

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului  
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



**BONTESCU (CĂS. BEICU) GH. RODICA EMILIA**

# **REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT**

**CERCETĂRI PRIVIND BIOLOGIA, VARIABILITATEA  
GENETICĂ ȘI COMPOZIȚIA CHIMICĂ A UNOR SPECII  
ALE GENULUI *THYMUS* DIN BANAT**

**Conducător Științific:**

**PROF. UNIV. DR. IMBREA ILINCA MERIMA**

**Timișoara**

**2021**

## **A. INTRODUCERE**

### ***Motivația alegerii temei de cercetare***

Genul *Thymus* cuprinde numeroase specii de plante aromatice cu o largă utilizare în medicină, industria farmaceutică, cosmetică și alimentară. Cercetările își propun studierea unor specii ale genului *Thymus* din zona Banatului corelând aspectele fenotipice utilizate la ora actuală în determinările taxonomice clasice cu analize moleculare și biochimice care ar putea crește semnificativ eficiența și rapiditatea determinărilor taxonomice.

Este cunoscut faptul că pentru uz medicinal, toate speciile genului sunt utilizate sub numele generic de *Th. serpyllum*. Cu toate acestea este necesară determinarea cu acuratețe a speciilor, mai ales în cadrul cercetărilor științifice, în scopul comparării datelor cu altele similare din literatura de specialitate. Raportarea compoziției chimice, caracteristicile moleculare, dar și studiile de floră și vegetație necesită determinarea cu precizie a speciilor din teren. Mai mult, acuratețea rezultatelor și corectitudinea interpretării sunt strâns legate de determinarea taxonomică.

Ca urmare, se dovedește necesară și utilă o clarificare a taxonomiei speciilor prezente în țara noastră, iar în acest sens teza de doctorat își propune să vină cu informații suplimentare privind caracteristicile morfologice, genetice și biochimice ale speciilor cultivate sau spontane identificate la nivelul zonei Banatului, investigând posibilitatea stabilirii unor metode de determinare chimică și moleculară care să aducă informații suplimentare, să clarifice și să faciliteze identificarea speciilor genului *Thymus*, ce cresc în acest areal.

### ***Importanța și actualitatea temei***

În România există interes comercial pentru plantele spontane ale acestui gen, ele fiind cumpărate de către unitățile private de procesare a plantelor medicinale. Ele sunt recoltate din flora spontană în mod uzual de către cunoscători și sunt folosite ca remedii naturale.

În prezent, determinatoarele se bazează pe caracterele morfologice ale speciilor, iar în multe cazuri, determinarea speciilor și a subspeciilor este extrem de dificilă datorită similitudinilor acestor caractere. Astfel, pentru cimbrisor sunt luate în considerare caractere morfologice ale frunzelor, mai exact nervațiunea acestora (camptodromă sau pseudomarginată) pubescența frunzelor, a tulpinilor, prezența sau absența lăstarilor sterili. Subspeciile, varietățile și formele prezintă caractere foarte apropiate, uneori interpretabile, contribuind la confuzii între specii și determinări eronate. Există în prezent specii trecute ca incerte, sinonimizate ca alte specii, sau specii nerecunoscute în Flora Europeana ca fiind prezente la noi, însă semnalate în determinatoarele noastre.

În unele cazuri pot apărea specii noi pentru România, însă în absența unor chei de determinare adecvate, taxonii nu se pot determina corect, iar rezultatele nu se pot raporta și nu sunt recunoscute de către mediul academic. Ca urmare, evaluarea posibilităților de dezvoltare a unor noi instrumente taxonomice, analizarea biodiversității intra și interspecifice, caracterizarea multiparametrică și compararea cu specia cultivată a unor populații de cimbrisor aparținând speciilor spontane de *Thymus* este utilă în prezent, fiind necesară o caracterizare și o determinare cât mai riguroasă a speciilor ce cresc spontan în acest areal.

Prezentul studiu este necesar și ținând cont de faptul că foarte multe persoane recoltează cimbrisorul sălbatic ca plantă medicinală din diferite areale, fie în scopul utilizării personale, fie în scopul comercializării. Este important să tragem un semnal de alarmă asupra faptului că aceste plante pot conține cantități semnificative de diferite tipuri de substanțe toxice, de la metale grele la pesticide.

Un alt aspect urmărit a fost posibilitatea identificării de populații locale din flora spontană care ar putea fi introduse în cultură, ca o alternativă mai rezistentă și, poate, cu un potențial fitobiologic mai mare, decât speciile cultivate în prezent. Găsirea unor resurse noi de plante medicinale în flora spontană, diferențierea până la nivel de subspecie, precum și certificarea că acestea pot fi recoltate și utilizate cu uz medicinal sau chiar acclimatizate pentru cultură în ghivece, este un demers care își poate dovedi utilitatea într-un orizont foarte scurt de timp.

### ***Prezentarea pe scurt a conținutului***

Această lucrare este structurată în două părți.

În *prima parte* a tezei sunt structurate datele identificate în materialele de specialitate cu privire la caracteristicile generale ale speciilor spontane studiate, elemente de taxonomie a genului *Thymus*,

origine și evoluție, caracterizarea fenotipică și genotipică, compoziția chimică, particularitățile biologice ale compușilor fitoactivi.

În *partea a doua* sunt prezentate cercetările proprii fiind analizate și evaluate caracteristici morfologice, genetice și biochimice obținute prin determinări realizate la populații aparținând unor specii spontane, recoltate din partea de vest a țării (zona Banatului). La toate populațiile recoltate au fost făcute determinări calitative și cantitative. Aceleași determinări au fost realizate și la specia cultivată. Au fost analizate proprietățile biologice ale unor uleiuri esențiale extrase din aceste populații.

#### ***Gradul de încadrare a temei în preocupările internaționale, naționale, regionale, ale colectivului de cercetare***

În lucrările de specialitate au fost prezentate speciile luate în studiu, dar acestea sunt specii pandemice, crescând și din alte zone ale Europei sau Asiei, un număr mult mai mic de lucrări se apleacă asupra speciilor de *Thymus* ce cresc spontan în România.

Există un număr foarte restrâns de studii de dată recentă, care să realizeze analize complexe, multiparametrice, asupra speciilor genului *Thymus* din zona Banatului. Acest aspect este important și pentru că, prin numărul și diversitatea lor, aceste specii contribuie în mod semnificativ la biodiversitatea acestui areal.

În ultimii ani a fost observat numărul tot mai mare de studii cu privire la compoziția chimică și proprietățile biologice ale plantelor bogate în uleiuri esențiale. În plus, utilizarea compușilor fitoterapeutici pe piața UE a fost reglementată de către Parlamentului European prin Legea nr. 1107/2009. Compușii biologic activi se dovedesc a fi o sursă inepuizabilă de terapii, reprezentând alternative viabile în cazul numeroaselor afecțiuni contemporane.

#### ***Obiectivele științifice propuse pentru rezolvare în cadrul cercetării științifice***

Scopul cercetărilor a fost identificarea și studierea unor populații de cimbrisor (*Thymus* sp.) din zona Banatului, studii prin care să putem corela aspectele fenotipice utilizate la ora actuală în determinările taxonomice clasice cu analize moleculare și biochimice care ar putea contribui la dezvoltarea de noi instrumente taxonomice pentru specii de interes pentru natură și om. Obiectivele urmărite au fost: prezentarea arealului pentru speciile de *Thymus* studiate, evaluarea diversității morfologice în cadrul populațiilor de *Thymus* studiate prin determinări biometrice, evaluarea diversității genetice în cadrul populațiilor de *Thymus* studiate cu ajutorul markerilor moleculari, evaluarea diversității în cadrul populațiilor de *Thymus* studiate cu ajutorul analizelor biochimice, corelarea aspectelor fenotipice ale unor populații de *Thymus* cu analize moleculare și biochimice pentru a stabili variabilitatea genetică/chimică și gradul de înrudire dintre speciile studiate, generarea unor dendrograme moleculare/biochimice prin care să se poată evidenția gradul de înrudire și caracteristicile de specie/subspecie ale populațiilor de cimbrisor din Banat, analiza comparativă a unor macroelemente și microelemente din masa vegetală uscată în vederea identificării unor particularități chemotaxonomice pentru aceste plante, analiza microelementelor din plante în vederea identificării unor elemente de toxicitate în conținutul chimic al acestora, extragerea și analizarea unor uleiuri esențiale pentru a stabili compoziția chimică și eventuale caracteristici chemotaxonomice ale acestora, analiza proprietăților biologice ale unor uleiuri esențiale extrase din aceste populații.

#### ***Comentarii sintetice privind noutatea/gradul de inovare a metodei/metodologiei de cercetare***

Noutatea studiilor constă în: (I) identificarea și eșantionarea populațiilor de *Thymus* sp. ce cresc spontan în diferite zone ale Banatului, (II) evaluarea diversității genetice la nivelul genomului nuclear în cadrul unor populații de *Thymus* din Banat, folosind markeri ISSR și SCoT, (III) evaluarea diversității fitochimice în cadrul unor populații de *Thymus* din Banat prin analize biochimice a materialului vegetal uscat (herba), (IV) evaluarea diversității fitochimice prin extragerea și analizarea unor uleiuri esențiale din unele populații de *Thymus* din Banat, (V) identificarea unor caracteristici chemotaxonomice pentru speciile studiate, (VI) investigarea unor specii din flora spontană a României prin evaluarea activității antimicrobiene pentru uleiurile esențiale extrase din unele populații de *Thymus*.

Elementul de noutate constă în evaluarea gradului de corelare statistică al caracterelor morfologice determinate cu analizele moleculare bazate pe marker moleculari cu importanță dovedită în determinarea variabilității genetice la nivel populațional și în studiile taxonomice, analizele multiparametrice și corelațiile multiple ale datelor experimentale obținute.

## B. CONȚINUTUL TEZEI DE DOCTORAT

### I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII TEMEI

#### 1. GENUL *THYMUS*. CONSIDERAȚII GENERALE

##### 1.1 Prezentarea arealului speciilor de *Thymus* studiate

Identificarea populațiilor de cimbrisor s-a realizat în zone diferite, unele încadrate în unitățile teritoriale administrative ale unor parcuri naturale sau naționale (Parcului Național Domogled-Valea Cernei, Parcul Natural Portile de Fier, Parcul Național Semenic-Cheile Carașului) sau uneori în areale din afara acestora (Depresiunea Almăjului).

##### 1.2 Taxonomia genului *Thymus*

În această secțiune sunt prezentate comparativ datele științifice cunoscute în prezent și prezentate în literatura de specialitate, în ceea ce privește taxonomia speciilor genului *Thymus* în România și recunoașterea lor în baza de date electronică EuroPlusMed Plantbase.

##### 1.3 Origine și evoluție

Din studiile bibliografice, speciile spontane ale genului *Thymus* relevă o mare diversitate taxonomică, indicând o evoluție naturală ce a permis adaptarea la diferite habitate și a creat premisele unei evoluții divergente ce are la bază o mare variabilitate genetică. Această biodiversitate de specii poate contribui la înțelegerea unor probleme fundamentale legate de originea, evoluția și relațiile filogenetice ale acestora.

##### 1.4 Caracterizare morfologică

Genul *Thymus*, conform descrierii din Flora RPR, vol VIII, 1961, grupează specii perene, arbustive. Tulpina poate fi rotundă sau tetramuchiata, ascendentă, pseudorepentă, terminată cu inflorescențe sau stoloniferă, repentă, cu ramuri florifere din muguri axilari. Pe tulpină se întâlnesc peri dispuși diferit: de jur împrejur. Frunzele sunt simple, cu marginea întreagă, liniare, eliptice sau chiar ovate, cu nervura principală pronunțată. Nervurile laterale pot să fie subțiri, de grosime egală sau cu îngroșări parțiale. Florile sunt pe tipul cincii, zigomorfe din punct de vedere al simetriei, cu caliciu campanulat sau tubulos, prevăzut cu un inel de peri în zona superioară. Corola este bilabiata, caracter de familie, iar staminele exerte. Florile sunt hermafrodite sau unisexuate (ginodioice). Sunt grupate în inflorescențe verticilate. Fructul este o tetranuculă netedă [73].

##### 1.5 Caracteristici moleculare

Tehnica ISSR se bazează pe reacția PCR, care implică amplificarea unui segment de ADN, prezent la o distanță amplificabilă între două regiuni microsateelit, orientate în direcții opuse. Marcherii ISSR își găsesc aplicabilitate în genotipizarea indivizilor, a diversității genetice, cartarea genomului, amprentarea genetică, studii de filogenie și de evolutionism [170]. Tehnica ISSR combină beneficiile analizelor AFLP și SSR, cu universalitatea RAPD, având și o reproductibilitate ridicată dată de lungimea mare a primerilor (15-25 nucleotide), comparativ cu 10 nucleotide la RAPD [71].

Markerii moleculari ScoT au ca țintă o scurtă secvență de ADN localizată în proximitatea codonului START – ATG. Comparativ cu markerii RAPD care dau amplificare aleatorie, markerii ScoT, prezintă un grad mai mare de reproductibilitate având primeri mai lungi. [7].

Rezultatele anterioare au indicat faptul că markerii ISSR și ScoT pot fi utilizați ca o metodă potrivită în evaluarea diversității genetice a speciilor. Aceste studii oferă indicii valoroase privind posibilitatea obținerii de rezultate concludente în aceeași direcție la speciile genului *Thymus*. [21].

##### 1.6 Compoziție chimică

Au fost raportate șase chemotipuri la speciile genului *Thymus*, și anume gama -terpineol, linalool, geraniol, timol, carvacrol și trans-tujan-4-ol/terpinen-4-ol [140]. Compoziția chimică a plantelor este determinată de fertilitatea solului și de factorii de mediu, aflați în corelație. Din această cauză la aceeași specie, compoziția chimică și cantitatea de materie vegetală diferă de la un loc la altul, sau chiar în același loc de la un an la altul. Compoziția chimică este de asemenea foarte diferită în funcție de variabilitatea genetică. [31]. Există numeroase studii care cercetează compoziția chimică și proprietățile biologice ale speciilor din genul *Thymus*. Compușii fenolici reprezintă principalii constituenți al uleiului esențial la speciile genului *Thymus* [74]. Dintre compușii fenolici în speciile de *Thymus* predomină timolul și carvacrolul [159, 74].

Compoziția chimică a uleiului esențial variază semnificativ de la o specie la alta, uneori chiar intraspecific [65]. La această specie, o cantitate semnificativă de monoterpene fenolice, în special carvacrol a fost raportată în literatura de specialitate [61, 158]. Din studierea articolelor de specialitate se relevă faptul că, în cazul speciilor și subspeciilor de *Thymus* cantitatea de polifenoli este influențată de mai mulți factori precum zona geografică, climă,

perioada de vegetație [153]. Cu toate acestea, pe baza componentelor fenolice din uleiul esențial populațiile de *Thymus* pot fi clasificate, conform studiilor de specialitate, în diferite chemotipuri [65, 64, 98, 79, 106, 74].

#### 1.7 Importanță economică

Speciile genului *Thymus* sunt recunoscute pentru cantitatea mare de compuși biologic activi [159]. Specia este cultivată încă din Antichitate. Uleiul esențial extras din populațiile de cimbrisor este folosit atât în industria alimentară, ca și condiment, cât și în ca agent antimicrobian [85] și medicament [117].

Ca plantă medicinală, prezintă acțiune stomahică, antiseptică, coleretică fiind recomandat în afecțiuni respiratorii (tuse), gripă și afecțiuni gastro-intestinale [114]. În ultimii ani a crescut interesul pentru identificarea unor compuși chimici naturali cu utilitate farmaceutică, medicală, cosmetică sau alimentară. Astfel, prezența uleiurilor esențiale în speciile genului *Thymus*, a făcut ca această plantă să devină importantă pentru aceste studii. [102]. În plus față de proprietățile aromatizante determinate de ingredientele constitutive active, uleiurile esențiale prezintă o activitate antimicrobiană semnificativă [140], precum și proprietăți puternice antioxidante [67].

Conform ultimelor date, aproximativ 6% din plantele superioare au fost studiate pentru potențialul lor farmacologic și doar 15% au fost evaluate pentru potențialul lor fitochimic. [45, 54]. În acest sens, identificarea de specii spontane cu proprietăți fitomedicinale semnificative poate deschide căi noi de valorificare.

### **II. CERCETĂRI PROPRII**

#### **2 DESCRIERA BOTANICĂ ȘI LOCALIZAREA SPECIILOR GENULUI THYMUS INVESTIGATE**

Pe baza datelor din literatura de specialitate am întocmit o lista preliminară cu speciile menționate a fi prezente în Banat. Au fost identificate și caracterizate nouă specii, cu subspeciile aferente, după caz. Speciile au fost identificate folosind criterii morfologice descrise anterior și au fost localizate în arealul cercetat prin determinarea punctelor GPS la locația de recoltare. Localizarea spațială a acestor populații de *Thymus* a fost realizată prin utilizarea punctelor GPS din locația de recoltare și generarea hărților corespunzătoare.

#### **3 CONTRIBUȚII PRIVIND CARACTERIZAREA MORFOLOGICĂ A SPECIILOR GENULUI THYMUS DIN ZONA BANATULUI**

Scopul acestui studiu a fost evaluarea caracterelor morfologice cantitative (cinci parametri: lungimea plantelor, lungimea inflorescenței, forma frunzelor, lungimea frunzelor, lățimea frunzelor) și stabilirea gradului de similaritate fenotipică a populațiilor de *Thymus* ce cresc spontan în zona Banatului, prin analiza varianței morfologice. Indivizii au fost selectați aleatoriu în cadrul fiecărei populații. Datele au fost prelucrate statistic și corelate.

Pentru ca au existat diferențe semnificative pedoclimatice anuale, analiza rezultatelor obținute prin acest studiu are relevanță prin identificarea semnificațiilor diferențelor la populațiile recoltate și analizate în același an. Ca urmare evaluarea diversității fenotipice ale populațiilor de *Thymus* recoltate în 2018 a fost discutată și analizată separat de cele recoltate în anul 2019. Metodologia de lucru a fost identică.

Analiza varianței pentru înălțimea plantelor a aratat că există diferențe reale și clar semnificative între populațiile studiate, în condițiile existenței unei variabilități importante la nivel intrapopulațional. Variabilitatea interindividuală a fost ridicată la populațiile spontane, în special la *Th. pannonicus*, *Th. pulegioides*, *Th. glabrescens*, în timp ce la populația cultivată, *Th. vulgaris*, uniformitatea plantelor a fost considerabil mai ridicată.

Analiza varianței pentru lungimea și lățimea medie a frunzelor la populațiile de *Thymus* a aratat că cea mai mare variabilitate și amplitudine a acestui caracter este înregistrată de populația de *Th. pannonicus* de la Silagiu alături de populațiile de *Th. dacicus* de la Ostrov, ale căror distribuții prezintă un nivel ridicat de simetrie. Cea mai redusă variabilitate intrapopulațională și amplitudine a fost consemnată la populația *Th. pulegioides* ssp. *chamaedrys*, a cărei distribuții prezintă o asimetrie de dreapta, în timp ce amplitudinea redusă la populația *Th. pulegioides* ssp. *montanus* este asociată cu o asimetrie de stânga.

Referitor la analiza varianței pentru toate caracterele morfologice studiate la populațiile de *Thymus*, se observă că valori ridicate și semnificative ale varianței a fost înregistrată în cazul lungimii frunzelor care manifestă o capacitate ridicată de diferențiere între populații. Cea mai redusă diversitate între populații a fost observată pentru lățimea frunzelor.

#### **4 CONTRIBUȚII PRIVIND EVALUAREA DIVERSITĂȚII GENETICE LA UNELE SPECII ALE ALE GENULUI THYMUS DIN ZONA BANATULUI PE BAZA UNOR ANALIZE MOLECULARE**

Studiul a avut ca scop evaluarea polimorfismului genetic la populațiile de *Thymus* din zona Banatului, prin analize moleculare realizate cu markeri moleculari ISSR și ScoT, corelând aspectele morfologice cu analize moleculare. S-au realizat determinări la nivelul fiecărei populații luate în studiu. Au fost recoltate frunze de la

indivizii ai fiecărei populații luate în studiu, câte 3 serii din fiecare probă. Indivizii au fost selectați aleatoriu în cadrul fiecărei populații. Datele au fost prelucrate statistic și corelate cu datele biometrice determinate anterior.

Probele ADN extrase au fost amplificate cu un număr de 14 primeri ISSR. Producții de amplificare au fost separați prin electroforeză în gel de agaroză 1,5%. Dintre primerii analizați au fost aleși 6, care au dat amprente cele mai clare, cu numărul cel mai mare de benzi. Fragmentele vizualizate pentru fiecare genotip și fiecare primer au fost analizate, notate în ordinea dimensiunilor. Pe baza amprentelor moleculare obținute cu cei șase primeri ISSR s-a realizat scorul locilor, iar informațiile obținute au fost introduse în matricea binară în scopul interpretării statistice. S-a evidențiat un număr de 168 de alele (6 primeri ISSR), a căror distribuție a fost analizată statistic cu o medie de alele pe primer de 28.

S-au efectuat analize similare cu cei 10 primeri ScoT. Dintre aceștia au fost aleși patru markeri, care au generat un număr mare de fragmente, care au permis monitorizarea precisă. S-a evidențiat un număr de 119 de alele (4 primeri ScoT), a căror distribuție a fost analizată statistic cu o medie de alele pe primer de 29,7. Informațiile obținute în urma analizei tuturor gelurilor, au condus la evidențierea unui număr total de 287 de alele (6 primeri ISSR și 4 primeri ScoT), cu o medie de 28,7 alele/primer.

Toți primeri ISSR utilizați au generat benzi polimorfice. Indicele de discriminare (PI), a arătat că primerul UBC855 are cea mai ridicată capacitate de a genera benzi polimorfice la populațiile cuprinse în studiu. De asemenea, s-a constatat că populațiile analizate prezintă structuri genetice similare pentru alelele unor primerilor ScoT14 și ScoT36.

În ceea ce privește populațiile studiate în 2018, o contribuție notabilă la variabilitatea totală a fost observată în cazul populațiilor de *Th. dacicus* de la Ostrov, *Th. glabrescens* de la Silagiu și *Th. pulegioides* ssp. *montanus* de la Carașova, care au avut contribuții ridicate la diversitatea de la nivelul dendrogramei. Valorile cele mai reduse ale varianței au fost înregistrate la populațiile *Th. pannonicus* ssp. *auctus* de la Pojejena și *Th. pulegioides* ssp. *montanus* de la Pojejena.

În ceea ce privește populațiile analizate în 2019, se observă că cele mai mari diferențieri genetice au fost înregistrate între populațiile: *Th. comosus* comparativ cu *Th. pulegioides* ssp. *pulegioides*. Cea mai ridicată similaritate pentru alelele acestui primer a fost observată între populațiile de *Th. praecox* ssp. *polytrichus*, indiferent de zona de recoltare, respectiv între *Th. dacicus* de la Lescovița și *Th. comosus*. Având în vedere nivelul general redus al similarității, se poate concluziona că alelele ISSR au fost foarte diferite de cele ScoT.

Valoarea redusă a coeficientului de corelație dintre matricele similarității genetice identificate prin intermediul primerilor ISSR și a diversității pe baza primerilor ScoT, atestă că acești primeri au structuri alelice diferite, astfel este recomandată utilizarea lor cumulată pentru evaluarea eficientă a diversității genetice la diferite populații de *Thymus*.

## **5 CONTRIBUTII PRIVIND EVALUAREA PROFILULUI POLIFENOLIC LA UNELE SPECII ALE ALE GENULUI THYMUS DIN ZONA BANATULUI**

Scopul cercetării a fost studierea compoziției chimice ale unor specii ale genului *Thymus* colectate din mai multe regiuni din zona Banatului și identificarea diferențelor cantitative ale compusilor chimici organici în populațiile de cimbru studiate, atât în ceea ce privește zona, cât și speciile, sau potențial subspeciile. Există numeroase studii ce analizează compoziția chimică a uleiurilor volatile, dar semnificativ mai puține cele care analizează extractele etanolice sau apoase.

Plantele analizate au fost recoltate în perioada înfloririi, din diferite zone din Banat, situate la altitudine diferită (80-1430 m), în 2018 și 2019. Populațiile la care numărul de indivizi recoltați nu a fost suficient de mare pentru obținerea unor analize calitative și cantitative semnificative, au fost eliminate. S-au realizat determinări biochimice din partea aeriană uscată, recoltată în perioada înfloririi (mai-iulie). Indivizii au fost selectați aleatoriu în cadrul fiecărei populații.

Au fost determinate și analizate conținutul maxim și minim de polifenoli totali al populațiilor de *Thymus* luate în studiu, valorile medii, abaterile standard și coeficientul de variație. Metoda de extracție utilizată a fost efectuată în conformitate cu metoda Cocan și colab. (2018), cu modificări privind timpul și condițiile de extracție [39].

Conținutul total de polifenoli a fost determinat cu reactiv Folin-Ciocalteu folosind acid galic ca standard [52]. Absorbanta la 750nm a fost măsurată utilizând un spectrofotometru analitic UV-VIS Jena Specord 205 în triplicat. TPC a fost calculat pe baza curbei standard a acidului galic, iar rezultatele au fost exprimate ca miligrame de acid galic echivalent per gram de extract (mgGAE/g extract). Populațiile de timus au fost analizate statistic și grupate în funcție de similaritatea profilului polifenolic.

Valorile polifenolilor totali determinate prin studiul nostru la speciile de *Thymus*, s-au dovedit a fi mai mici decât cele raportate în literatura de specialitate pentru plantele colectate din habitate naturale sau cultivate în condiții de teren [126, 159, 72]. Condițiile climatice și pedologice, metodele de prelevare și extragere, fondul genetic al plantelor sunt responsabile pentru diferențele în conținutul de polifenoli totali raportate în diferite studii.

Rezultatele obținute evidențiază o variație semnificativă a conținutului de polifenoli totali la populațiile de *Thymus* din zona Banatului în funcție de specie și zona de recoltare. La nivel de populație, cea mai mare cantitate de polifenoli totali a fost determinată la specia *Th. pannonicus* ssp. *auctus* – identificată în zona localității Pojejena, iar cea mai mică la specia *Thymus dacicus* – identificată în zona localității Lescovița. La nivel de specie, în studiul nostru, cele mai mari diferențe au fost obținute în cazul speciei *Th. pannonicus* ssp. *auctus* unde cantitatea medie de polifenoli a variat între  $2.253 \pm 0.020$  mgGAE/g la populația identificată în zona localității Pojejena și  $0.686 \pm 0.003$  mgGAE/g la populația identificată în zona localității Tricule.

În funcție de similaritatea cantității determinate de polifenoli totali, la populațiile de *Thymus* studiate a fost realizată analiza clusterială, după metoda mediei grupurilor (clusterilor). Un număr de două cluster majore de populații de *Thymus* au fost obținute prin analiza clusterială raportată la cantitatea de polifenoli totali determinată în cadrul acestui studiu, la care se adăuga populația de *Th. pannonicus* ssp. *auctus*, identificată în zona localității Pojejena, care prin valoarea mult superioară a cantității de polifenoli totali determinată a fost încadrată separat.

Un aspect semnificativ identificat prin acest studiu a fost poziționarea în cluster diferite a două subspecii ale aceleiași specii - *Thymus praecox*, rezultat ce poate reprezenta un punct de plecare valid pentru dezvoltarea unor metode de amprentare biochimică a subspeciilor de *Thymus praecox*. Astfel, populația de *Th. praecox* ssp. *janke*, identificată în zona masivului Domogled a fost încadrată în clusterul 1, iar populația de *Th. praecox* ssp. *polytrichus* (*Th. balcanus*), din zona Gozna-Semenic a fost încadrată în clusterul 2.

## **6 CONTRIBUȚII PRIVIND EVALUAREA DIVERSITĂȚII CHIMICE LA UNELE SPECII ALE ALE GENULUI THYMUS DIN ZONA BANATULUI PE BAZA ANALIZEI CONȚINUTULUI DE COMPUȘI MINERALI**

Scopul cercetării a fost studierea compoziției chimice ale unor specii ale genului *Thymus* colectate din mai multe regiuni din zona Banatului și identificarea diferențelor cantitative ale compusilor chimici minerali în populațiile de cimbru studiate, atât în ceea ce privește zona, cât și speciile, sau potențial subspeciile.

S-au realizat determinări din partea aeriană uscată și calcinată, recoltată în perioada înfloririi (mai-iulie). Indivizii au fost selectați aleatoriu în cadrul fiecărei populații, minim 15 indivizi. Prezentul studiu a evaluat atât mineralele esențiale pentru organismul uman (macroelemente, respectiv microelemente) din populațiile luate în studiu, cât și cele toxice (plumb și cadmiu).

Conținutul de substanțe minerale totale (cenușa) din populațiile analizate a variat între 1,19% la populația de *Th. pannonicus* ssp. *auctus* din zona Silagiu și 10,85% la cimbrisorul de cultură - *Th. vulgaris*, observându-se existența variațiilor individuale în funcție de specie, dar și în funcție de zona recoltării. În general, se remarcă o distribuție heterogenă a elementelor minerale în cele 18 populații de *Thymus* luate în studiu, atât în ceea ce privește macroelementele cât și microelementele. Distribuția macroelementelor și microelemente, pe specii, corespunde cu datele din literatura de specialitate.

Analiza macroelementelor determinate la nivel de populație, a arătat că cea mai mare cantitate de potasiu a fost determinată la specia *Th. praecox* ssp. *polytrichus* din Semenice, iar cea mai mică la specia *Th. pulegioides* ssp. *pulegioides* identificată zona Intrare Semenice. Pentru calciu și magneziu, cantitatea minimă a fost detectată la aceeași populație - *Th. praecox* ssp. *janke* din zona localității Coronini, în timp ce cantitatea maximă a fost detectată, în cazul calciului în aceeași zonă, Coronini, dar la populația de *Th. dacicus*, iar în cazul magneziului în populația de *Th. dacicus*, dar din zona localității Lescovița, urmată de *Th. dacicus* din zona localității Coronini. Acest rezultat poate fi relevant pentru studii ulterioare ce ar putea identifica noi instrumente de chemotaxonomie la nivel de specie.

În ceea ce privește elementele toxice, în peste 60% din populațiile luate în studiu au fost detectate cantități semnificative de plumb, cu o valoare determinată peste medie, iar în cazul ca cadmiului, cu o singură excepție, la populația de *Th. glabrescens* din zona Silagiu (0,183ppm), la toate populațiile au fost detectate cantități superioare de cadmiu, raportat la limitele stabilite de către Organizația Mondială a Sănătății.

Acest rezultat poate fi explicat prin particularitățile solului din arealul de creștere al acestor populații sau printr-un grad semnificativ de poluare al zonei, situație în care o activitate de cercetare ulterioară a acestui aspect este recomandată și foarte utilă, pentru a se stabili dacă aceste populații spontane de *Thymus*, recoltate frecvent ca plante medicinale, corespund și pot fi certificate ca fiind sigure pentru consum.

## 7 CONTRIBUȚII PRIVIND EVALUAREA DIVERSITĂȚII CHIMICE LA UNELE SPECII ALE GENULUI *THYMUS* DIN ZONA BANATULUI PE BAZA ANALIZĂRII CONȚINUTULUI DE ULEIURI ESENȚIALE

Scopul acestui studiu a fost extragerea și analizarea compoziției chimice a uleiurilor esențiale obținute de la specii ale genului *Thymus* colectate din cinci locații diferite din vestul României.

Au fost colectate cinci populații de cimbrisor, recoltate în perioada înfloririi, din cinci habitate diferite din Banat, Romania, în 2019 și 2020. Extracția uleiurilor esențiale a fost efectuată din părțile aeriene uscate ale plantelor întregi (herba), folosind echipamente de hidrodistilare (extractor Clevenger, model experimental, Timișoara, România). Uleiurile esențiale rezultate și amestecul de apă aromatică au fost separate utilizând o pâlnie de separare. Uleiurile esențiale pure au fost depozitate în flacoane de sticlă la +4 °C până la o analiză ulterioară. Randamentul de extracție a fost calculat ca procent de plante uscate (herba).

A fost determinat conținutul fenolic printr-un protocol alternativ pentru volume mici de probe Folin-Ciocalteu. Absorbanța probelor a fost măsurată la 750nm folosind un spectrofotometru UV-VIS (Analitic Jena Specord 205, Jena, Germania), în trei repetări. Cuantificarea s-a bazat pe o curbă standard generată cu acid galic; rezultatele au fost exprimate ca echivalenți mg de acid galic (GAE)/g de uleiuri esențiale. Toate probele au fost analizate în triplicat. Compoziția chimică a uleiurilor esențiale a fost studiată prin GC-MS. Compușii chimici din uleiurile esențiale extrase din partea aeriană a *Thymus*, au fost determinați utilizând un cromatograf gazos cuplat cu un spectrometru de masă triplu quadrupol. Toate determinările au fost făcute în trei exemplare și rezultatele sunt raportate ca valori medii ± deviație standard (SD). Datele au fost prelucrate statistic și corelate. Corelațiile dintre variabile au fost efectuate utilizând Microsoft Excel 2013.

Valoarea medie pentru conținutul total de polifenoli din cele cinci uleiuri esențiale luate în studiu a fost 68,410 ± 0,002 mg GAE/g probă. Comparativ cu specia cultivată, în uleiul esențial extras din populația de *Th. glabrescens* recoltată din zona localității Silagiu a fost detectată cea mai mare cantitate totală de polifenoli, depășind cu 58,97% cantitatea totală de polifenoli din specia cultivată. De asemenea, în uleiul esențial extras din alte două populații a fost detectată cu 52,49% mai mulți polifenoli totali la *Th. pulegioides* recoltată din zona localității Prigor, față de specia cultivată, respectiv cu 23,63% mai mulți polifenoli totali la *Th. pulegioides* recoltată din zona localității Carașova.

Singura valoare inferioară celei obținute la specia de cultură a fost determinată în populația de *Th. pulegioides* din Baziaș. Acest rezultat demonstrează faptul că în zona Banatului sunt prezente populațiile spontane de *Thymus* valoroase, care pot fi avute în vedere în scopul introducerii în cultură.

Pe de altă parte, variațiile semnificative ale profilului chimic identificate în *Th. pulegioides* colectate din diferite areale din vestul României indică un nivel ridicat al biodiversității acestei specii.

Investigații suplimentare privind polimorfismul chimic al acestei specii și potențialul său antimicrobian sunt utile în viitor. Activitatea antimicrobiană dovedită deja a acestor uleiuri reprezintă o cale de a descoperi noi modalități de conservare naturală, cu posibile utilizări în industria alimentară și cosmetică, înlocuind conservanții sintetici, compuși care prezintă a grad mai mare de toxicitate pentru oameni și animale.

## 8 CONTRIBUȚII PRIVIND ANALIZA PROPRIETĂȚILOR ANTIMICROBIENE ALE ULEIURILOR ESENȚIALE OBȚINUTE DIN SPECII ALE GENULUI *THYMUS* DIN ZONA BANATULUI

Scopul acestui studiu a fost de a analiza activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale (EO) obținute din specii ale genului *Thymus* colectate din cinci locații diferite din vestul României, respectiv efectele antimicrobiene și corelația lor cu compoziția chimică a uleiului esențial extras. Activitățile biologice au fost evaluate folosind metoda microdiluției. Testarea *in vitro* a uleiurilor esențiale s-a realizat pe tulpini de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Haemophilus influenzae* type B (ATCC 10211) *Candida albicans* (ATCC 10231) și *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019). Toate determinările au fost făcute în trei exemplare și rezultatele sunt raportate ca valori medii ± deviație standard (SD).

Analizând rezultatele complete ale testelor antibacteriene, putem concluziona că cele mai afectate tulpini atunci când s-au folosit uleiuri esențiale de la *Thymus*, au fost *S. flexneri*, *S. typhimurium* și *S. pyogenes* și în ceea ce privește activitatea antifungică, *C. parapsilopsis* s-a dovedit a fi mai sensibilă, comparativ cu *C. albicans*.

Studiul de corelație a evidențiat faptul că, compușii chimici ai uleiurilor esențiale obținute din specii ale genului *Thymus*, sunt responsabili de activitatea antimicrobiană, corelațiile existente fiind influențate prin



sinergismul/antagonismul exercitat între compușii chimici și caracteristicile morfologice ale tulpinilor microbiene investigate (Gram-pozitive, Gram-negative și ciuperci). Rezultatele obținute prin acest studiu atestă faptul că, există o relație semnificativă între activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale obținute din populații ale genului *Thymus* și prezența compușilor fenolici, cum ar fi timolul și carvacrolul.

### III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

În cadrul acestui studiu au fost analizate 37 populații de *Thymus*, 36 spontane și una cultivată. Identificarea populațiilor de cimbrisor s-a realizat în zone diferite, unele încadrate în unitățile teritoriale administrative ale unor parcuri naturale sau naționale (Parcului Național Domogled-Valea Cernei, Parcul Natural Portile de Fier, Parcul Național Semenic-Cheile Carașului) sau uneori în areale din afara acestora (Depresiunea Almăjului). Au fost identificate, caracterizate și analizate fenotipic, genotipic și biochimic un număr de 7 specii și 11 subspecii.

Din punct de vedere ale celor cinci caractere morfologice luate în studiu, cea mai mare similaritate fenotipică există între populațiile *Th. pannonicus* ssp. *auctus* de la Pojejena și *Th. pulegioides* ssp. *montanus* din aceeași zonă de recoltare. Se constată o similaritate foarte ridicată între populațiile de *Th. pulegioides* recoltate din locații diferite. De asemenea, populațiile de *Th. dacicus* de la Ostrov manifestă o similaritate fenotipică foarte mare și semnificativă pentru caracterele morfologice analizate. O asemănare morfologică pronunțată a fost observată și între populațiile de *Th. pulegioides* de la Carașova.

Variabilitatea interindividuală a fost ridicată la populațiile spontane, în special la *Th. pannonicus*, *Th. pulegioides*, *Th. glabrescens*, în timp ce la populația cultivată, *Th. vulgaris*, uniformitatea plantelor a fost considerabil mai ridicată.

Pentru toate caracterele morfologice studiate la populațiile de *Thymus*, se observă că valori ridicate și semnificative ale varianței a fost înregistrată în cazul lungimii frunzelor care manifestă o capacitate ridicată de diferențiere între populații. Cea mai redusă diversitate între populații a fost observată pentru lățimea frunzelor.

Sub aspect genotipic, ambele categorii de markeri utilizați în studiul nostru, atât primerii ISSR, cât și primerii ScoT s-au dovedit a fi potrivite pentru evaluarea variabilității la genotipurile de *Thymus* analizate. Numărul mediu ridicat de alele/primer îi situează în categoria markerilor înalt polimorfici.

Astfel, se observă o strânsă asociere și asigurată statistic între ierarhizarea populațiilor la nivel morfologic și respectiv molecular. Doar unii primeri ISSR pot fi utilizați eficient la evaluarea diversității la *Thymus*. Primerii ScoT pot fi utilizați cu o eficiență superioară pentru estimarea diversității interpopulaționale la *Thymus*, comparativ cu primerii ISSR. Acești primeri au structuri alelice diferite, astfel este recomandată utilizarea lor cumulată pentru evaluarea eficientă a diversității genetice la diferite populații de *Thymus*.

Dendrogramele permit evaluarea gradului de înrudire ale speciilor genului *Thymus*. Deocamdată nu s-a ajuns la o concluzie în ceea ce privește subspeciile studiate, analizele fiind concludente doar la nivel de specie.

Din punct de vedere biochimic, gradul de variabilitate al valorilor obținute la speciile larg răspândite în ceea ce privește continutul polifenolic total, indică faptul că este necesară o dezvoltare ulterioară a unor studii genotipice care să permită o posibilă corelație între speciile genului *Thymus* la nivel chimic și genetic. O validare a acestor studii, ar putea furniza caracteristici taxonomice suplimentare cu o posibilă utilizare în dezvoltarea unor instrumente mai rapide de determinare taxonomică.

Cantitatea de polifenoli totali prezintă diferențe semnificative în cadrul populațiilor de *Thymus* din zona Banatului, atât pentru plantele colectate din habitate naturale, cât și pentru cele cultivate în condiții de teren.

Populația de *Th. pannonicus* ssp. *auctus*, identificată în zona localității Pojejena, s-a evidențiat printr-o valoare mult superioară a cantității de polifenoli totali determinată, evaluare care deschide calea utilizării acestei specii ca o alternativă la specia cultivată, întrucât e dovedită relația directă între compușii fenolici și activitatea antimicrobiană și antifungică a cimbrisorului. Având în vedere acest rezultat, specia poate fi folosită ca plantă medicinală, prin exploatare directă, "in situ".

În funcție de similaritatea cantității determinate de polifenoli totali, poziționarea în grupuri diferite a două subspecii ale aceleiași specii la *Th. praecox*, este un rezultat care poate reprezenta un punct de plecare valid pentru dezvoltarea unor metode de amprentare biochimică a subspeciilor genului *Thymus*.

Conținutul de substanțe minerale totale (cenușa) din populațiile analizate, a variat în funcție de specie, dar și în funcție de zona recoltării. În general, se remarcă o distribuție heterogenă a elementelor minerale în populațiile de *Thymus* luate în studiu, atât în ceea ce privește macroelementele cât și microelementele. Distribuția macroelementelor pe specii, corespunde cu datele din literatura de specialitate.

Cantitatea de potasiu și de calciu acumulată în masa vegetală uscată, reprezintă un indiciu relevant la nivel de specie. Studiul acestor parametri se poate dovedi util, în sensul identificării de noi instrumente de chemotaxonomie la nivel de specie.

În ceea ce privește elementele toxice, au fost detectate cantități semnificative de plumb și cadmiu. Acest rezultat poate fi explicat prin particularitățile solului din arealul de creștere al acestor populații sau printr-un grad semnificativ de poluare al zonei. Rezultatele obținute atrag atenția asupra necesității studierii acestui aspect, la toate plantele medicinale recoltate, utilizate și procesate direct din flora spontană, pentru a se stabili dacă acestea corespund și pot fi certificate ca fiind sigure pentru consum.

La nivelul uleiurilor esențiale, din cele cinci uleiuri luate în studiu, trei au dovedit calități fitochimice superioare celui obținut la specia cultivată. Singura valoare inferioară celei obținute la specia de cultură, a fost determinată în populația de *Th. pulegioides* din Baziaș. Acest rezultat demonstrează faptul că, în zona Banatului există populații spontane de *Thymus* valoroase, care pot fi avute în vedere în scopul introducerii în cultură.

Pe de altă parte, variațiile semnificative ale profilului chimic identificate la specia *Th. pulegioides* colectată din diferite areale din vestul României, indică un nivel ridicat al biodiversității acestei specii. Investigații suplimentare privind polimorfismul chimic al acesteia și potențialul său antimicrobian sunt utile în viitor.

Ca activitate biologică, analizând rezultatele testelor antibacteriene, putem concluziona faptul că, cele mai afectate tulpini, atunci când s-au folosit uleiuri esențiale de la *Thymus*, au fost *S. flexneri*, *S. typhimurium* și *S. pyogenes*. În ceea ce privește activitatea antifungică, *C. parapsilopsis* s-a dovedit a fi mai sensibilă, comparativ cu *C. albicans*.

Studiul de corelație a evidențiat faptul că, compușii chimici ai uleiurilor esențiale obținute din specii ale genului *Thymus*, sunt responsabili de activitatea antimicrobiană, corelațiile existente fiind influențate prin sinergismul/antagonismul exercitat între compușii chimici și caracteristicile morfologice ale tulpinilor microbiene investigate (Gram-pozitive, Gram-negative și ciuperci). Rezultatele obținute prin acest studiu atestă faptul că, există o relație semnificativă între activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale obținute din populații ale genului *Thymus* și prezența compușilor fenolici, cum ar fi timolul și carvacrolul.

Activitatea antimicrobiană dovedită deja a acestor uleiuri, reprezintă o oportunitate de a descoperi noi modalități de conservare naturală, cu posibile utilizări în industria alimentară și cosmetică, înlocuind conservanții sintetici, compuși care prezintă a grad mai mare de toxicitate pentru oameni și animale.

#### **Direcții de dezvoltare posibile**

Analizele moleculare, deși costisitoare și complexe, ar putea oferi răspunsuri valide în determinările taxonomice, mai ales în cazul genului *Thymus*, prin dezvoltarea unei noi metode de identificare rapidă, pe baza extracției unei secvențe ADN dintr-o mostră vegetală minimală. Analiza SCoT și ISSR ar putea fi dezvoltată ca instrument complementar pentru determinarea taxonomică a speciilor de *Thymus*.

Variațiile semnificative ale profilului chimic al uleiului esențial, identificate în populațiile de *Thymus pulegioides* colectate din diferite locații din vestul României, indică un nivel ridicat al biodiversității acestei specii și se dovedesc utile pentru a fi investigate în continuare, în termeni de polimorfism, potențial chimic și antimicrobian. Activitatea antimicrobiană identificată a acestor uleiuri, reprezintă o cale de a descoperi noi modalități de conservare naturală, cu posibile utilizări în industria alimentară și cosmetică, înlocuind conservanții sintetici, cu un grad mai mare de toxicitate pentru oameni și animale.

Identificarea unor compuși chimici organici predominanți, permite stabilirea unor corelații între conținutul de polifenoli totali și elementele minerale, în scopul dezvoltării unor metode de identificare rapidă, prin chemotaxonomie. Analiza comparativă a unor macroelemente și microelemente din masa vegetală uscată și sol, se impune ca o necesitate, în vederea identificării unor fenomene de bioacumulare de elemente toxice în plante. Aprofundarea studiilor privind corelațiile dintre compoziția chimică a populațiilor și compoziția chimică a solului, se poate dovedi utilă, oferind posibilități de ecologizare a solurilor contaminate cu metale grele.

Realizarea unor studii de cartare economică privind populațiile genului *Thymus*, sunt necesare atât în scopul stabilirii bazinelor de recoltare, cât și al recomandării cantităților optime ce pot fi obținute din flora spontană, ținând cont de necesitatea refacerii arealului natural.

#### **IV. ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚII INOVATIVE**

Există un număr foarte restrâns de studii de dată recentă, care să realizeze analize complexe, multiparametrice, asupra speciilor genului *Thymus* din zona Banatului. Acest aspect este important și pentru faptul că, prin numărul și diversitatea lor, aceste specii contribuie în mod semnificativ la biodiversitatea habitatelor naturale.

Prin cercetarea de față s-a reușit corelarea complexă, statistică, a caracterelor morfologice determinate cu analizele moleculare bazate pe markeri moleculari. Am identificat markeri moleculari ce pot fi folosiți ca instrument taxonomic complementar în studiile de sistematică a plantelor.

Uleiurile esențiale din populațiile spontane de *Thymus* studiate, dovedesc un potențial biologic semnificativ și își găsesc utilizări practice, certificând posibilitatea utilizării acestora în scop medicinal. Prin acest studiu am identificat populații care pot fi avute în vedere în scopul introducerii în cultură, având avantajul aclimatizării existente deja pentru zona de vest a țării, precum și o rezistență mai bună la boli și dăunători.

Cantitățile de metale grele identificate prin acest studiu, au indicat un grad semnificativ de poluare al solului din arealul de creștere al acestor populații. Atragem atenția asupra faptului că, munții Aninei, zona Semenic, masivul Domogled, sunt zone montane care nu sunt situate în proximitatea unor surse de poluare cunoscute și există numeroase persoane care recoltează aceste plante din flora spontană în scop medicinal, atât pentru uz personal, cât și în scopul comercializării în piețe sau societăți de procesare a plantelor medicinale. Includerea unor analize chimice, cantitative, pentru metale grele, de către unitățile care preiau plante medicinale recoltate din flora spontană, își poate dovedi utilitatea și necesitatea.

### **Bibliografie**

Bibliografia cuprinde 177 de titluri bibliografice.