.9 % dintre aceștia sunt considerați a fi rari pentru flora României și 13.9% prezintă o apariție sporadică.
- Din totalul florei analizate, situl cu cel mai mare procent de specii relicte este Mlaștina Hărman 7.91%, în timp ce Tinovul apa Roșie deține cel mai mare procent de specii apărute sporadic 13.2% în flora României.
- Prin intermediul analizei taxonomice a florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica*, au fost identificați 367 de taxoni integrați în 201 genuri și 68 de familii. Familiile cu ponderea cea mai mare sunt: *Asteraceae* (39 sp.) și *Poaceae* (35 sp.).
- Prin intermediul analizei bioformelor, din cadrul florei însoțitoare speciei *Ligularia sibirica*, elementele hemicriptofite (65.40%) ocupă ponderea cea mai mare din covorul vegetal, reflectând prezența speciilor ierboase în cadrul pajiștilor adaptate unui climat cu deficit termic sau hidric.
- Prin intermediul analizei elementelor floristice ale fitocenozelor integratoare speciei *L. sibirica* din: Cheile Brustureului, Cheile Zănoagei, Scropoasa, Șapte Izvoare, Mlaștina Hărman și Tinovul Apa Rosie rezultă că fondul de bază al cormoflorei este evidențiat de către ponderea substanțială a elementelor eurasiatice pentru toate regiunile analizate, în care este integrată și specia de importanță comunitară *Ligularia sibirica*;
- Din punct de vedere al indicilor ecologici Ellenberg, specia *Ligularia sibirica* (L₇T₅U₇R₆N₀) este caracterizată ca fiind o plantă de lumină care poate suporta slab condițiile de umbră, răspândită în zonele temperate pe soluri jilav-umede, moderat-slab acide, neutre sau chiar slab alcaline. Plasticitatea mare a speciei permite dezvoltarea acesteia în mai multe ecotopuri, nedepinzând de cantitatea de azot mineral din sol.
- Distribuția speciilor este puternic influențată de factorul de umiditate, astfel în funcție de umiditatea solului și de condițiile pedologice, poate fi remarcată diversitatea preferințelor speciilor pentru 8 din cele 12 trepte de umiditate Ellenbeg, care permit instalarea ecotopurilor în siturile studiate.

- Cerințele florei însoțitoare speciei *L. sibirica* din cadrul arealelor studiate, relevă ponderea mare a elementelor răspândite pe solurile moderat-slab acide.
- Având în vedere rezerva de amoniu sau de nitrat din asociațiile integratoare speciei *L. sibirica*, putem observa ponderea semnificativă a speciilor cu preferințe de la solurile foarte sărace în azot mineral până la cele sărace în azot mineral.
- Prin intermediul spectrului cariologic putem observa că speciile poliploide se distanțează preponderent față de cele diploide și cele diplo-poliploide, Frecvența speciilor poliploide poate fi datorată presiunii factorului antropo-zoogen și datorită competitivității interspecifice
- Investigațiile realizate în teritoriu au permis identificarea a 11 asociații, încadrate în 6 clase de vegetație.
- Metodele de extracție utilizate pentru rădăcinile și rizomii de *Ligularia sibirica* au fost ecologice. Activitatea de curățare a radicalilor liberi (DPPH) a evidențiat o bună activitate antiradicală pentru extractul etanolic. Analiza FT-IR, arată prezența diferitelor grupări funcționale cum ar fi acizii carboxilici, aromaticele, alcaloizii, alcoolii și fenolii, în extractele de *L. sibirica*.
- Extractele de *L. sibirica* au demonstrat un puternic efect mitoinhibitor asupra celulelor meristemice radiculare ale *A. cepa* L. Aberațiile cromozomiale și anomaliile nucleare identificate prin analiza microscopică sunt bioindicatori ai efectelor clastogene și a daunelor genotoxice. Concentrațiile mai mari ale extractelor au avut un efect genoprotector, demonstrat prin reducerea frecvenței aberațiilor cromozomiale și a anomaliilor nucleare.
- Extractele de *L. sibirica* se dovedesc a fi un candidat potențial pentru tratamentul cancerului prin efectul statomochinetic, suplimentat de un efect genoprotector. Sunt necesare studii suplimentare de tipul *in vitro* și *in vivo* pentru a evalua potențialul antimutagen, antimitotic și anticancerigen al extractelor de *L. sibirica*, precum și pentru a le prezenta modul de acțiune. Acesta este primul studiu care evaluează efectele citogenetice ale extractelor de *L. sibirica* folosind *Allium cepa* L. ca organism de testare.
- Atât stresul la secetă cât și cel salin au avut un efect negativ asupra creșterii plantelor de *Ligularia sibirica*. În condițiile testate, inhibarea creșterii a fost mai puternică în cazul stresului la sare. Plantele tratate au arătat o creștere a nivelurilor de prolină și a zaharurilor solubile totale în special în cazul stresului salin. Conținuturile de MDA aproape că s-au dublat, iar antioxidanții fenolici au crescut semnificativ în cazul plantelor stresate din punct de vedere salin, dar nu și în cazul plantelor stresate hidric.
- Acumularea prolinei poate fi folosită ca un biomarker pentru stresul salin și hidric pentru specia *Ligularia sibirica*, împreună cu zaharurile solubile totale contribuind probabil la ajustarea osmotică în condiții de stres.
- Creșterea conținutului de antioxidanți fenolici pare să compenseze în oarecare măsură generarea stresului oxidativ indus de NaCl.
- Procentul de apă conținut indică faptul că toate cele trei populații de *Ligularia sibirica* prezintă o rezistență scăzută la lipsa apei și o rezistență oarecum medie în condițiile de stres salin.
- În urma stresului salin și hidric, toate cele trei populații analizate sunt puțin afectate din punct de vedere al degradării pigmentilor fotosintetici.

- Toleranța semnificativă a populațiilor 1 și 3 la stresul salin aplicat, indicată prin cuantificarea antioxidanți non-enzimatici și a prolinei, poate fi explicată prin concentrația mare de amoniu din cele două situri.
- Asociația care deține o vitalitate optimă a indivizilor de *L. sibirica* este *Lysimachio vulgaris-Filipenduletum ulmariae*, aceasta se află localizată atât la Mlaștina Hărman cât și la Tinovul Apa Roșie, situri care din punct de vedere climatic prezintă diferențe considerabile. Astfel, în urma rezultatelor obținute putem constata faptul că specia *Ligularia sibirica* prezintă o adaptabilitate destul de mare în ceea ce privește variabilele climatologice, fiind adaptată la temperaturi medii anuale caracteristice atât climatului de tip montan de la Tinovul Apa Roșie cât și celui de tip continental de la Mlaștina Hărman.
- Având în vedere că înmulțirea prin semințe este cea care asigură perpetuarea speciei, siturile care oferă cel mai bun grad de conservare a speciei, determinat prin intermediul vitalității indivizilor maturi, sunt Tinovul Apa Roșie și Mlaștina Hărman care dețin pe teritoriul lor indivizi în toate stadiile fenologice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., Aizen, M.A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecol. Lett.*, 9, 968–980.
2. Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H. (2003). Potentially cancer chemopreventive and anti-inflammatory terpenoids from natural sources. *Studies in Natural Products Chemistry*, 29, 73-126.
3. Alexiu, V., Stancu, D.I. (1995). Propunere de rezervație pe baza unui studiu fitocenologic în complexul de chei al Dâmboviței [Reservation proposal based on a phytocenological study in Dâmbovița's gorges complex]. *Naturalia, St. Cerc. Muz. Jud.*, Pitești, 1, 119-127.
4. Alexiu, V. (1999). Contribuții privind flora și vegetația de pe cursul superior al Argeșului [Contributions related to flora and vegetation on the upper course of Argeș river]. *Argesis Studii și Comunicări Seria Științele Naturii*, Muzeul Județean Argeș, Pitești, 8, 61-72.
5. Alexiu, V., Stancu, D.I. (2003). Carici remotae-Calthetum laetae Coldea (1972) 1978 ligularietosum sibiricae nova subass. in the Brusturet Gorges (Piatra Craiului). In O.G. Pop, eds, *Research in Piatra Craiului National Park* (Vol. 1, pp. 94-97). Brașov: Ed. Universității Transilvania, Brașov.
6. Alexiu, V. (2008). The main zoological categories of the Argeș county. *Contribuții Botanice*, Grădina Botanică "Alexandru Borza" Cluj-Napoca, XLIII, 11-16.
7. Alexiu, V., (2011). *Categorii zoologice din cormoflora județului Argeș* (pp. 16-234). Pitești: Edit. Paralela 45, Pitești.
8. Andersson-Kottö, I., Gairdner, A.E. (1931). Interspecific crosses in the Genus Dianthus. *Genetica*, 13 (1-2), 77-112.
9. Bănărescu, P., Boșcaiu, N. (1973). *Biogeografie perspectivă genetică și istorică* [Genetic and historical biogeographical perspective] (pp. 146-147). București: Ed. Științifică, București.
10. Beldie, Al. (1967). *Flora și vegetația Munților Bucegi* [The flora and vegetation of Bucegi Mountains] (pp. 280). București: Ed. Acad. R.S.R., București.
11. Bilz, M., Kell, S.P., Maxted, N., Lansdown, R.V. (2011). *European Red List of Vascular Plants* (pp. 101). Luxembourg: Publications Office of the European Union, Luxembourg.
12. Blainski, A., Lopes, G.C., de Mello, J.C.P. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense. *L. Molecules*, 18, 6852-6865.
13. Brînzan, T.(eds.), Bădărău, A.S., Murariu, D., Staicu, C., Patriche, N., Ciubuc, C., Hulea, D. (2013). *Catalogul habitatelor, speciilor și siturilor Natura 2000 în România* [Catalog of habitats, species and Natura 2000 sites in Romania] (pp. 143-786). București: Ed. Fundația Centrul Național pentru Dezvoltare Durabilă, București.
14. Brook, B.W., Sodhi, N.S., Bradshaw, C.J.A. (2008). Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology and Evolution*, 23, 453-460.
15. Bukhari, S.M., Feuerherm, A.J., Boulfrad, F., Zlatkovic, B., Johansen, B., Simic, N. (2014). Anti-inflammatory and antioxidant activities of Sclerochloa dura (Poaceae). *J. Serb. Chem. Soc.*, 79, 1–1.
16. Cain, M.L., Milligan, B.G., Strand, A.E. (2000). Long-distance seed dispersal in plant populations. *American Journal of Botany*, 87 (9), 1217-1227.
17. Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*, 323, 785–789.
18. Chobotokova, K. (2009). Aging and cancer: converging routes to disease prevention. *Integr. Cancer Ther.*, 8, 115-122.
19. Ciocârlan, V. (2009). *Flora ilustrată a României Pteridophyta et Spermatophyta* [Illustrated flora of Romania Pteridophyta et Spermatophyta] (Vol. 2, pp. 817-1140). București: Ed. Ceres, București.
20. Coldea, Gh., Kovács, A. (1969). Cercetări fitocenologice în Munții Nemirei [Phytosociological researches in the Nemira Mountains]. *St. și Cerc. Biol. Seria Botanică*, București, T. 21, Nr. 2, 95-104.
21. Constantinescu, T. (2009). *Masivul Piatra Craiului - Studiu geomorfologic* [Piatra Craiului Massif - Geomorphological study] (pp. 111-129). București: Editura Universitară, București.
22. Cristea, E. (1984). *Piatra Craiului, Monografii montane* [Piatra Craiului, Mountain monographs] (pp. 156-171). București: Ed. Sport-Turism, București.

23. Cristea, V., Gafta, D., Pedrotti, F. (2004). *Fitosociologie* [Phytosociology] (pp. 394). Cluj-Napoca: Ed. Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca.
24. Cuvier, F. (1823). Ligulaire de Sibirie. In F. G. Levrault, Le Normant, eds, *Dictionnaire des Sciences Naturelles* (Tom. XXVI, pp. 402). Strasbourg: L'imprimerie de F. G. Levrault, Strasbourg.
25. Drăghici, B., Morariu, I. (1980). Contribuții la flora Masivului Piatra Craiului [Contributions to the flora of the Piatra Craiului Massif]. *Studii și Cercetări de Biologie, seria Biologie Vegetală*, Tom 32 (1), 3-9.
26. Dumitrescu, A., Bîrsan, M.-V. (2015). ROCADA: a gridded daily climatic dataset over Romania (1961-2013) for nine meteorological variables. *Nat. Hazards*, 78 (2), 1045-1063.
27. Durazzo, A. (2017). Study approach of antioxidant properties in foods: update and considerations. *Foods*, 6(17), 1-7.
28. Fischer, M., Matthies, D. (1998). Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*. *J.Ecol.*, 86, 195-204.
29. Fischer, J., Lindenmayer, D.B. (2007). Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecol. Biogeogr.*, 16, 265–280.
30. Fong, S.S., Seng, L., Chon, W.N., Asing, J., Nor, M.F.b.M., Satirawaty, A., Pauzan, M. (2006). Characterization of the coal derived humic acids from Mukah, Sarawak as soil conditioner. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17 (3), 582–587.
31. Frînculeasa, M., Istrate, A. (2010). Studiul liniamentelor în determinarea apelor subterane în arealul bazinului Dâmbovicioara, România [Study of the liniaments in groundwater determination in Dâmbovicioara basin, Romania]. In P. Gâștescu, P. Brețcan, eds, *Resursele de apă din România. Vulnerabilitate la activitățile antropice* [Water resources from Romania. Vulnerability to the pressure of man's activities] (pp. 269-275). Târgoviște: Editura Transversal, Târgoviște.
32. Fynn, R.W.S., Morris, C.D., Kirkman, K.P.(2005). Plant strategies and trait trade-offs influence trends in comparative ability along gradients of soil fertility and disturbance. *Journal of Ecology*, 93, 384-394.
33. Garcia, M.B. (2003). Demographic viability of a relict population of the critically endangered plant *Borderea chouardii*. *Conservation biology*, 17 (6), 1672-1680.
34. Garcia, M.B. (2008). Life history and population size variability in a relict plant. Different routes towards long-term persistence. *Diversity and Distribution*, 14, 106-113.
35. Graham, C.H., Moritz, C., Williams, S.E. (2006). Habitat history improves prediction of biodiversity in rainforest fauna. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 632–636.
36. Grandcolas, P., Nattier, R., Trewick, S. (2014). Relict species: a relict concept. *Trends in Ecology & Evolution*, 29 (12), 655–663.
37. Heinken-Šmídová, A. (2012). *Study of factors influencing population dynamics of the plant species Ligularia sibirica (L.) Cass.*. PhD thesis. Olomouc: Palacký Univerzity Olomouc, Faculty of Science, Department of Botany.
38. Heinken-Šmídová, A., Münzbergová, Z. (2012). Population dynamics of the endangered, long-lived perennial species, *Ligularia sibirica*. *Folia Geobotanica*, 47 (2), 193-214.
39. Hidalgo, G.I., Almajano, M.P. (2017). Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content and radical scavenging determination: a review. *Antioxidants*, 6(7), 1-27.
40. Hobbs, R.J., Yates, C.J. (2003). Impacts of ecosystem fragmentation on plant populations: generalising the idiosyncratic. *Austral. J. Bot.*, 51, 471–488.
41. Ivan, D., Spiridon, L. (1983). *Fitocenologie și vegetația R.S.România. Manual de lucrări practice*. Univ. București.
42. Jeffrey, C., Chen, Y.L. (1984). Taxonomic studies on the tribe Senecioneae (Compositae) of eastern Asia. *Kew Bulletin*, 39, 205–446.
43. Kadlečík, J. (2014). *Carpathian Red List of Forest Habitats and Species, Carpathian List of Invasive Alien Species (draft)* (pp. 5-234). Banská Bystrica: The State Nature Conservancy of Slovak Republic, Banská Bystrica.
44. Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J.Food Sci. Technol.*, 48 (4), 412-422.
45. Komarov, V.L. (coord), Schischkin, B.K., Bobrov, E.G., Shetler, S.G., Unumb, E. (2000). *Flora of the USSR* [Translated from Russian: *Flora SSSR*, Tom XXVI, Akademiya Nauk SSSR Publishers, Moscow-Leningrad, 1961] (Vol. XXVI, pp. 752-815). Washington, D.C.: Smithsonian Institution Libraries, Washington, D.C..
46. Kovács, S., Rácz, G. (1975). Istoricul cercetărilor botanice din nordul Depresiunii Brașovului și împrejurimi. *Studii și Comunicări*, VI-VII, 443-462.

47. Krasņevska, N., Grauda, D., Kļaviņa, D., Rashal, I. (2017). Endopolyploidy of Endangered Plant Species *Ligularia Sibirica* in Different Environments. Endopolyploidy of endangered plant species *ligularia sibirica* in different environments. *Environment, Technology, Resources: Proceedings of 11th International Scientific and Practical Conference, Rēzekne*, Volume I, 161-164.
48. Lee, Y.J., Kim, D.B., Lee, J.S., Cho, J.H., Kim, B.K., Choi, H.S., Lee, B.Y., Lee, O.H. (2013). Antioxidant Activity and Anti-Adipogenic Effects of Wild Herbs Mainly Cultivated in Korea. *Molecules*, 18, 12937-12950.
49. Li, P.L., Zhang, Z.X., Jia, Z.J. (2008). Four new eremophilane derivatives from *Ligularia sagitta*. *Chem. Letters*, 37 (3), 308–309.
50. Liao, J.C., Zhu, Q.X., Yang, X.P., Jia, Z.J. (2002). Sesquiterpenes from *Ligularia Hodgsonii*. *J. Chin. Chem. Soc.*, 49, 129-132.
51. Ling, W., Liao, Z., Liu, C., Jia, H., Sun, J. (2016). Eremophilane Sesquiterpenes from the Genus *Ligularia*. *Chem Biodivers.*, 13 (6), 645-671.
52. Liu, J.Q. (2004). Uniformity of karyotypes in *Ligularia* (Asteraceae: Senecioneae), a highly diversified genus of the eastern Qinghai–Tibet Plateau highlands and adjacent areas. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 144 (3), 329–342.
53. Liu, Q., Shen, L., Wang, T.T., Chen, C.J., Qi, W.Y., Gao, K. (2010). Novel modified furanoeremophilane-type sesquiterpenes and benzofuran derivatives from *Ligularia veitchiana*. *Food Chem.*, 122, 55–59.
54. Liu, S.W. (1989). *Ligularia* Cass.. In Y. Ling, S.W. Liu, eds, *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [The People's Republic of China, Flora] Compositae-Senecioneae (Vol. 77 /2, pp. 4-304). Beijing: Science Press, Beijing.
55. Liu, S.W., Deng, D.S., Liu, J.Q. (1994). Origin, evolution and distribution of *Ligularia* Cass. (Compositae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 32, 514–525.
56. Matei, A.N. (2014). Florist relicts from Harman Marsh. *Argesis. Studii și Comunicări Seria Științele Naturii*, Argeș County Museum, XXII, 7-19.
57. Matei, A.N. (2015). Studies on *Ligularia sibirica* (L.) Cass. in its southern point in Arges county, Brusturețului Gorges. *Current Trends in Natural Sciences*, University of Pitești, Faculty of Science, Pitești, 4(8), 48-55.
58. Matei, A.N., Al Hassan, M., Boscaiu Neagu, M.T., Alexiu, V., Vicente Meana, Ó. (2016). Responses to Drought and Salinity in the Endangered Species *Ligularia sibirica* (L.) Cass.. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 73(2), 252-253.
59. Matei, A.N. (2018). Comparative phytosociological study of the relict species *Ligularia sibirica* (L.) Cass. in the western sector of the Bucegi Mountains. *Current Trends in Natural Sciences*, 7(13), 133-145.
60. Mânzu, C., Gherghel, I., Zamfirescu, Ș., Zamfirescu, O., Roșca, I., Strugariu, A. (2013). Current and future potential distribution of glacial relict *Ligularia sibirica* (Asteraceae) in Romania and temporal contribution of Natura 2000 to protect the species in light of global change. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 8 (2), 77–87.
61. Mettler, L., Gregg, T. (1974). *Genetica populațiilor și evoluția* [Population genetics and evolution] (pp. 279). București: Edit. Științifică, București.
62. Mihăilescu, S. (2001). *Flora și vegetația Masivului Piatra Craiului* [The flora and vegetation of the Piatra Craiului Massif] (pp. 141). București: Ed. Vergiliu, București.
63. Mihăilescu, S., Anastasia, P., Popescu, A., Alexiu, V.F., Negrean, G.A., Bodescu, F., Manole (Aiftimie), A., Ion, R.G., Goia, I.G., Holobiuc, I., Vicol, I., Neblea, M.A., Dobrescu, C., Mogîldea, D.E., Sanda, V., Biță-Nicolae, C.D., Comănescu, P. (2015). *Ghidul de monitorizare a speciilor de plante de interes comunitar din România* [Monitoring guide for plant species of community interest in Romania] (pp. 66-67). Institutul de Biologie București – Academia Română. Constanța: Ed. Dobrogea, Constanța.
64. Morariu, I. (1966). Mlaștinile de la Prejmer conservatoare de relice floristice [Swamps from Prejmer conservatory of floral relict species]. *Ocr. nat.*, 10 (1), 49-58.
65. Neblea, M., Alexiu, V. (2003). Aspects of vegetation from Zănoaga and Tătaru Gorges (The Bucegi Mountains). *Rev. Roum. Biol. – Biol Végét.*, T. 48 (1-2), 63-75.
66. Neblea, M. (2007). Vegetația megaforbietelor din Valea Ialomiței (Munții Bucegi) [The vegetation of megaforbites from Ialomiței Valley (Bucegi Mountains)]. *Ecos*, 19, 21-24.
67. Nefic, H., Musanovic, J., Metovic, A., Kurteshi, K. (2013). Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* L. induced by Alprazolam. *Med. Arch.*, 67(6), 388-392.

68. Nyárády, E.I. (1964). Genul *Ligularia* Cass. [*Ligularia* Cass. genus]. In T. Săvulescu (red.), *Flora R. S. România (1952-1976)* (IX, pp. 587-590). București: Ed. Acad. Române, București.
69. Oltean, M., Negrean, G., Popescu, A., Roman, N., Dihoru, G., Sanda, V., Mihăilescu, S. (1994). Lista roșie a plantelor superioare din România [Red list of superior plants in Romania]. *St., Sint., Doc. Ecol., Acad. Română - Inst. de Biologie*, I, 1-52.
70. Onete, M. (2008). *Studiul ecologic al unor populații de Dianthus callizonus și Dianthus gelidus* [Ecological study of some populations of *Dianthus callizonus* and *Dianthus gelidus*]. PhD thesis. București: Academia Română, Institutul de Biologie, Universitatea din București, București.
71. Oostermeijer, J.G.B., Luijten, S.H., Křenová, Z.V., den Nijs, J.C.M. (1998). Relationship between population and habitat characteristics and reproduction of the rare *Gentiana pneumonanthe* L.. *Conser. Biol.*, 12, 1042-1053.
72. Pellegrini, N., Del Rio, D., Colombi, B., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003). Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 51(1), 260-264.
73. Pojarkova, A.I. (1961). *Ligularia*. In V.L. Komarov (coord), B.K. Schischkin, E.G. Bobrov, S.G. Shetler, E. Unumb, (2000), eds, *Flora of the USSR* [Translated from Russian: Flora SSSR, Tom XXVI, Akademiya Nauk SSSR Publishers, Moscow-Leningrad, 1961] (Vol. XXVI, pp. 755-806). Washington, D.C.: Smithsonian Institution Libraries, Washington, D.C..
74. Pop, E. (1960). *Mlaștinile de turbă din Republica Populară Română* [Peat bogs from Romanian People's Republic] (pp. 52-445). București: Ed. Academiei Republicii Populare Române, București.
75. Pop, E. (1965). Problema relictelor glaciare în mlaștinile de turbă din România [The problem of glacial relicts in Romania peat marshes]. *St. și Cerc. Biol. seria Botanică*, București, T. 17 (4-5), 427-444.
76. Pop, O.G. (2006). Identification of Important Plant Areas (IPAs) within Piatra Craiului National Park. In O.G. Pop, eds, *Research in Piatra Craiului National Park* (Vol. 2, pp. 108-133). Brașov: Ed. Universității Transilvania, Brașov.
77. Primack, R.B., Pătroescu, M., Rozyłowicz, L., Iojă, C. (2008). *Fundamentele conservării diversității biologice* [Fundamentals of biological diversity conservation] (pp.668). București: Ed. A.G.I.R., București.
78. Rockwood, L.L. (2006). *Introduction in Population Ecology* (pp. 5-339). Oxford: Blackwell Publishing, Oxford.
79. Sanda, V., Biță, D.C., Barabaș, N. (2004). Flora cormofitelor spontane și cultivate din România [Flora of spontaneous and cultivated cormophytes in Romania] (pp. 202-316). Bacău: Ed. Ion Borcea, Bacău.
80. Sârbu, I., Ștefan, N., Oprea, A. (2013). *Plante vasculare din România. Determinator ilustrat de teren* [Vascular Plants in Romania. Land illustrator] (pp. 830-1320). București: Ed. Victor B Victor, București.
81. Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *J. Functional Foods*, 18B, 820-897.
82. Slavík, B. (2004). *Ligularia* Cass. In B. Slavík, J. Štěpánková, eds, *Květena České republiky / Flora of the Czech Republic* (7, pp 306-309). Praha: Academia, Praha.
83. Sluiter, R. (2012). *Interpolation Methods for the Climate Atlas* (pp. 13-68). De Bilt: Royal Netherlands Meteorological Institute (KNMI), Technical report TR-335, De Bilt, The Netherlands.
84. Stoicovici, L. (1982). Răspândirea populațiilor relictare de *Ligularia sibirica* (L.) Cass. în R.S. România [Populations distribution of *Ligularia sibirica* (L.) Cass. in R.S.R.]. *Stud. Cerc. Biol., Ser. Biol. Veg.*, 34 (1), 14-19.
85. Stojković, D.S., Davidović, S., Živković, J., Glamočlija, J., Ćirić, A., Stevanović, M., Ferreira, I.C.F.R., Soković, M. (2013). Comparative evaluation of antimutagenic and antimutagenic effects of *Morchella esculenta* extracts and protocatechuic acid. *Frontiers in Life Science*, 7(3-4), 218-223.
86. Szymanska-Chargot, M., Zdunek, A. (2013). Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along a Fraction Process. *Food Biophys.*, 8, 29–42.
87. Teodoreanu, E. (2006). The climate of Piatra Craiului National Park. In O.G. Pop, eds, *Research in Piatra Craiului National Park* (Vol. 2, pp. 57-69). Brașov: Ed. Universității Transilvania, Brașov.
88. Tori, M., Tanio, Y., Okamoto, Y., Saito, Y., Gong, X., Kuroda, C., Hanai, R. (2008). Chemical Constituents of *Ligularia franchetiana* Collected in Yunnan Province of China. *Heterocycles*, 75 (8), 2029-2034.
89. Tzvelev, N.N., Fedorov, A.A. (2002). *Flora of Russia. The European part and bordering regions* (pp. 87-89). CRC Press.
90. Vergeer, P.V., Rengelink, R., Copal, A., Ouborg, N.J. (2003). The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size in performance of *Succisa pratensis*. *J. Ecol.*, 91, 18-26.

91. Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenko, J., Melillo, J.M. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277, 494–499.
92. Wang, C.F., Zhao, Y., Liu, Y.Z., Zhang, Z.Z. (2008). Two New Eremophilane-Type Sesquiterpenoids from the Rhizomes of *Ligularia veitchiana* (HEMSL.) GREENM. *Helv. Chim. Acta*, 91 (9), 1712–1716.
93. Wang, C.F., Zhao, Y., Shi, S.Y., Li, J.P., Zhang, Z.Z., Liu, Y.Z. (2010). A new naphthoquinone and a new neolignan from *Ligularia vellerea* rhizomes. *Chem. Nat. Comp.*, 46 (2), 184–186
94. Wang, W.S., Dai, X., Hong, L.Y., Lu, P., Feng, J.C., Jiao, Y.G. (2008). New Sesquiterpenoids from *Ligularia duciformis*. *Helv. Chim. Acta*, 91 (6), 1118–1123.
95. Webster, M., Witkin, K.L., Cohen-Fix, O. (2009). Sizing-up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J. Cell Sci.*, 122(10), 1477-1486.
96. Wu, L., Liao, Z., Liu, C., Jia, H., Sun, J. (2016). Eremophilane Sesquiterpenes From the Genus *Ligularia*. *Chem Biodivers.*, 13 (6), 645-671.
97. Wu, Z.Y., Raven, P.H., Hong, D.Y., (eds) (2011). *Flora of China – Asteraceae* (Vol. 20–21, pp. 3, 6, 371, 372, 376, 435, 459, 469, 508). Beijing and St. Louis: Ed. Science Press (Beijing) & Missouri Botanical Garden Press (St. Louis). Retrieved from http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=118542
98. Xie, W.D., Weng, C.W., Li, X., Row, K.H. (2010). Eremophilane Sesquiterpenoids from *Ligularia fischeri*. *Helv. Chim. Acta*, 93 (10), 1983 –1989.
99. Yang, J.L., Wang, R., Shi, Y.P. (2011). Phytochemicals and biological activity of *Ligularia* species. *Nat Prod Bioprospect.*, 1, 1-24.
100. Yuan, Y.L., Fang, L.Z., Bai, S.P., Liang, H.J., Ye, D.D. (2013). A novel eremophilane sesquiterpenoid from *Ligularia intermedia* roots and rhizomes. *Chem. Nat. Comp.*, 49 (2), 258-260.
101. Yuet-Ping, K., Darah, I., Yusuf, U.K., Yeng, C., Sasidharan, S. (2012). Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Alium cepa* assay. *Molecules*, 17, 7782-7791.
102. Zăvoi, S., Fetea, F., Ranga, F., Pop, R.M., Baci, A., Socaciu, C. (2011). Comparative Fingerprint and Extraction Yield of Medicinal Herb Phenolics with Hepatoprotective Potential, as Determined by UV-Vis and FTMIR. *Spectroscopy, Not Bot. Horti. Agrobo.*, 39(2), 82-89.
103. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
104. *** Plan de Management Dealul Cetății Lempeș – Mlaștina Hărman ROSCI005, accesat la data de 14.09.2015, http://www.fundatiacarpati.ro/arii_protejate/harman2014.pdf
105. *** Plan de Management Integrat al Parcului Natural Bucegi și al sitului NATURA 2000 ROSCI0013, accesat la data de 10.08.2018, http://www.mmediu.ro/app/webroot/uploads/files/2018-03-28_PLAN_MANAGEMENT_FINAL.pdf
106. *** Planul de Management al sitului NATURA 2000 ROSCI0242 Tinovul Apa Roșie, accesat la data de 18.03.2016, <http://www.natkov.ro/?page=46&newlang=romana>
107. *** Planul de Management al Parcului Național Piatra Craiului, accesat la data de 29.11.2015, http://www.pcrail.ro/files/Plan_site.pdf