RODICA POP

STUDIUL VARIABILITĂȚII SOMACLONALE LA VIȚA DE VIE CU AJUTORUL MARKERILOR MOLECULARI

STUDY OF SOMACLONAL VARIATION IN GRAPEVINES ASSISTED BY MOLECULAR MARKERS

ISBN 978-973-88929-6-5

Bioflux, Cluj-Napoca, 2008

Autor:

Pop Rodica

Referenți științifici:

Prof. Univ. Dr. Ing. Marin Ardelean

Prof. Univ. Dr. Ing. Doru C. Pamfil

Director editură:

Cercet. Dr. Ioan Valentin Petrescu-Mag

Consilier editorial:

Lector Dr. Ruxandra Mălina Petrescu-Mag

Editura Bioflux, Cluj-Napoca, 2008

ISBN 978-973-88929-6-5

Responsabilitatea conținutului lucrării revine în exclusivitate autorului. Reproducerea acestor materiale prin orice mijloc, sau stocarea lor în orice bază de date, obligă pe cel care o face să citeze corect autorii/editorii, anul și editura.

CUPRINS

Cuvânt înainte 9
Introducere 11
CAP. I. Metode de producere a variabilității la vița de vie 15
1.1. Metode convenționale 15
1.1.1. Hibridarea sexuată 15
1.1.2. Poliploidia 18
1.1.3. Consangvinizarea şi heterozisul 19
1.1.4. Mutageneza 21
1.2. Metode neconvenționale de creare a variabilității la plantele cultivate şi la vița de vie 23
1.2.1. Variabilitate somaclonală. Cauze şi frecvența de apariție 23
1.2.1.1. Tipuri de variabilitate somaclonală 26
1.2.1.2. Importanța variabilității somaclonale 28
1.2.1.3. Originea variabilității somaclonale 30
1.2.1.4. Variația preexistentă 30
1.2.1.5. Inducerea variabilității somaclonale 32
1.2.1.6. Factorii care influențează spectrul şi amplitudinea variabilității somaclonale 33
1.2.1.6.1. Modul de regenerare 33
1.2.1.6.2. Regulatorii de creştere 33
1.2.1.6.3. Cultivarul 34
1.2.1.6.4. Vârsta cultivarului 35
1.2.1.6.5. Nivelul de ploidie 35
1.2.1.6.6. Sursa explantului 36
1.2.1.6.7.Genotipul 38
1.2.1.6.8. Durata timpului de cultură *in vitro* 40
1.2.1.6.9. Rata de proliferare 41
1.2.1.6.10. Presiunea de selecție 41
1.2.1.6.11. Condițiile de cultură 42
1.2.1.6.12. Rata variației somaclonale 43
1.2.1.7. Tipuri de modificări genetice asociate variabilității somaclonle 44
1.2.1.8. Mecanismele variabilității somaclonale 45
1.2.1.9. Metode de evidențiere a variabilitații somaclonale 45
1.2.1.10. Mutageneza *in vitro* 47
1.2.1.11. Transformarea genetică 50
1.3. Evidențierea variabilității genetice cu ajutorul markerilor moleculari 51
1.3.1. Markerii RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 51
1.3.2. Markerii AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) 58
1.3.3. Aplicațiile tehnicii RAPD şi AP-PCR 59
1.3.4. Markerii RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 62
1.3.5. Markerii AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 62
1.3.6. Markerii SSR (Simple Sequence Repeats) 64

CAP. II. OBIECTIVELE CERCETĂRII, MATERIALUL ŞI METODA..... 67
2.1. Scopul cercetărilor 67
2.1.1. Obiectivele urmărite în cercetările aferente tezei de doctorat..... 68
2.2. Materialul biologic 69
2.2.1. Materialul biologic utilizat în experiențele de diferențiere a soiurilor cu ajutorul markerilor moleculari..... 69
2.2.1.1. Descrierea soiurilor luate în studiu 69
2.2.1.2. Primerii utilizați în amplificarea ADN-ului 82
2.2.2. Materialul biologic utilizat în experiențele de producere a variabilității somaclonale în condiții de laborator..... 84
2.2.2.1. Medii de cultură folosite 84
2.2.2.2. Regulatorii de creştere utilizați, rol şi funcții hormonale 85
2.2.2.2.1. Auxinele 86
2.2.2.2.2. Citochininele 87
2.2.2.3. Prepararea soluțiilor stoc pentru mediile de cultură ... 88
2.2.2.4. Primerii utilizați în amplificarea ADN-ului regeneranților obținuți 90
2.3. Metode de lucru..... ….91
2.3.1. Metode de lucru aplicate în experiențele cu material biologic produs *in vivo*..... 91
2.3.1.1. Extracția de ADN în vederea executării analizelor RAPD 91
2.3.1.2. Cuantificarea ADN-ului 96
2.3.1.3. Protocol de amplificare RAPD 96
2.3.1.4. Electroforeza în gel de agaroză 98
2.3.1.4.1. Prepararea gelurilor de agaroză şi a probelor de ADN 98
2.3.1.4.2. Migrarea electroforetică 99
2.3.1.5. Preluarea imaginilor 100
2.3.1.6. Analiza imaginilor 100
2.3.2. Metode de lucru aplicate în experiențele cu material biologic produs *in vitro*..... 101
2.3.2.1. Metodele de multiplicare *in vitro* utilizate în experiențe 101
2.3.2.2. Multiplicarea prin lăstărire axilară 101
2.3.2.3. Cultura de calus 102
2.3.2.4. Multiplicarea prin muguri sau lăstari adventivi.....103
2.3.2.5. Sterilizarea materialului biologic, a recipientelor şi mediilor de cultură utilizate în experiențele *in vitro*....104
2.3.2.6. Organizarea experiențelor realizate în condiții de cultură *in vitro* 105
2.3.2.6.1. Multiplicarea prin lăstărire axilară 105
2.3.2.6.2. Cultura de calus 106
2.3.2.6.3.Inducerea şi dezvoltarea lăstarilor multipli .107
2.3.2.6.4. Extracția ADN-ului 109

2.3.2.6.5. Cuantificarea, amplificarea ADN-ului şi electroforeza în gel de agaroză 109
2.3.3. Metode statistice de calcul şi interpretare a rezultatelor..... 110
CAP.III. REZULTATE ŞI DISCUŢII..... ..112
3.1. Rezultate privind extracţia probele de ADN provenite din materialul biologic *in vivo* ..... .112
3.1.1. Rezultate privind amplificarea şi electroforeza produşilor de reacţie……..……126
3.1.2. Rezultate privind analiza imaginilor şi interpretarea datelor..... 133
3.1.3. Analiza dendrogramei 135
3.2.Rezultate obţinute în experienţele de multiplicare *in vitro*..... 139
3.2.1. Rezultate obţinute în experienţele de multiplicare prin lăstărire axilară 139
3.2.1.1. Numărul de lăstari obţinuţi prin micromultiplicare prin lăstărire axilară 141
3.2.1.2. Lungimea lăstarilor obţinuţi prin multiplicarea din segmente nodale 146
3.2.1.3. Numărul de noduri/neoplantulă observat în urma micromultiplicării din segmente nodale la viţa de vie . 152
3.2.2. Rezultate obţinute în experienţele de inducere a calusogenezei 159
3.2.2.1.Influenţa soiului şi a mediului de cultură asupra cantităţii de calus format în experienţele de inducere a calusogenezei 165
3.2.3. Rezultate experimentale privind regenerarea de neoplantule din calus menţinut timp îndelungat în cultură..... 167
3.2.3.1. Numărul de neoplantule regenerate 168
3.2.3.2. Lungimea lăstarilor (neoplantulelor) regeneraţi 173
3.2.4. Rezultate privind identificarea, la nivel molecular, a variabilităţii somaclonale indusă prin regenerarea din calus menţinut timp îndelungat în cultură..... 176
3.2.4.1. Rezultate privind extracţia şi cuantificarea ADN-ului 176
3.2.4.2. Rezultate privind amplificarea şi electroforeza produşilor de reacţie 177
CAP.IV. CONCLUZII 185
4.1.Concluzii referitoare la variabilitatea, la nivel molecular a materialului biologic provenit *in vivo*..... ……185
4.2. Concluzii referitoare la materialul biologic obţinut *in vitro*..... ...187
BIBLIOGRAFIE..... 191
Anexa 1 209
Listă abrevieri 216
Rezumat..... 217
Rezumat în limba engleză ..... …….....…….245

TABLE OF CONTENTS

Foreword 9
INTRODUCTION 11
CHAP. I. METHODS OF PRODUCING VARIABILITY IN THE GRAPEVINE. 15
1.1. Conventional methods 15
1.1.1. Sexted hybridation 15
1.1.2. Polyploidy..... 18
1.1.3. Cosangvinization and heterosis 19
1.1.4. Mutagenesis 21
1.2. Unconventional methods of creating variability in culture plants and in grapevine 23
1.2.1. Somaclonal variability. Cause and occurrence 23
1.2.1.1. Types of somaclonal variability 26
1.2.1.2. Importance of somaclonal variability 27
1.2.1.3. Origin of somaclonal variability 30
1.2.1.4. Pre-extant variation 30
1.2.1.5. Induction of somaclonal variability 32
1.2.1.6. Factors influencing the spectre and amplitude in somaclonal variability 33
1.2.1.6.1. Way of regeneration 33
1.2.1.6.2. Growth regulators 33
1.2.1.6.3. The Cultivar 34
1.2.1.6.4. Age of cultivar 35
1.2.1.6.5. Level of ploidy 35
1.2.1.6.6. Source of explant 36
1.2.1.6.7. The Genotype 38
1.2.1.6.8. *In vitro* culture term 40
1.2.1.6.9. Rate of proliferation 41
1.2.1.6.10. Selection pressure 41
1.2.1.6.11. Culture conditions 42
1.2.1.6.12. Rate of somaclonal variation 43
1.2.1.7. Types of genetic alterations associated to somaclonal variability 44
1.2.1.8. Mechanisms of somaclonal variability 45
1.2.1.9. Methods of highlighting somaclonal variability 45
1.2.1.10. *In vitro* mutagenesis 47
1.2.1.11. Genetic transformation 50
1.3. Highlighting the genetic variability by means of molecular markers…. 51
1.3.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers 51
1.3.2. AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) markers 58
1.3.3. Application of RAPD and AP-PCR techniques 59
1.3.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) markers) 62
1.3.5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers..... 62
1.3.6. SSR (Simple Sequence Repeats) markers…..... 64

CHAP. II. OBJECTIVES OF THE REASEARCH, MATERIAL AND METHOD 67
2.1. The goal of the reasearch work. 67
2.1.1. Objectives pursued in the research work pertaining to the Doctoral Disertation 68
2.2. Biological material.....69
2.2.1. Biological material used in experiments of differentiating the varieties by means of molecular markers……. 69
2.2.1.1. Description of varieties taken in study 69
2.2.1.2. Primers used in DNA amplification 82
2.2.2. Biological material used in experiments of producing somaclonal variability within laboratory conditions……. 84
2.2.2.1. Culture media used 84
2.2.2.2. Growth regulators used, role and hormonal functions 85
2.2.2.2.1. Auxines 86
2.2.2.2.2. Citokinins 87
2.2.2.3. Preparation of stock solutions for culture media ..88
2.2.2.4. Primers used in amplification of DNA of obtained regenerants 90
2.3. Work methods ..... ….91
2.3.1. Work methods applied in experiments with biological material produced *in vivo* ……91
2.3.1.1. DNA - extraction in view of carrying out RAPD analyses 91
2.3.1.2. DNA-quantification 96
2.3.1.3. Protocol of RAPD amplification 96
2.3.1.4. Electrophoresis in agarose gel 98
2.3.1.4.1. Preparation of agarose gel and DNA samples 98
2.3.1.4.2. Electrophoretic migration 99
2.3.1.5. Taking over of images 100
2.3.1.6. Image analysis 100
2.3.2. Work methods applied in experiments with biological material produced *in vitro*…….....101
2.3.2.1. Methods of multiplication *in vitro* utilized in experiments 101
2.3.2.2. Multiplication *via* axilary shooting 102
2.3.2.3. Callus culture 103
2.3.2.4. Multiplication *via* buds and adventive shoots 104
2.3.2.5. Sterilization of biological material, recipients and of culture media used in *in vitro* experiments……..…...105
2.3.2.6. Organisation of experiments carried out in culture conditions *In vitro* 105
2.3.2.6.1. Multiplication *via* axilary sooting 106
2.3.2.6.2. Callus culture 107

2.3.2.6.3. Induction and development of multiple shoots 109
2.3.2.6.4. DNA –extraction 109
2.3.2.6.5. Quantification, amplification of DNA and electrophoresis in gel agarose 110
2.3.3. Statistical methods of calculation and interpretation of data 112
CHAP.III. RESULTS AND DISSCUTIONS 112
3.1. Results regarding extraction of DNA samples coming from *in vivo* biological material 126
3.1.1. Results regarding amplification and electrophoresis of reaction products ……..……..…133
3.1.2. Results regarding image analysis and data interpretation..... 135
3.1.3. Dendrogram analysis 139
3.2. Results obtained with experiments of *in vitro* multiplication 139
3.2.1. Results obtained in experiments of multiplication *via* axilary shooting……. 141
3.2.1.1. Numbers of shoots obtained through micromultiplication *via* axilary shooting 146
3.2.1.2. Length of shoots obtained by multiplication from nodal segments 152
3.2.1.3. Numbers of nodes/neoplantule witnessed after micro-multiplication from nodal segments in the grapevine…….159
3.2.2. Results obtained in experiments of callusogenesis induction… 165
3.2.2.1. Influence of variety and culture medium on callus quantity formed in experiments of inducing callusogenesis..... 167
3.2.3. Experimental results on regeneration of neoplantules from callus maintained in culture for long time……..……168
3.2.3.1. Numbers of regenerated neoplantules 173
3.2.3.2. Length of regenerated shoots (neoplantules) 176
3.2.4. Results on identification at molecular level of somaclonal variability induced through regeneration from callus maintained in culture for long while…….. 176
3.2.4.1. Results on extraction and quantification of DNA 173
3.2.4.2. Results regarding amplification and electrophoresis of reaction products 177
CHAP. IV. CONCLUSIONS 185
4.1. Conclusions referring to variability at molecular level of biological material arising *in vivo*…….. ……..... 185
4.2. Conclusions referring to biologic material obtained *in vitro*..... 187
REFERENCES 191
Appendix 1 209
List of abreviations 216
Romanian summary 217
English summary ..... ……...…….245

Cuvânt înainte

Caracterizarea moleculară a soiurilor din genul *Vitis* luate în studiu s-a realizat cu ajutorul markerilor RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Toate experiențele noastre s-au desfăşurat în cadrul Departamentului de Biotehnologii al Universității de Ştiințe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, având ca suport financiar grantul CNCSIS tip A nr. 51 "Studiul variabilității somaclonale la vița de vie cu ajutorul markerilor moleculari", aprobat în anul 2003.

Țin să-mi exprim o mare recunoştință față de domnul profesor dr. Marin Ardelean, conducătorul meu de doctorat care a manifestat bunăvoință şi m-a ghidat cu atenție deosebită în realizarea acestui studiu. Generozitatea sa, rigoarea, spiritul de cercetare, experiența şi vastele cunoştințe în domeniu, mi-au trezit spiritul de cercetare şi m-au ajutat în desăvârşirea mea profesională.

Îmi exprim gratitudinea față de domnul profesor dr. Pamfil Doru, de un profesionalism inestimabil, care m-a îndrumat şi mi-a acordat întreg sprijinul, contribuind nemijlocit la îmbogățirea cunoştințelor mele în domeniul biotehnologiilor şi al micropropagării, implicându-se în mod direct în definitivare prezentei teze de doctorat. Ii aduc sincere mulțumiri pentru tot ceea ce a făcut pentru mine şi pentru tot ce am învățat de la dânsul.

Mulțumesc mult prietenei mele Andreea Balogh pentru bunăvoința arătată în descifrarea tainelor biotehnologiilor şi ajutorul acordat la realizarea primelor amplificării de ADN.

Recunoştință şi mulțumiri aduc şi colegilor mei de la departament: ing. Ioana Gaboreanu, profesor dr. Constantin Botez, asistent Paul Raica, şef de lucrări Mirela Cordea, ing. Monica Bodea, care m-au ajutat în realizarea multor experiențe de laborator, acordându-mi tot sprijinul.

De asemenea, țin să mulțumesc tuturor colegilor şi prietenilor de la Departament pentru suportul moral, încurajări şi înțelegerea avută pentru mine.

Lucrarea este structurată în următoarele părți: Cuvânt înainte, Introducere, Obiectivele cercetărilor, Materialul şi metoda de lucru, Rezultate şi discuții, Concluzii, Bibliografie şi Anexe.

Lucrarea are un număr de 258 de pagini, 37 de tabele, 43 de figuri şi un număr de 196 referințe bibliografice. Anexele cuprind lista cu soluțiile stoc utilizate şi lista de abrevieri.

Autoarea

INTRODUCERE

Cercetările paleontologice au dovedit că vița de vie a existat înainte de apariția omului pe pământ. Protostrămoşii viței de vie cultivați astăzi se pare că ar fi apărut în perioada cretacică a planetei. Fosilele vitaceaelor din perioada cretacică a planetei au fost însă contestate de majoritatea cercetătorilor, deoarece existau confuzii între presupusele frunze pietrificate de viță de vie şi cele ale arborilor forestieri. Dovezi certe provin din era neozoică sau terțiară - perioada paleogenă. Din această perioadă au fost scoase la iveală cele mai multe fosile ale vitaceaelor, raportate la patru genuri actuale – *Vitis, Ampelopsis, Cayratia, Tetrastigma*.

Procesul esențial, care a generat trecerea de la vița sălbatică la vița cultivată, este variabilitatea naturală, care a permis omului să aleagă vițele cele mai valoroase din flora spontană şi să le cultive în mod conştient (ȚÂRDEA şi colab., 1995).

Soiurile de viță de vie sunt mai vechi decât oricare alte soiuri ale speciilor de plante domestice, unele perpetuându-se în timp, din antichitatea greacă sau romană până astăzi. Apariția mutațiilor, selecția şi înmulțirea vegetativă a plantelor, purtătoare de mutații au constituit factorii diversificării genetice în cadrul formelor cultivate, diversitate amplificată mai târziu de intensificarea crescândă a lucrărilor de creare de soiuri noi. Numeroase soiuri s-au răspândit în diferite țări şi regiuni ale globului, apărând clone sau selecții extrem de asemănătoare între ele, denumite diferit, în timp ce alte soiuri vechi s-au pierdut, ne mai fiind înmulțite (SESTRAŞ, 2004).

Studiul soiurilor de viță de vie a constituit o preocupare a oamenilor de ştiință încă din antichitate.

Studiile ampelografice ajută la aprecierea valorii soiurilor după criterii unice, la compararea caracterelor şi însuşirilor sortimentului cultivat, la evitarea confuziilor dintre unele soiuri apropiate şi eliminarea numeroaselor sinonimii.

În decursul veacurilor, metodologia folosită la descrierea soiurilor s-a perfecționat continuu, pe măsura acumulării de noi cunoştințe şi a progreselor realizate în alte domenii. La început, majoritatea ampelografilor au folosit metoda descrierii botanice a organelor viței de vie. Astfel, se lua în considerare, în special, caracterele de specie: frunza, bobul şi strugurele, aceste elemente fiind mai uşor de sesizat.

În stadiul actual, ampelografia consideră că descrierea botanică este incompletă, fiind necesară şi studierea influenţei condiţiilor ecologice şi de cultură asupra variabilităţii caracterelor morfologice şi a însuşirilor agrobiologice şi tehnologice.

Cercetările efectuate la viţa de vie au stabilit centrele genetice de formare a genului *Vitis* şi apartenenţa soiurilor la anumite grupe ecologo-geografice.

La soiurile cu origine certă se cunosc părerile diferiţilor ampelografi privind momentul când acestea au fost introduse în producţie sau semnalate în literatura de specialitate. De asemenea se fac aprecieri asupra provenienţei şi modului de apariţie la soiurile apărute şi fixate pe cale vegetativă.

În cazul soiurilor cu origine necunoscută sau incertă se menţionează date referitoare la vechimea în cultură a soiului, ipoteze cu privire la provenienţă, răspândire (POENARU, 1970).

În ameliorare, identificarea soiurilor în primele stadii de dezvoltare este extrem de dificilă, elementele caracteristice soiului apărând în mod treptat, în anii următori. La prima apariţie, unele organe cum ar fi cârceii şi inflorescenţele sunt slab dezvoltate devenind, apoi, tot mai tipice pe măsura trecerii anilor (ARDELEAN, 1986).

De asemenea, în cazul portaltoilor, metodele ampelografice de identificare nu pot fi folosite decât în plantaţiile de portaltoi, nu şi după altoire.

În ultimii ani, odată cu apariţia markerilor moleculari, identificarea cultivarelor s-a realizat la nivel de proteine cu ajutorul izoenzimelor şi la nivel de ADN prin metode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) şi SSR (Simple Sequence Repeats).

Identificarea cultivarelor cu ajutorul polimorfismului la nivel de ADN este extrem de utilă, datorită faptului că rezultatul obţinut reflectă direct genotipul şi nu este influenţat de condiţiile de mediu. De asemenea, sunt disponibile un număr foarte mare de secvenţe de ADN, care pot releva polimorfism, iar ADN-ul poate fi izolat aproape din orice ţesut (POP şi colab., 2004).

Datorită simplităţii metodei RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA – (WILLIAMS şi colab., 1999), a faptului că necesită cantităţi extrem de mici de ADN şi a capacităţii de a releva un grad înalt de polimorfism, aceasta a fost aplicată cu

succes la diferite specii de plante, inclusiv la *Vitis vinifera* (WOLF şi colab., 2001, RYAN şi colab., 2001, TESSIER şi colab., 1999, FANIZZA şi colab., 1999, BOHM şi colab., 1998, PAMFIL, 1999).

Cercetările de genetică moleculară la vița de vie sunt orientate, în general, spre identificarea polimorfismului existent în cadrul speciilor de *Vitis* şi spre stabilirea originii filogenetice a unor specii sau soiuri.

Vița de vie este o plantă la care înmulțirea se realizează cel mai frecvent vegetativ. Altoirea este o metodă prin care se asigură transmiterea neschimbată a caracterelor şi însuşirilor la descendenți. Până nu demult, la baza identificării a mai mult de 6000 de cultivare au stat caracterele ampelografice sau criteriile morfologice. Metodele clasice, fenotipice de identificare nu sunt totdeauna suficiente să rezolve aceste probleme, datorită instabilității caracterelor morfologice precum şi neputinței de a utiliza informațiile în identificarea plantelor tinere. Studiul izoenzimelor şi tehnicile RFLPs, RAPD şi a microsateliților sunt folosite în tot mai mare măsură pentru identificarea varietăților de viță de vie (TESSIER şi colab., 1999).

Originea şi autenticitatea multor cultivare de viță de vie (*Vitis vinifera*), folosite pentru producția de vin în lume, este neclară şi constituie subiectul multor controverse. În acest sens, într-un studiu, amprentele ADN generate cu ajutorul tehnicilor RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) şi ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction) au fost folosite pentru a compara patru cultivare de *Vitis vinifera* folosite pe scară largă în Chile (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot şi Carmenere). Ca şi referință externă a fost folosit material vegetal provenit din Franța.

Ambele tehnici au fost capabile să evidențieze diferențe între cultivarele studiate, chiar dacă puterea de diferențiere a metodei ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) a fost mai bună decât cea a metodei RAPD. Acest lucru sugerează faptul că este de dorit utilizarea tehnicii ISSR-PCR atunci când se studiază un număr mare de cultivare.

În mod surprinzător, a fost observată variabilitate între clonele de Merlot, clona originală din Chile şi provenienția din Franța. Mai mult decât atât, distanța mare dintre cele două provenințe (64% asemănare) sugerează faptul că soiul Merlot franțuzesc nu

este o rudă chiar atât de apropiată a provenienței din Chile. Este interesant faptul că, cel din urmă, provine direct de la primul fondator francez al clonelor de Merlot. Nu s-a găsit nici o variație în cadrul Merlot-ului din Chile folosind analizele ISSR sau RAPD. Aceste rezultate arată că varietățile de Merlot cultivate în Franța şi Chile reprezintă genotipuri diferite.

Înrudirea genetică dintre cultivarele tradiționale de viță de vie a fost din totdeauna un motiv de polemică. Nici metodele clasice sau ampelografice, nici chimia analitică nu pot rezolva dezordinea existentă în clasificarea cultivarelor de viță de vie sau să aducă informații ştiințifice despre gradul de heterozigoție al acestora, pentru a putea fi folosite în procesul de ameliorare la această specie. De mai mulți ani, markerii moleculari sunt utilizați pentru caracterizarea genotipică. În timp ce metodele RFLP şi RAPD permit o caracterizarea genetică limitată, metoda SSR (markeri microsatelit) este mai avantajoasă pentru caracterizarea genotipică şi are anumite avantaje, față de primele două metode.

Pe baza celor constatate mai sus, în lucrarea prezentată ne-am propus ca prim obiectiv utilizarea metodei RAPD pentru testarea hetermorfismul molecular la zece cultivare de viță de vie provenite din cinci stațiuni viticole. Un alt obiectiv a constat în inducerea variabilității somaclonale şi testarea, prin aceeaşi metodă, a hetermorfismului molecular la regeneranții obținuți *in vitro*.

CAPITOLUL I

METODE DE PRODUCERE A VARIABILITĂȚII LA VIȚA DE VIE

1.1. METODE CONVENȚIONALE

1.1.1. Hibridarea sexuată

După cum se ştie în cadrul fiecărei specii există un număr de gene valoroase, acumulate în decursul evoluției speciei respective. Pentru a se crea ecotipuri echilibrate, capabile de performanțe cât mai mari, ameliorarea caută să îmbine armonios cât mai multe gene favorabile.

Principala cale de realizare a acestui scop o constituie recombinarea, prin hibridare, a genelor existente în diferitele genotipuri disponibile.

Prin hibridare se creează material inițial nou şi se realizează o sursă de variabilitate importantă pentru procesul ameliorării. De cele mai multe ori formele hibride prezintă o variabilitate sporită față de formele parentale din care provin. Prin hibridare se obțin forme hibride care cumulează într-un grad accentuat însuşirile genitorilor. Hibridarea poate fi definită ca o metodă de ameliorare folosită pentru obținerea de noi genotipuri prin unirea, pe cale sexuată şi parasexuată, a unor soiuri, linii, varietăți, specii sau chiar genuri de plante, diferite în ceea ce priveşte una sau mai multe gene.

Genitorii care se folosesc în hibridare pot fi apropiați sau îndepărtați genetic. Când se folosesc genitori din cadrul aceleiaşi specii se realizează o hibridare apropiată - intraspecifică, iar când genitorii aparțin la alte specii sau genuri se realizează o hibridare îndepărtată - interspecifică sau intergenerică (SAVATTI, 1983).

O nouă perspectivă în procesul de ameliorare bazat pe hibrizi îndepărtați o are hibridarea somatică (parasexuală) ce se realizează prin intermediul culturilor de țesuturi şi celule. Cercetările efectuate până în prezent demonstrează că sistemul culturilor de țesuturi şi de celule, îndeosebi utilizarea protoplaştilor, permite realizarea

unor hibrizi somatici între organisme care aparţin la taxoane foarte diferite genetic şi taxonomic, facilitând transferul la plantele de cultură a informaţiei genetice de la taxoanele supraspecifice. Fuziunea protoplaştilor reprezintă o metodă cu totul nouă de creare de hibrizi, la care problema incompatibilităţii formelor parentale nu se pune (SAVATTI, 1983).

Metoda hibridării parasexuate a dat, până în prezent, o serie de rezultate palpabile la nivelul plantelor monocotiledonate. Numărul de specii care se pretează la hibridarea somatică este într-o continuă creştere. Cu toate succesele obţinute în acest domeniu, mai există încă impedimente cum ar fi:

- tehnica producerii, culturii şi regenerării protoplaştilor nu este complet pusă la punct;
- acelaşi lucru se poate spune şi referitor la tehnica fuziunii protoplaştilor;
- nu dispunem de metode adecvate pentru selecţia hibrizilor somatici;
- metoda se aplică la un număr încă relativ mic de specii;
- în multe cazuri ADN-ul transferat este degradat de către enzimele plantei gazdă;
- mecanismul molecular al integrării ADN-ului în ADN-ul gazdei nu este încă pe deplin elucidat (SAVATTI, 1983).

La viţa de vie, procesul de ameliorare are la bază selecţia naturală, selecţia culturală şi selecţia artificială. În obţinerea de genotipuri noi, un rol important îi revine selecţiei artificiale.

După gradul de înrudire a formelor genitoare în ameliorarea viţei de vie se folosesc trei tipuri de hibridări dirijate: hibridări intraspecifice, interspecifice şi intergenerice.

Hibridarea intraspecifică s-a dovedit eficientă pentru realizarea unor obiective generale de ameliorare reprezentate de potenţialul de producţie şi calitate, epoca de maturare a strugurilor, structura morfologică favorabilă mecanizării lucrărilor agrofitotehnice, rezistenţa la secetă, plasticitatea ecologică etc., dar mai puţin eficientă în realizarea unor obiective speciale, ca de exemplu rezistenţa la unele boli criptogamice, rezistenţa la filoxeră şi la condiţiile de iernare (OPREA şi colab., 2007).

În lucrările de ameliorare intreprinse până acum în țara noastră pentru crearea de soiuri noi de struguri de masă se evidențiază genitorii Afuz Ali, Alphonse Lavallée, Coarnă albă, Coarnă neagră, Regina viilor etc. În obținerea soiurilor apirene genitori valoroşi s-au dovedit soiurile: Braghină, Perlette, Sultanină, Maria Pirovano. La crearea de soiuri pentru vinuri albe buni genitori sunt soiurile: Aligote, Crâmpoşie, Chardonnay, Fetească regală, Grasă de Cotnari etc., iar soiurile pentru vinuri roşii: Băbească neagră, Merlot, Negru vârtos, Pinot noire, Cabernet Sauvignon etc. (OPREA şi colab., 2007).

Hibridările interspecifice au în vedere asocierea caracterelor şi însuşirilor de producție şi de calitate specifice soiurilor vinifera, formelor rezistente la boli criptogamice, la filoxeră şi la condițiile de iernare. Astfel, ca sursă de germoplasmă pentru rezistența la mană şi la filoxeră se pot folosi biotipuri ale speciilor: *Vitis riparia, Vitis cinerea, Vitis berlandierii, Vitis rotundifolia*. Pentru sporirea rezistenței la condițiile de iernare se pot utiliza ca genitori biotipuri ale speciilor asiatice – *Vitis amurensis* – cu mare rezistență la ger sau a unor specii americane cum ar fi *Vitis riparia* şi *Vitis labrusca.*

Hibridările interspecifice între soiuri vinifera cu specii americane şi asiatice aparținând subgenului *Euvitis* sunt compatibile, obținându-se descendenți viabili şi fertili. Nu acelaşi lucru se poate spune despre hibridările interspecifice între soiuri vinifera şi specii aparținând subgenului *Muscadinia*, care au un număr diferit de cromozomi şi calitatea diferită a genomurilor.

În țara noastră, prin hibridări intraspecifice au fost create 57 de soiuri noi aparținând grupei *Vinifera*, iar prin hibridări interspecifice complexe au fost create 11 genotipuri (soiuri noi cu rezistență biologică) valoroase, cumulând caractere şi însuşiri de producție şi calitate, alături de rezistență sau toleranță sporită la unele boli criptogamice active şi la condiții de iernare (OPREA şi colab., 2007). Dintre soiurile obținute prin hibridari intraspecifice putem aminti: Crâmpoşie selecționată, Triumf, Regner, Select, Nobless, Osiris, Gloria, Faber etc. (ARDELEAN şi colab., 2006).

1.1.2. Poliploidia

Poliploidia a jucat un rol important în evoluția plantelor. Poliploidia a dat naştere la noi specii care s-au extins dincolo de arealul de existență al speciilor diploide. (SAVATTI, 1983).

Euploidia şi aneuploidia sunt cele mai reprezentative tipuri de variație a numărului de cromozomi, care afectează în mod pregnant cantitatea şi calitatea informației genetice, caracteristică unei anumite specii.

Dată fiind importanța excepțională a materialului genetic pentru existența individului, orice modificare ce apare în structura numerică a seturilor cromozomiale are repercusiuni majore, concretizate prin dobândirea unor noi însuşiri morfoanatomice şi ecofiziologice de către indivizii afectați de modificări numeric cromozomiale.

Fenomene biologice cu largă răspândire în natură, euploidia şi aneuploidia sunt consecința acțiunii spontane a unor factori ecofiziologici, fizici, chimici şi biologici ai mediului de viață, care pot induce multiplicarea seturilor de bază sau a complementului haploid de cromozomi, pierderea din sau adăugarea la garnitura standard a unuia sau mai multor cromozomi. Frecvența remarcabilă a acestor fenomene, îndeosebi în lumea plantelor, constituie o dovadă elocventă a rolului lor stabilizator, adaptativ, a importanței lor deosebite în evoluția naturală a viețuitoarelor, în speciație.

Odată cu descoperirea fenomenelor de poliploidie şi cu descifrarea cauzelor şi a mecanismelor care duc la apariția naturală a formelor euploide şi aneuploide, oamenii de ştiință au acționat în mod consecvent în sensul inducerii unor astfel de fenomene prin mijloace proprii. Deşi au trecut mai multe decenii de la raportarea primului caz de poliploidie şi aneuploidie, fenomenele merită şi azi toată atenția, deoarece constituie încă o cale sigură, eficientă şi rapidă de creare de forme noi, de sinteză de noi specii. (SAVATTI, 1983).

Poliploidia indusă prezintă perspective deosebite la speciile horticole ce se înmulțesc vegetativ la care nu se pune problema fertilității scăzute sau chiar a lipsei de fertilitate a unor tipuri de poliploizi. La aceste specii sterilitatea unor poliploizi se

poate dovedi avantajoasă deoarece duce la formarea de fructe fără semințe sporindu-se astfel calitatea producției.

Primele cercetări privind poliploidia la vița de vie – *Vitis vinifera*, 2n = 28 – au fost efectuate de NEBEL (1929), care semnalează pentru prima dată forme tetraploide, 2n = 56, la soiurile Sultanină şi Muscat de Alexandria. BRANS (1930), citat de ANGHEL şi colab. (1980) arată că soiul Cannon Hall este tetraploid. SCHERZ (1940), citat de ANGHEL şi colab. (1980) descrie o formă tetraploidă la soiul Riesling de Mosela. De LATTIN, ALLEY, OLMO (citați de ANGHEL şi colab., 1980) identifică forme poliploide la soiurile Cabernet, Sauvignon, Carignon, Folleblanche, Olivette noir etc. MAGNER, descrie 48 forme tetraploide la vița de vie, iar RIVES şi PUGET stabilesc că renumitul soi Chasselas Gras Coulard este tetraploid (ANGHEL şi colab.,1980). În anul 1997 în Hiroşima, Japonia, a fost obținut cultivarul tetraploid de viță de vie Sunny Rouge prin încrucişarea dintre *Vitis labruscana* x *Vitis vinifera*, iar în anul 1998 cultivarele tetraploide Dark Ridge şi Honey Venus rezultate prin selecția hibrizilor proveniți din aceeaşi combinație parentală (YAMADA şi colab., 2003).

Experiențe de obținere experimentală a poliploidiei la vița de vie au efectuat şi LELAKIS, DERMEN, EINSET, EVIN, iar în țara noastră NEAGU şi LEPĂDATU (ANGHEL şi colab., 1980).

Printre caracterele afectate de poliploidie sunt: forma şi mărimea frunzelor, ciorchinilor, boabelor, care caracterizează producție de must (ANGHEL şi colab., 1980).

1.1.3. Consangvinizarea şi heterozisul

Prin consangvinizare se înțelege înmulțirea, prin autofecundare forțată, a plantelor alogame hermafrodite şi monoice sau prin încrucişarea între indivizi apropiat înrudiți la plantele dioice.

Consangvinizarea a fost utilizată pentru prima dată în scopuri practice, de către EAST şi SHULL (după POTLOG şi VELICAN, 1974), îndeosebi la porumb. Ea a fost utilizată pentru obținerea de linii consangvinizate (forme homozigote), cât şi pentru desfacerea populațiilor existente în genotipurile lor componente.

Consangvinizarea oferă avantajul de a permite izolarea de genotipuri homozigote, deci stabile, care pot fi apoi utilizate în producerea de hibrizi comerciali. Într-adevăr, homozigotarea, care se produce în urma consangvinizării, duce la apariția, prin segregare şi recombinare, a unor noi genotipuri. Homozigoția completă apare după un număr mare de consangvinizări repetate, în funcție de gradul de heterozigoție a materialului inițial şi are ca urmare eliminarea genelor letale sau subletale. Genotipurile care apar pot fi homozigote recesive sau homozigote dominante. Majoritatea genotipurilor homozigote recesive prezintă fenomene de nanism, defecte clorofiliene, malformații, sterilitate parțială sau totală, dar şi unele însuşiri valoroase pentru ameliorare, cum ar fi: tulpini scurte şi rezistente la cădere (porumb şi sorg), tulpini erecte şi bogate în frunze (la trifoi), conținut ridicat de proteine, anumiți aminoacizi şi grăsimi (la porumb), conținut scăzut în alcaloizi (la lupin), rezistență la stresurile climatice, boli şi dăunători, precocitate. Formele homozigote recesive pot fi uşor recunoscute şi eliminate sau reținute din prima sau a doua generație consangvinizată.

Deosebit de valoroase sunt genotipurile homozigote dominante, deoarece, prin încrucişări, însuşirile şi caracterele valoroase ale acestora se transmit descendenței, indiferent de constituția genetică a partenerului (SAVATTI, 1983).

La vița de vie, observațiile cu privire la studiul consangvinizării şi heterozisului au debutat odată cu începutul ameliorării ei pe cale generativă, în a doua jumătate a secolului al XIX-lea.

În cazul viței de vie, pentru obținerea de linii consangvinizate, într-o primă fază se aleg prin selecție individuală butuci elită din populația fiecărui soi propus homozigotării, genotipuri care să exprime fidel caracterele şi însuşirile specifice urmărite. Prin autofecundări repetate la elitele alese în faza inițială, se obțin generații segregante, care vor fi supuse în continuare selecției, în vederea identificării pentru fiecare soi a liniilor pure (consangvnizate), cu valoare ameliorativă ridicată. Obținerea liniilor consangvnizate şi apoi realizarea formelor heterozis, prin încrucişarea acestor linii constituie un proces anevoios şi de lungă durată, fapt pentru care consangvnizarea şi heterozisului constituie metode de ameliorare mai puțin aplicate, în forma „clasică”.

Ca şi la ale specii şi la vița de vie, au fost semnalate depresii pentru anumite

caractere, începând cu generația a treia, fiind necesară efectuarea de backros-uri cu genitori recurenți, în vederea introducerii în recurent a caracterului dorit, urmate de autofecundări şi de menținere în cadrul liniei, a caracterului homozigot.

Aşa după cum preciza NEGRUL, 1955, citat de OPREA şi colab. (2007), obținerea de genotipuri cu caractere şi însuşiri superioare ca urmare a manifestării heterozisului, se pot realiza prin încrucişări între linii consangvinizate, polenizări libere, hibridări dirijate între soiuri, în special cele aparținând unor grupe ecologogeografice diferite, hibridări între soiuri şi specii etc.

Heterozisul apare în rândul hibrizilor din prima generație şi se remarcă printr-o sporire a vitalității, a vigorii plantelor, în general, al potențialului productiv şi de calitate al strugurilor în special. Manifestarea heterozisului este importantă atât pentru producție şi productivitate cât şi pentru calitatea recoltei de struguri. Un exemplu, îl constituie soiul de struguri pentru masă Cardinal, obținut prin încrucişarea soiurilor Ahmed bon Ahmed x Alphonse Lavallée. Strugurii acestui soi se pot consuma şi la un conținu scăzut de zahăr ca urmare a acidității reduse (OPREA şi colab., 2007).

1.1.4. Mutageneza

Definirea noțiunii de mutație

Cercetarea mutațiilor a contribuit la dezvoltarea cunoştințelor despre ereditate, la cunoaşterea evoluției şi la elaborarea unor sisteme de clasificare a plantelor pe baze genetice.

Apariția în natură a unor modificări bruşte a fost remarcată de mulți cercetători şi practicieni încă din secolul al XVI-lea.

Până la începutul secolului nostru, termenul de mutație se folosea ori de câte ori într-o populație apăreau indivizi cu caractere şi însuşiri noi prin care se deosebeau de cei normali. Acest fenomen a fost explicat pentru prima dată, pe baze ştiințifice, de către HUGO DE VRIES în lucrarea "Teoria mutației" (1901).

BAUER (1964), care s-a ocupat timp îndelungat cu studiul mutațiilor, a arătat că prin mutație "se înțelege orice variație ereditară care nu este rezultatul unei încrucişări". După GUENOT (1967), "mutația reprezintă o variație bruscă de

amplitudine diferită şi imediat ereditară ce poate să apară spontan sau ca rezultat al unei acţiuni experimentale". Mai recent, ZOLYNEAK (1968), citat de CRĂCIUN şi colab. (1979), arată că prin mutaţie "se înţelege orice modificare bruscă ce îşi face apariţia în constituţia genetică a unui individ datorită unor schimbări care au loc în structura genelor".

În natură mutaţiile favorabile se păstrează prin selecţie naturală. Mutaţiile genice naturale nu manifestă nici o specificitate evidentă faţă de mediu sau de locusul afectat. Cu toate acestea, unele modificări ale condiţiilor de mediu pot influenţa rata mutaţiilor genice. De exemplu, schimbările de temperatură modifică rata mutaţiilor genice (NICOLAE, 1978).

Punerea la punct a diferitelor metode de inducere a mutaţiilor, care sporesc cu mult frecvenţa acestora, a făcut posibil ca, alături de hibridare, mutageneza să devină o metodă de bază în sporirea variabilităţii genetice.

Pe lângă mutaţiile genice există şi schimbări survenite în structura cromozomilor. S-a constatat, de asemenea, existenţa mutaţiilor şi la materialul ereditar situat în afara nucleului, în citoplasmă, ceea ce determină apariţia plasmomutaţiilor sau a mutaţiilor citoplasmatice.

Frecvenţa mutaţiilor naturale se consideră a fi de 2-5%, din care numai 1% sunt vizibile.

Mutaţiile artificiale, care au frecvenţa de circa 4-150 de ori mai mare decât cele naturale, realizează în proporţie extrem de mare (99%) forme negative şi un procent extrem de scăzut de forme pozitive, utilizabile în procesul de ameliorare (SAVATTI, 1983).

Mutantele naturale constituie şi pentru viţa de vie o sursă importantă de creştere a variabilităţii genetice şi prin aceasta, o cale de obţinere de noi soiuri. Un exemplu îl reprezintă soiurile noi Furmint de Miniş şi Băbească gri, care au fost obţinute prin identificarea şi fixarea unor variaţii mugurale apărute spontan (OPREA şi colab., 2007). De asemenea, VIALA şi VERMOREL, 1910, citaţi de OPREA şi colab. (2007) consideră că soiul Chardonnay musque este o variaţie mugurală a soiului Chardonnay.

De-a lungul timpului, soiurile *vinifera* au evidenţiat variaţii mugurale multiple pentru o gamă largă de caractere şi însuşiri, cum ar fi prezenţa seminţelor în bob (soiul

Corint noir, cunoscut ca soi apiren), mărimea strugurelui şi a bobului, desimea de inserare a boabelor pe ciorchine.

COCIU, OPREA (1989), citaţi de OPREA şi colab., 2007, consideră că între mutantele naturale apărute spontan şi cele induse pe cale artificială, nu există diferenţe de fond. Mutaţiile naturale ca de altfel şi cele induse pe cale artificială, afectează în principal caractere şi însuşiri cu ereditate simplă, cum ar fi forma şi mărimea boabelor, culoarea pieliţei, morfologia şi funcţionalitatea florilor, prezenţa sau absenţa seminţelor în bob, culoarea, consistenţa şi aroma pulpei boabelor etc.

Coclchicina, utilizată pentru stimularea procesului de poliploidizare a fost folosită şi la viţa de vie, obţinându-se forme tetraploide (4n = 76 cromozomi) cu valoare biologică, cum ar fi Kyoho şi Pione sau aneuploidul Takao cu 75 de cromozomi, obţinuţi în Japonia. Alături de formele tetraploide pentru ameliorarea viţei de vie prezintă importanţă şi formele triploide (3n = 57 cromozomi) care prezintă vigoare sporită a creşterilor anuale şi o bună maturare a lemnului coardelor de un an, caractere utile pentru ameliorarea portaltoilor (OPREA şi colab., 2007).

1.2. METODE NECONVENŢIONALE DE CREARE A VARIABILITĂŢII LA PLANTELE CULTIVATE ŞI LA VIŢA DE VIE

1.2.1. Variabilitate somaclonală. Cauze şi frecvenţa de apariţie

Cultura de ţesuturi constituie o metodă rapidă şi sigură de înmulţire asexuată a plantelor. În prezent, multe specii ornamentale, lemnoase şi plante de cultură sunt micropropagate *in vitro* şi comercializate.

Micropropagarea prin culturi de ţesuturi a revitalizat anumite sectoare ale industriei plantelor ornamentale şi a facilitat introducerea rapidă de noi cultivare. În ciuda succeselor înregistrate în înmulţirea dar şi în obţinerea de noi cultivare prin micropropagare, mulţi comercianţi se îndoiesc de valoarea acestei metode de înmulţire a plantelor, deoarece multe cultivare prezintă fenomenul de variaţie somaclonală.

Regenerarea plantelor din celule cultivate *in vitro* este un proces asexuat, care

implică numai diviziuni celulare mitotice. Procesul de regenerare a neoplantulelor poate fi considerat ca fiind sinonim cu clonarea, având în vedere că toate celulele somatice ale plantei donor provin din aceeaşi celulă ou şi ar trebui să fie identice din punct de vedere genetic. Deci, se poate presupune că toate plantele regenerate din celulele unei plante mamă sunt clone.

În altă ordine de idei, SCOWCROFT (1985) citat de SKIRVIN (1994), studiind variabilitatea somaclonală, afirmă că "uniformitatea clonală este recunoscută mai degrabă ca o excepție, decât ca o regulă".

Variabilitatea somaclonală este neuniformitatea care apare între plantele regenerate prin cultura de țesuturi. Variația poate fi preexistentă sau poate fi indusă.

Asupra populația în care variabilitatea naturală este asociată cu cultura de țesuturi se poate acționa cu o anumită presiune de selecție pentru a izola clone.

Valoarea variabilității care poate fi aşteptată variază cu clona, vârsta culturii, utilizarea agenților mutageni, aplicarea unei anumite presiuni de selecție în culturile de suspensii celulare, cultura de calus sau condițiile de stres, ca de pildă concentrația de sare, erbicide, microorganisme sau alte bioproduse şi metaboliți specifici ai acestora (SKIRVIN, 1994).

Exploatarea variabilității naturale şi induse pare special aplicabilă cultivarelor lemnoase vechi. De exemplu, soiul de păr „Barlett" (*Pyrus communis* L.) ca şi cel de măr „Delicious" (*Malus domestica* Borkh), introduse în 1770 şi respectiv 1893 (SKIRVIN, 1994), se poate să fi acumulat multe celule mutante care s-au stabilizat în himere de complexități variate.

SHEPARD şi colab.(1980), au demonstrat apariția unei mari variabilități între plantele regenerate prin cultura de protoplaşti (protoclone) proveniți din frunze de cartof. LARKIN şi SCOWCROFT (1981), au fost primii care au sugerat folosirea termenului de variabilitate somaclonală, pentru descrierea variației fenotipice observată, după mai multe pasări, la anumite plante regenerate din culturi de țesuturi sau culturi de celule. Variațiile culturilor de țesuturi au mai fost denumite „caliclone" (SKIRVIN şi JANICK, 1976), fenovariante (SIBI, 1976) şi protoclone (SEPARD şi colab., 1980). Totuşi, se pare că termenul de variabilitate somaclonală descrie cel mai bine acest fenomen şi de aceea a devenit un fel de termen standard.

Vița de vie este una dintre principalele culturi horticole răspândite în toată lumea. Multe cultivare aparținând unui număr mic de specii ale genului *Vitis* au fost comercializate în ultimele secole, dar industria necesită noi cultivare cu grad mărit de rezistență şi productivitate.

Metodele tradiționale de ameliorare sunt limitate din cauza duratei lungi a unei generații şi a naturii extrem de heterozigote a acestei culturi. Dezvoltarea metodelor biotehnologice, la plante, a dus la utilizarea tehnicilor *in vitro* în scopul ameliorării culturilor. Variabilitatea somaclonală (LARKIN şi SCOWCROFT, 1988) este considerată o sursă de obținere de noi genotipuri de plante în ameliorare şi perfecționarea tehnicilor, la nivel de culturi de țesuturi, au deschis noi posibilități pentru aplicații în viticultură (ALLEWELDT şi POSSINGHAM, 1988; MONETTE, 1988; DELOIRE şi MAURO, 1991; PIVEN şi colab., 1991; GRAY şi MEREDITH, 1992). Unele publicații au sugerat că, în principiu, embriogeneza somatică poate fi indusă la diferite explante de viță de vie (KRUL şi WORLEY, 1977; RAJASEKARAN şi MULLINS, 1979; BOUQUET şi colab., 1982; BESSIS şi LABROCHE, 1985; HIRABAYASHI, 1985; REISCH şi colab., 1985; MAURO şi colab., 1986; MARCHEKO şi colab., 1987; GRAY şi MORTENSEN, 1987; GLEBA şi colab., 1988; STAMP şi MEREDITH, 1988; PIVEN şi colab., 1991; COUTOS-THEVENOT şi colab., 1992; GRAY 1992; MARTINELLI şi colab., 1993; ZLENKO şi TROSHNI, 1993; EMERSHAD şi RAMMNING, 1994). Cu toate acestea, informații despre variabilitatea la plantele regenerate sunt destul de puține, până în prezent fiind raportate numai câteva exemple de variabilitate somaclonală la vița de vie (BOUQUET, 1989; FALLOT şi colab., 1990; DELOIRE şi MAURO, 1991; PIVEN şi colab., 1991).

KUKSOVA şi colab. (1997), citați de POPESCU şi colab. (2004), au analizat variabilitatea caracterelor morfologice la 242 de plante, dintre care şase tetraploide, plante regenerate prin embriogeneză somatică din fragmente de frunză. S-a constatat că majoritatea somaclonelor diploide au prezentat variații minore ale morfologiei frunzelor. Totuşi, printre plantele regenerate din calus au fost identificate patru somaclone cu durată de vegetație mai lungă, trei cu o durată de vegetație mai scurtă şi două somaclone care au diferențiat un număr mare de lăstari fertili, comparativ cu

genotipul de origine Podarok Magaracha. Dintre somaclonele diploide au fost selecționate două variante rezistente la *Plasmopara viticola*, opt variante rezistente la *Botrytis cinerea* şi una foarte rezistentă la ambii agenți patogeni.

Plantele tetraploide s-au caracterizat printr-un fenotip atipic, prezentând pețiolul şi internodiile mai scurte şi mai subțiri, frunze modificate, precum şi o vigoare redusă de creştere a butucilor.

Variabilitatea caracterelor de rezistență la boli a plantelor regenerate *in vitro* din țesuturi somatice, în vederea selecției de noi genotipuri cu calități superioare celor de origine, constituie un obiectiv important al unor stațiuni de cercetare din țara noastră. Astfel, la stațiunea Ştefăneşti au fost făcute observații la un număr de 341 de plante, din care 32 obținute prin embriogeneză somatică indirectă din culturi de pețiol, ovule şi antere, 37 obținute prin embriogeneză somatică directă din antere, 83 obținute prin organogeneză din frunze şi pețiol, 97 obținute prin germinarea *in vito* a embrionilor zigotici imaturi, 92 obținute prin mutageneză *in vitro*. S-a constatat că majoritatea plantelor de viță de vie, indiferent de soiurile din care provin, de tipul de explant şi de modelul de regenerare, s-au încadrat în categoriile „foarte rezistent” şi „rezistent”. Un exemplu îl constituie plantele regenerate din calus diferențiat din segmente de pețiol aparținând soiul Bezsemen. Acest soi era calificat „mediu rezistent” la mană, iar plantele regenerate au intrat în categoria „rezistent”. De asemenea, plantele regenerate din fragmente de frunză şi segmente de pețiol, aparținând soiurilor Aromat de Iaşi şi Timpuriu de Pietroasa, „sensibile” la *Plasmopara viticola*, au manifestat un grad diferit de toleranță la acest agent patogen, încadrându-se în categoriile „rezistent” şi „mediu rezistent” (POPESCU, TEODORESCU, 2004).

1.2.1.1. Tipuri de variabilitate somaclonală

Variabilitatea somaclonală se pare că rezultă atât datorită variabilității genetice preexistente în plante, cât şi ca o consecință a variației indusă în timpul culturilor de țesuturi.

Există două tipuri de variabilitate somaclonală: variabilitatea ereditară, genetică (mutațională) şi variabilitatea epigenetică (de expresie).

Când nu se cunoaşte natura variației, dacă este genetică sau epigenetică, se

acceptă folosirea termenului de „variaţie”. Termenii „variaţie genetică” şi „mutantă” se utilizează pentru desemnarea variaţiei care se transmite sexuat conform legilor eredităţii sau se menţine timp de mai multe generaţii obţinute prin multiplicare vegetativă.

Variaţia heritabilă rămâne nemodificată pe parcursul ciclului sexuat sau prin înmulţire asexuată.

Explantele provenite de la părinţi maturi, prin multiplicare *in vitro*, se juvenilizează treptat. Culturile de ţesuturi se pot afla în orice stadiu al dezvoltării, de la maturitate până la juvenilitate. Plantele regenerate din aceste ţesuturi diferă, depinzând de stadiul de dezvoltare pe care ţesutul l-a atins la acceptarea stimulului de regenerare.

Uneori apar schimbări în necesităţile nutriţionale, schimbări cunoscute sub denumirea de “habituaţie celulară”. Alte schimbări epigenetice includ vigoarea extremă *ex vitro* care este probabil asociată fie cu revenirea juvenilităţii fie cu eliminarea virusurilor realizată anterior *in vitro* (ABO şi HILDEBRANDT, 1971).

În timp, de cele mai multe ori, plantele cu variaţii epigenetice revin la fenotipul parental. Vigoarea de scurtă durată (temporară) a fost exploatată în culturile de ţesuturi pentru producerea de plante tinere viguroase care să fie transplantate uşor, să crească rapid şi să devină stabile (SWARTZ şi colab., 1981). Fenomenul de piticire este probabil epigenetic şi poate fi datorat regulatorilor de creştere din mediul de cultură. Multe plante pitice revin însă la creşterea normală după unul sau doi ani de vegetaţie normală în seră sau câmp.

La viţa de vie, variabilitatea caracterelor şi instabilitatea genetică a plantelor regenerate din antere a fost adesea semnalată şi la plantele pe rădăcini proprii transplantate în câmp. Astfel, plantele regenerate din antere prin embriogeneză somatică, din hibridul interspecific Gloryvine (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*), au prezentat anomalii de dezvoltare (piticire, albinism), variaţii ale formei frunzei, ale sinusului peţiolar şi ale numărului de lobi foliari, caractere care s-au dovedit a fi tranziente. De asemenea, unele plantele obţinute din embrioni somatici au prezentat tipuri diferite de floare, fiind hermafrodite, în timp ce Gloryvine este un genotip cu flori funcţional mascule (POPESCU şi TEODORESCU, 2004).

1.2.1.2. Importanța variabilității somaclonale

Pentru ca variabilitatea somaclonală să aibă un impact pozitiv în procesul de ameliorare este necesar să se urmeze o schemă de multiplicare *in vitro* care să ducă la obținerea unor plante care să manifeste variații utile pentru procesul de ameliorare sau pentru producție (SKIRVIN şi colab., 1994).

Variația somaclonală prezintă avantaje şi dezavantaje. Principalele dezavantaje sunt determinate de faptul că apariția şi frecvența variațiilor depind de genotip. Foarte multe schimbări pot fi lipsite de importanță, deci nedorite, iar altele sunt instabile – epigenetice.

De asemenea, unele variații pot apare şi spontan iar altele pot fi numai induse prin mutageneză. Mai mult, caracterele de interes economic pot să nu fie afectate de variații. Se poate concluziona, deci, că nu există certitudinea că parcurgerea unui ciclu de cultură *in vitro* va induce modificări ale unor însuşiri care prezintă un interes specific.

Un avantaj important constă în faptul că variabilitatea somaclonală poate constitui o sursă suplimentară de caractere utile, importantă mai ales pentru speciile care se înmulțesc asexuat sau sunt apomictice şi care au o bază genetică limitată. La unele specii, frecvența mare a modificărilor unor caractere face din variabilitatea somaclonală o sursă de mutante utile.

Rata mare de dublare a numărului de cromozomi prin cultura *in vitro* permite, la unele specii, diploidizarea haploizilor sau obținerea poliploizilor prin regenerarea plantelor *in vitro*. Incidența mare a rearanjamentelor structurale, mai ales a translocațiilor care au loc în timpul cultivării *in vitro,* permite realizarea unor introgresii la hibrizii interspecifici şi intergenerici. Multe schimbări se reflectă favorabil asupra unor caractere importante din punct de vedere agronomic, cum sunt rezistența la boli sau la dăunători, productivitatea, conținutul de proteine, toleranța la stress. Astfel de schimbări pot să apară la un singur regenerant sau la scara întregii populații de plante regenerate *in vitro*.

Deşi este un fenomen nou şi care nu este pe deplin controlat, variabilitatea somaclonală a făcut posibilă obținerea unor soiuri noi la unele specii cum ar fi:

Eustoma grandiflorum, Hemerocallis, Paulownia tomentosa, Pelargoniu, Torenia, Rubus, Apium, Ipomoea batata, Medicago sativa (BADEA şi colab., 2001) (tabelul 1).

Variațiile somaclonale pot reprezenta o metodă de ameliorare superioară celei obținute prin transformările genetice mediate de *Agrobacterium,* aceasta din urmă implicând dificultăți tehnice mai mari ca în primul caz. Superioritatea variabilității somaclonale pentru ameliorarea plantelor este dată de faptul că noile caractere se dezvoltă la nivelul celor mai performante cultivare disponibile, în timp ce organismele transformate genetic sunt doar surse de gene favorabile ce trebuie, de regulă, transferate celor mai productive cultivare.

Tabelul 1

Cultivare horticole obținute din culturi de țesuturi prin variabilitate somaclonală (după SKIRVIN şi colab., 1994)

Horticultural cultivars derived from tissue culture via somaclonal variation (SKIRVIN et. al., 1994)

Cultivarul *Cultivar*	Sursa *Source*
Eustoma grandiflorum *Hemerocallis* Yellow Tinkerbell *Paulownia tomentosa* somaclona Snowstorm *Pelargonium* Velvet Rose *Torenia* Uconn White	GRIESBACH şi SEMENIUK, 1987; GRIESBACH şi colab., 1988 GRIESBACH, 1989 MARCOTRIGIANO şi JAGANNATHAN, 1988 SKIRVIN şi JANICK, 1976b BRAND şi BRIDGEN, 1989
Rubus Lincol Logan	HALL şi colab., 1986b, 1986c
Apium somaclona UC-T3 *Ipomoea batatas* Scarlet	HEATH-PAGLIUSO şi colab., 1989 MOYER şi COLLINS, 1983

Variabilitatea somaclonală presupune inducerea expresiei genelor care sunt prezente în genom, dar care au fost reprimate într-un anumit stadiu de dezvoltare. Evident că trebuie să existe o certitudine că astfel de caractere sunt stabile de-a lungul a mai multor generații de înmulțire vegetativă, asexuată.

De exemplu, MARETZKI (1987), citat de SKIRVIN şi colab., 1994, a izolat o somaclonă, la trestia de zahăr (*Saccharum officinarum* L.), care prezenta rezistență la pătare (*Pseudocercosporella heroptrichoides*). Acest caracter a fost menținut stabil prin înmulțire asexuată, timp de zece ani, după care a fost pierdut, ceea ce sugerează că

a fost fie o variație epigenetică, fie că în cei zece ani a apărut o nouă tulpină a ciupercii, pentru care variația respectivă nu mai era rezistentă.

1.2.1.3. Originea variabilității somaclonale

Cauzele apariției variabilității somaclonale nu sunt pe deplin cunoscute şi elucidate. Cu toate acestea, se consideră că variabilitatea somaclonală heritabilă se datorează mai multor tipuri de variații, cum ar fi modificări la nivelul unei singure perechi de baze azotate, deleţiilor cromozomale, translocațiilor, modificărilor gradului de ploidie, variațiile nefiind limitate numai la nivelul ADN-ului nuclear. GENGENBACH şi UMBECK (1982) au semnalat apariția variației mitocondriale în controlul androsterilității utilizând enzime de restricție pentru analiza ADN-ului mitocondrial izolat.

Întregul spectru de variații ereditare cunoscute, la nivel nuclear sau citoplasmatic, sugerează că variabilitatea somaclonală care se bazează pe astfel de variații, poate genera forme utile pentru îmbunătățirea cantității şi calității producției.

1.2.1.4. Variația preexistentă

Explantele derivate – provenite de la o singură clonă, semințele sau puieții sunt uniformi din punct de vedere genetic, deci instabilitatea genetică spontană survine doar ca urmare a culturii *in vitro* (ORTON, 1983). Totuşi, această presupunere nu este întodeauna întemeiată deoarece explantele pot conține mai multe tipuri de celule, ca de pildă floem, parenchim, cortex şi xilem parenchimatic. Aceste celule pot fi, de asemenea, cu grade diferite de ploidie. Aceasta explică lipsa uniformității explantelor multicelulare din punctul de vedere al gradului lor de ploidie. BRIGHT şi colab. (1983) sugerează ca explantele, provenite de la o altă sursă decât protoplaştii, să fie numite culturi complexe, datorită originii lor multicelulare.

Himerele. Multe plante sunt cunoscute ca fiind himere. Ele sunt alcătuite din sectoare de celule sau țesuturi cu o constituție genetică diferită şi acestea s-au dezvoltat din meristeme conținând straturi sau sectoare cu țesuturi mutante

(HARTMAN şi KESTER, 1983). Plantele himere provenite din culturi de ţesuturi pot produce un procent mare de variaţii ereditare.

Mc PHEETERS şi SKIRVIN (1983), citat de SKIRVIN (1994), au raportat că aproape jumătate din lăstarii din murul himer fără spini, obţinuţi din culturi de ţesuturi, au fost pitici şi fără spini.

O mare parte a variaţiei a fost atribuită segregării himerale. Deşi multe tipuri de variaţii somaclonale pot fi explicate cu termenul de himere segregate, regeneranţii pot conţine variaţii somaclonale rezultate din diferite variaţii, altele decât segregarea himerală simplă.

Testarea variabilităţii somaclonală preexistentă se efectuează prin supunerea plantelor obţinute unei noi regenerări prin cultura *in vitro*. Clonele cu variaţie preexistentă, prezintă variabilitate mai mare în prima generaţie şi mult mai mică în următoarele generaţii. După a doua sau a treia generaţie unele din variaţiile preexistente pot fi eliminate sau stabilizate.

Cea mai frecventă cauză a separării himerelor o constituie producerea de lăstari adventivi (MARCOTRIGIANO, 1990, citat de SKIRVIN şi colab. (1994). Lăstarii adventivi pot fi obţinuţi *in vivo* sau *in vitro*. Aceştia adesea apar de la o singură celulă sau câteva celule, provenite din ţesuturi specifice (BROERTJES şi KEEN, 1980, citaţi de SKIRVIN, 1994). Considerând că lăstarii adventivi provin de la o singură celulă, se poate afirma că orice sistem care produce lăstari adventivi poate avea ca rezultat segregarea himerală.

Formarea lăstarilor adventivi, fiind rezultatul segregării himerale, este corelat direct cu rata de inducere a variaţiei somaclonale. (KARP, 1989). Este foarte bine cunoscut că lăstarii cu origine preformată, de exemplu lăstarii axilari, manifestă mai puţină variaţie, decât aceia care apar de la muguri adventivi prin organogeneză sau embriogeneză (KARP, 1989). Cea mai mare parte a acestei variaţii este, probabil, datorată variaţiei preexistente sau variaţiei induse în timpul formării calusului, şi nu procesului de formare a lăstarului în sine. Invers, stabilitatea clonală este menţinută când se evită formarea lăstarilor adventivi (KARP, 1989). De aceea, în culturile de vârfuri de lăstari moderat proliferative şi bine îngrijite se aşteaptă o slabă variaţie, deoarece propagulele se dezvoltă din muguri axilari şi, în consecinţă, menţin

integritatea stratului histogenic. Acesta a fost cazul murului non himeric. De fapt, utilizarea comercială a tehnicilor de înmulțire prin culturi de țesturi a murului non himeric, genetic fără spini, constituie o metodă rapidă, fără risc pentru producerea de plante uniforme, viguroase şi productive.

Studii recente arată că şi la viața de vie pot să apară himere. Astfel, cercetările întreprinse de BERTSCH şi colab. (2005) la *Vitis vinifera*, evidențiază clona 96 a cultivarului Chardonnay ca fiind o himeră periclinală care a fost testată şi la nivel molecular cu markerii SSR VMC 6c10 şi VMC 5g7. De asemenea, la cultivarul Meunier prin cultura *in vitro* de muguri adventivi au fost evidențiate plantule considerate himere periclinale (POGANY şi colab., 2006).

1.2.1.5. Inducerea variabilității somaclonale

Calusul este adesea asociat cu variabilitatea somaclonală, variațiile obținute din calus purtând numele de caliclone. (SKIRVIN şi colab., 1976, citat de SKIRVIN, 1994). La început cultivarele obținute *in vitro,* indiferent de specie, au fost numite caliclone.

Variația este asociată, în cazul caliclonelor, cu regenerarea directă din calus sau din suspensii de celule şi nu cu micropropagarea sau cultura de meristeme (KARP, 1989). Legătura între calus şi variabilitatea somaclonală este strânsă, cele mai multe laboratoare comerciale încercând să evite formarea calusului în oricare stadiu al micropropagării.

Inițierea calusului *in vitro* apare mai rapid la nivelul suprafețelor rănite, în zona de tăiere a explantului în contact cu mediul de cultură. Formarea calusului este, probabil, analoagă cu răspunsul la rănire, observat *in vivo*, care activează elementele transpozabile şi stimulează apariția enzimelor şi formarea produşilor specifici induşi de stress. (Mc CLINTOCK, 1984).

Desigur, variația nu este limitată doar la regenerarea calusului. EVANS (1988) relatează, la regeneranții din frunze de *Nicotiana alata* Link x *Otto*, apariția variației unor caractere morfologice (forma florilor, forma frunzelor, înălțimea plantelor, viabilitatea polenului) şi a numărului de cromozomi. Variația se observă, de asemenea, şi printre plantele regenerate prin embriogeneză.

1.2.1.6. Factorii care influenţează spectrul şi amplitudinea variabilităţii somaclonale

1.2.1.6.1. Modul de regenerare

Stabilitatea regeneranţilor este mult mai mare în cazul când aceştia se obţin prin embriogeneză somatică. Astfel, la *Datura innoxia,* plantele regenerate prin embriogeneză somatică directă au fost diploide, în timp ce 70% dintre regeneranţii obţinuţi prin organogeneză indirectă au fost poliploizi.

La viţa de vie, HIRABYASHI şi colab., (1976), citaţi de POPESCU şi TEODORESCU (2004) au obţinut pentru prima dată regenerarea de lăstari şi rădăcini din antere cultivate *in vitro.* Plantele regenerate au prezentat nivele variate de ploidie, observaţiile microscopice efectuate pe materialul meristematic radicular recoltat de la regeneranţi au evidenţiat prezenţa celulelor cu număr diferit de cromozomi, cuprins între 19 şi 38. Majoritatea lucrărilor publicate atestă faptul că plantele de viţă de vie regenerate din antere prezintă caractere specifice de plantă diploidă. Determinări efectuate la soiul Grenache au relevat faptul că 86,5% din celulele radiculare prezentau un număr triploid de cromozomi (2n = 3x = 57).

Numeroase lucrări care fac referiri la posibilitatea obţinerii de calus cu celule haploide şi celule cu diferite niveluri de ploidie şi apoi de plante cu diferite niveluri de ploidie, dovedesc posibila origine gametică, iniţial haploidă, a structurilor regenerate.

Instabilitatea extremă şi capacitatea redusă de supravieţuire a haploizilor la viţa de vie a condus la ipoteza că patrimoniul genetic al speciilor de *Vitis* este bogat în gene letale recesive (POPESCU şi TEODORESCU, 2004).

1.2.1.6.2. Regulatorii de creştere

Regulatorii de creştere, în special 2,4-D (acidul 2,4 diclorfenoxiacetic) şi 6-benzilaminopurina (BAP), sunt implicaţi în inducerea variabilităţii (EVANS, 1988; GRIESBACH şi colab., 1988; SHOEMAKER şi colab., 1991), dar relaţia lor directă cu acest fenomen este încă discutată. Deşi efectul specific al regulatorilor de creştere asupra frecvenţei variaţiei somaclonale rămâne încă nesigur, în culturi de ţesuturi rata

variației creşte, în general, în prezența unei concentrații mai mari de regulatori de creştere.

Creşterea amplitudinii variației manifestate la regeneranți a fost observată la căpşun, begonia, violete africane, la care s-a adăugat o concentrație mare de hormoni în mediul de cultură.

Se apreciază că hormonii nu au un efect mutagen direct, ci ei acționează indirect, stimulând creşterea neorganizată sau selecționând celule cu un anumit nivel de ploidie (BADEA şi colab., 2001). De asemenea, concentrația mare a regulatorilor de creştere poate determina modificări în frecvența mutațiilor de ploidie, comparativ cu mutațiile punctiforme. Procesul fizic de excizare poate stimula răspunsul la rănire, pe care regulatorii de creştere îl intensifică (McCLINTOCK, 1984).

Rezultatele experimentale întreprinse cu scopul regenerării de plante din țesuturi somatice aparținând unor genotipuri de *Vitis* au evidențiat faptul că aportul exogen de regulatori de creştere constituie o cerință esențială pentru inducerea formării de calus şi/sau de muguri şi lăstari adventivi. Dintre auxine, acidul 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D), în concentrații cuprinse între 0,5-2,0 mg/l s-a dovedit foarte eficient pentru inducerea formării de calus din variate tipuri de țesuturi somatice (TANG şi MULLINS, 1990). Rezultatele experimentelor realizate la diferite genotipuri de viță de vie au arătat, de asemenea, că şi acidul alfa-naftilacetic (ANA), în concentrații reduse, poate fi utilizat cu succes pentru inducerea formării de calus şi regenerarea de plante prin organogeneză. Rezultatele obținute de TORREGROSA şi BOUQUET (1996) arată că frecvența de regenerare de lăstari este puternic condiționată de valoarea raportului cu citochinina prezenta în mediul de cultură. Astfel, cel mai ridicat nivel de exprimare a capacității de organogeneză a fost înregistrat la o balanță hormonală citochinină/auxină de 100:1 (10µM BA/0,1 µM ANA).

1.2.1.6.3. Cultivarul

Cantitatea variației întâlnită *in vitro* nu este aceeaşi pentru toate cultivarele unei specii (KURTZ şi colab. 1983). Unele cultivare manifestă o variație în exces, dar majoritatea sunt relativ stabile. De exemplu, HWANG şi KO (1986), citați de

SKIRVIN (1994), au raportat o rată a variabilității de 3% la cultivarele de bananier, dar rata variației pentru cultivarul "Cavendish" al aceleaşi specii a fost de până la 20%.

1.2.1.6.4. Vârsta cultivarului

Deşi la clonele vechi, înmulțite asexuat timp îndelungat, este de aşteptat o mai mare variație preexistentă decât la noile clone, se pare că există o anumită corelație între vârsta clonei (cultivarului) şi cantitatea variației observată la somaclone.

SHEPARD şi colab. (1980) au fost printre primii care au raportat fenomene de variabilitate somaclonală. Ei au găsit mii de variante printre protoclonele (clone derivate din protoplaşti) de cartof ale cultivarului "Russet Burbank". Din moment ce acest cultivar era vechi, o parte a variației ar fi putut fi datorată mutațiilor naturale preexistente, himerelor precum şi condițiilor de cultură *in vitro*. Totuşi, este foarte dificil de explicat numărul mare al variațiilor observate la cultivarul de cartof "Maris Bard" (THOMAS şi colab., 1982, citat de SKIRVIN şi colab., 1994), care a fost lansat ca şi cultivar, doar cu câțiva ani mai devreme (1974). În studiul cultivarului "Maris Bard" un singur regenerant a prezentat numărul caracteristic de cromozomi, în timp ce ceilalți au manifestat o variație neobişnuită a numărului de cromozomi, între 49 şi 95 față de 48 ai tipului normal.

1.2.1.6.5. Nivelul de ploidie

Se consideră că frecvența variației somaclonale este mai mare la speciile poliploide şi la cele înmulțite vegetativ, dar variații somaclonale au fost înregistrate şi la specii care se reproduc sexuat fie poliploide, fie diploide (BADEA şi colab., 2001).

Din moment ce abilitatea regenerării *in vitro* este o caracteristică heritabilă la tomate, diferențele în răspunsul cultivarelor pot avea, de asemenea, o bază genetică.

Un număr mare de relatări asupra variabilității somaclonale se referă la izolarea, din culturi de calus ale unor linii de trestie de zahăr, a unor plante cu un număr mare de cromozomi (HEINZ şi colab., 1971, citat de SKIRVIN şi colab., 1994). HEINZ şi MEE (1971) au obținut linii de calus variate în ceea ce priveşte culoarea şi creşterea.

Fiecare din aceste linii au fost găsite mai târziu că aveau un număr diferit de cromozomi. Diferenţe similare de ploidie au fost observate şi între plantele regenerate (SKIRVIN şi colab., 1994).

BINGHAM şi MCCOY (1986), citaţi de SKIRVIN şi colab. (1994), analizând tipurile de variaţie care pot să apară la trifoi, consideră că acestea sunt în funcţie de tipul de explant şi nivelul de ploidie original. Când trifoiul diploid este regenerat, cel mai comun tip variaţie cromozomală o constituie dublare spontană. Când tetraploizii sunt regeneraţi din calus sau protoplaşti, aneuploidia şi duplicaţiile sunt frecvente, ca şi unele modificări în structura cromozomilor. S-a demonstrat că unele variaţii identificate la nivelul ambelor tipuri de ploidie au fost heritabile (SKIRVIN şi colab., 1994).

1.2.1.6.6. Sursa explantului

Când se urmăreşte obţinerea variabilităţii somaclonale pentru o nouă specie sau cultivar este bine să se utilizeze mai multe tipuri de explante şi să se compare descendenţii de la fiecare. Nu la toate tipurile de explante se presupune aceeaşi capacitate de manifestare a variaţiei. În general, variaţia este mai greu de observat la lăstarii preformaţi (proveniţi din muguri axilari, vârfuri de lăstari şi meristeme), decât în cazul explantelor care nu au meristeme preformate, cum ar fi frunzele, rădăcinile sau protoplaştii. Plantele regenerate din protoplaştii obţinuţi la cultivarul de cartof "Russett Burbank" (SHEPARD şi colab., 1980, citat de SKIRVIN şi colab., 1994) au produs mii de descendenţi diferiţi de soiul iniţial, dintre care două sau trei linii au fost selectate pentru o posibilă utilizare. De asemenea, protoclonele de kiwi (*Actinidia deliciosa*) au prezentate variaţii în ceea ce priveşte expresia sexului, creşterea, vigoarea şi morfologia frunzei (SKIRVIN şi colab., 1994).

Regeneranţii obţinuţi din explante organizate, cu meristeme preformate, sunt stabili din punct de vedere genetic. Explantele lipsite de meristeme preformate, care dediferenţiază, generează însă o mare variabilitate, pentru că sunt formate din tipuri celulare diferenţiate structural şi funcţional. La numeroase specii de plante, diferenţierea celulară este însoţită de modificări calitative şi cantitative ale ADN-ului genomic: endopoliploidie, amplificarea sau deleţia unor secvenţe etc. În consecinţă,

atunci când sunt folosite ca explante pentru obținerea calusului segmente de frunză sau rădăcină, celulele diferențiate dediferențiază, adică încep să se dividă. Condiția nucleară *in vivo* se va reflecta astfel *in vitro* prin formarea unei populații de celule cu modificări la nivelul genomului. Modificările se vor regăsi şi la regeneranți.

Natura explantului influențează atât frecvența cât şi spectrul variațiilor. La somaclone şi gametoclone de grâu, a fost înregistrat un singur tip de modificare a gluteinelor cu greutate moleculară mare, cu o frecvență mai mare la plantele cu origine în microspori. În schimb, frecvența variațiilor enzimogramelor beta-amilazei a fost de numai 13% la gametoclone şi de 59% la somaclone (BADEA şi colab., 2001).

La speciile de *Vitis*, culturi embriogene şi regenerări de plante s-au obținut din numeroase tipuri de explante, cum ar fi antere, fragmente foliare, ovule, embrioni zigotici etc. Sunt însă şi genotipuri de viță de vie la care s-a reuşit regenerarea prin embriogeneză somatică numai prin utilizarea unui anumit tip de explant (POPESCU şi TEODORESCU, 2004).

Embriogeneza somatică a fost observată la calusul inițiat din explante de cârcel la *Vitis vinifera* L. cultivarele Thompson, Somaka şi Tas-e-Gomesh, pe un mediu Emershad şi Ramming suplimentat cu 1 mM 6 benzilaminopurină. În a treia şi a patra subcultură pe acelaşi mediu s-a obținut un procent scăzut de lăstari. Lăstarii apăruți au dat naştere ulterior la plăntuțe întregi pe un mediu lichid de înrădăcinare care conținea 1 mM acid 3 indolil acetic.

Este dezbătută posibila utilizare a cârceilor ca noi explante pentru embriogeneza somatică la vița de vie. (SALUNKHE, RAO, 1999).

La vița de vie, cercetătorii chinezi ZOU şi LI (1981), citați de POPESCU şi TEODORESCU (2004), au fost singurii care au raportat regenerarea de plante haploide (n = 19) din cultura de antere a soiul Triumph. După doi ani de la plantarea în câmp, autorii au semnalat faptul că plantele au prezentat un aspect morfoanatomic normal, specific soiului de origine, iar numărul de cromozomi determinat a fost 2n = 38.

Într-un alt studiu s-a arătat că anterele de *Vitis latifolia* L. (vița sălbatică) cultivate pe un mediu Nitsch şi Nitsch suplimentat cu 20 mM 2,4-D şi 9 mM BAP au produs calus după 4-6 săptămâni. Subcultivarea calusului pe un mediu Nitsch şi Nitsch

cu un conţinut de 10 mM NAA a produs embrioni somatici în decursul a şase săptămâni. Pe un mediu de bază Nitsch şi Nitsch, lipsit de regulatori de creştere embrionii somatici au evoluat în plăntuţe după 6-8 săptămâni. Un gram de calus a produs mai mult de 400 de embrioni somatici, un procent de 13,7% din aceştia, dând naştere la plăntuţe care au fost ulterior transferate în sol. Plantele regenerate au avut grade diferite de ploidie faţă de 2n = 38 şi n = 19 (SALUNKHE, 1999).

Cultura *in vitro* de antere şi polen oferă posibilitatea manipulării gradului de ploidie la plantele regenerate prin androgeneză sau embriogeneză. La plantele obţinute prin androgeneză au fost observate numeroase variaţii morfologice, fiziologice, biochimice şi cromozomale.

O sursă importantă de variaţii somaclonale o constituie de asemenea şi inducerea *in vitro* a haploidiei. Variaţiile rezultate din procedurile de haploidizare, în majoritatea cazurilor, pot fi transmise prin reproducere sexuată, noile caractere putând fi selectate la nivelul haploizilor dublaţi. Testarea şi selecţia variantelor somaclonale se poate realiza chiar la nivelul macrosporilor sau celulelor haploide, punând în evidenţă gene utile, cum sunt cele care codifică toleranţa la stress sau rezistenţa la erbicide şi fitotoxine specifice şi care se pot exprima la acest nivel (POPESCU si TEODORESCU, 2004).

1.2.1.6.7. Genotipul

Genotipul influenţează atât capacitatea de regenerare *in vitro* cât şi amplitudinea variaţiei somaclonale. De exemplu, la somaclone de grâu provenite din două soiuri şi două linii dublu haploide au fost evidenţiate diferenţe genotipice clare. Frecvenţa aberaţiilor meiotice a fost de 27,77% la plantele provenite din cele două soiuri şi de 72,72% la regeneranţii derivaţi din liniile dihaploide. Astfel de date sugerează că plantele care au mai parcurs un ciclu de cultură *in vitro,* ciclu destinat obţinerii haploizilor, sunt mai puţin stabile decât soiurile, prezentând cu o frecvenţă mare (42,65%) restructurări cromozomale, ilustrate de anomaliile din meioză (BADEA şi colab., 2001).

Într-un studiu al variabilităţii somaclonale la plantele regenerate din culturile de

ţesuturi a două specii cultivate de *Xanthosoma sagittifolium* şi *Xanthosoma violaceum*, 18% din plantele regenerate la *Xanthosoma sagittifolium* au prezentat modificări morfologice stabile, în timp ce la *Xanthosoma violaceum* nu s-a constat nici o variabilitate semnificativă. S-a conchis că variabilitatea somaclonală, la *Xanthosoma,* se află sub un control genetic (GUPTA, 1985). Rezultate similare pot fi găsite şi în ceea ce priveşte variaţia cromozomială. Frecvenţa regeneranţilor tetraploizi, în cadrul a trei culturi provenite din protoplaşti de cartof, variază între 12-65% (KARP, rezultate nepublicate). În mod asemănător, NAJARAN şi WALTON (1987), citat de BEBELI şi colab., 1990, au studiat cromozomii la regeneranţii proveniţi din culturi de ţesuturi la patru genotipuri de *Medicago media*. Frecvenţa aneuploizilor diferă semnificativ şi a fost cea mai mare în cultivarul Heinrichs (64% din plante), intermediară la cultivarul Reaver (21%) şi scăzută la Br-1 şi L-1 (10 şi respectiv 9,4%). Diferenţe, privind frecvenţa şi natura instabilităţii cromozomiale, au fost, de asemenea, raportate la plantele regenerate din linii surori de secară (BEBELI şi colab., 1990).

La viţa de vie, rezultatele obţinute în experimentele efectuate cu genotipuri aparţinând diferitelor specii de *Vitis*, experimente care au vizat regenerarea de plante din cultura *in vitro* de antere, indică că genotipul joacă un rol determinant în exprimarea răspunsului embriogenic. RAJASEKARAN şi MULLINS (1979), citaţi de POPESCU şi TEODORESCU, 2004, arată că există diferenţe mari între specii, soiuri şi hibrizi ai genului *Vitis*, în ceea ce priveşte capacitatea de calusare şi de diferenţiere a embrionilor somatici din anterele cultivate *in vitro*. Speciile *Vitis rupestris* şi *Vitis longii* sunt creditate cu cea mai ridicată capacitate embriogenă, fiind urmate de *Vitis labrusca* şi *Vitis champinii*. Diferenţe mari au fost semnalate şi între genotipurile aparţinând aceleaşi specii. Astfel, cercetările au demonstrat că inducerea formării de calus din antere a fost posibilă numai la trei din 26 de genotipuri testate.

Potenţialul de regenerare din calusul diferenţiat în prima etapă este de asemenea puternic dependent de genotip. Astfel, BOUQUET şi colab. (1982), citaţi de POPESCU şi TEODORESCU, 2004 au arătat că au reuşit să regenereze plante numai la 12 din 23 de genotipuri testate.

De asemenea, se apreciază că la *Vitis vinifera*, specia cea mai importantă din genul *Vitis*, potenţialul de embriogeneză, respectiv cel de regenerare de plante din

antere este foarte scăzut şi limitat la un număr mic de genotipuri, incluzând soiurile Gamay, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Chardonnay, Mission, Valerien, Coarnă neagră selecţionată, Siegfried Rebe FS4 (POPESCU şi TEODORESCU, 2004).

1.2.1.6.8. Durata timpului de cultură *in vitro*

Lungimea intervalului dintre subculturile *in vitro* a fost considerat un factor important implicat în producerea variabilităţii somaclonale. Pentru a menţine stabilitatea clonală cele mai multe laboratoare comerciale cultivă *ex vitro,* în câmp sau seră exemplare din plantele obţinute *in vitro,* pentru a verifica menţinerea caracteristicilor cultivarelor. Multe laboratoare limitează numărul de subculturi ale unui explant, deoarece creşterea numărului de cicluri de propagare este asociată cu frecvenţa mare a apariţiei variantelor fenotipice.

Când menţinerea stabilităţii clonelor este obligatorie (de pildă în cazul păstrării germoplasmei), culturile pot fi stocate în containere închise în frigider sau în azot lichid (REED, 1990; REED şi LAGERSTEDT, 1987, citaţi de SKIRVIN şi colab., 1994). Un proiect pentru 100 de ani a fost înfiinţat în Oregon pentru studiul efectului de păstrare pe termen lung a meristemelor de căpşuni (*Fragaria x ananassa* Duch.). În general, pentru stabilitatea clonală, culturile *in vitro* se menţin o perioadă scurtă de timp. În contrast, timpul lung de cultură poate fi o excelentă sursă de variaţie. Calusurile şi suspensiile celulare menţinute *în vitro* timp îndelungat constituie şi ele o sursă de variabilitate.

La viţa de vie, cercetările întreprinse de PAMFIL (1996) la 10 clone de Cabernet Sauvignon de provenienţă diferită cultivate în câmp, în condiţii identice, timp de 3 ani şi *in vitro* de peste 2 ani, au dus la evidenţierea unui polimorfism evident la clona CS21 Australia, micropropagată *in vitro*. Evidenţierea polimorfismului sugerează existenţa unei variabilităţi somaclonale care se datorează, cel mai probabil, micropropagării prea îndelungate, respectiv 14 subculturi în decursul a peste doi ani (PAMFIL, 1996).

1.2.1.6.9. Rata de proliferare

Culturile cu o rată de proliferare excesivă, manifestă mai multă variaţie decât acelea care au o rată de proliferare moderată. De exemplu, SMITH şi DREW (1990), citaţi de SKIRVIN şi colab., 1994, au raportat că ananasul poate fi înmulţit prin metode convenţionale, respectiv butaşi din care se pot separa patru sau cinci plante pe an. *In vitro* rata de multiplicare poate fi între 30 şi 50 de plante pe lună. Datorită ratei de apariţie a variaţiei la culturile *in vitro*, metoda nu a fost acceptată. Când rata de proliferare în condiţii *in vitro* a scăzut la patru pe lună rata variaţiei a scăzut şi ea la 5%.

1.2.1.6.10. Presiunea de selecţie

Presiunea de selecţie *in vitro* este utilizată pentru alegerea unor linii celulare cu rezistenţă la boli, erbicide, la unii compuşi chimici. BINGHAM şi McCOY (1986), citaţi de SKIRVIN şi colab., 1994, au raportat selecţia unei linii celulare de trifoi rezistentă sau tolerantă la etionină, săruri şi la filtratul unor culturi de ciuperci. Totuşi, la plantele regenerate din aceste culturi cu rezistenţă la etionină, săruri şi filtrantul de ciuperci, numai caracterul de rezistenţă la boală a fost exprimat la nivelul întregii plante.

WIDHOLM (1988) a trecut în revistă utilizarea culturilor de ţesuturi în vederea selectării liniilor celulare valoroase pentru cercetare şi industrie. El afirmă că selecţia directă pentru caractere monogenice are mai mult succes decât cea pentru caractere poligenice (SKIRVIN şi colab., 1994).

Pentru ca selecţia să aibă valoare pe timp lung pentru ameliorarea plantelor, caracterul observat la nivel celular trebuie să se exprime la nivelul întregii plante. Din păcate, nu este sigur că toate genele care se exprimă la nivel celular se vor exprima, în aceeaşi manieră, la nivelul întregii plante. De exemplu, la tutun s-au raportat linii celulare care au produs cantităţi mai mari de nicotină, dar regeneranţii au produs nicotină la un nivel normal. Totuşi, producerea unui nivel mare de nicotină a fost restabilită în cultura de calus provenită de la plantele regenerate. Această diferenţă indică că gena pentru producerea unei cantităţi mari de nicotină a fost prezentă, dar

exprimarea ei nu are loc decât la nivel celular. Aceste date sugerează că obținerea de compuşi farmaceutici din cultura de celule poate fi mai puțin costisitoare decât menținerea plantelor întregi în cultură. HAMMERSCHLAG (1990) şi HAMMERSCHLAG şi colab. (1991), au izolat clone de piersic (*Prunus persica* L.) cu rezistență la *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni*. Unele din aceste clone au continuat să manifeste rezistență la boală timp de doi ani, în timp ce pentru alte plante acest caracter a fost efemer. Colectarea semințelor de la aceste plante constituie un nou început pentru studiile de heritabilitate a caracterelor la somaclonele respective.

Cercetătorii trebuie să-şi amintească faptul că, în cultura de țesuturi, explantul este supus în mod constant unei presiuni de selecție. WIDHALEM (1981) de exemplu, a sugerat că condițiile de cultură *in vitro* sunt atât de nenaturale pentru celulele plantelor, încât numai celulele care prezintă cea mai rapidă creştere pot supraviețui subcultivărilor repetate. O dovadă în acest sens o constituie observația că suspensiile de celule de curând înființate sunt aglomerate şi au o creştere lentă. În timp, rata creşterii suspensiilor de celule se accelerează şi mărimea agregatelor scade. Mai mult se consideră că aceste celule şi culturi de țesuturi nu cresc egal, la fel în toate laboratoarele, datorită selecției neintenționate realizată de mediile de cultură şi de condițiile specifice laboratorului (SKIRVIN şi colab., 1994).

1.2.1.6.11. Condițiile de cultură

Aberațiile genomice în celulele plantelor şi animalelor cultivate *in vitro* apar, cel mai adesea, când acestea sunt scoase de sub influența controlului exercitat de organismul întreg şi sunt plasate în condiții nenaturale. Când o plantă este excizată şi rănită în vederea transferului în cultura *in vitro*, sistemele de control care reglează întreaga plantă sunt întrerupte. De exemplu, în planta întreaga calusul este răspunsul la rănire şi rareori dobândeşte un nivel de organizare celulară suficient pentru a produce lăstari sau rădăcini. În culturile de țesuturi, calusul este frecvent o fază comună prin care trec părțile excizate din plantă, înainte de organizarea meristematică care poate produce rădăcini, lăstari sau ambele. Regulatorii de creştere sau alți stimuli *in vitro* mediază aceste evenimente, de aceea nu este surprinzătoare apariția de lăstari adventivi cu fenotipuri anormale.

1.2.1.6.12. Rata variaţiei somaclonale

Analizele vizuale ale regeneranţilor au fost insuficiente pentru aprecierea magnitudinii variabilităţii somaclonale. Cu ajutorul analizelor biochimice şi cromozomale, s-a demonstrat o frecvenţa a variaţiilor uneori de 100%, dar cel mai adesea aceasta a fost cuprinsă între 15-20% (EVANS, 1988). Astfel de constatări sunt în contrast cu rata mutaţiilor naturale care apar între 1 la 100.000, până la 1 la 1.000.000 pentru un anumit locus (SKIRVIN şi colab., 1994).

LARKIN (1984) a raportat o variabilitate între 3% şi 26% pentru fertilitate la grâu (*Triticum aestivum* L.); EVANS (1988), a raportat că frecvenţa unei singure gene mutante a fost de aproape o mutaţie la fiecare 20-25 de plante regenerate (SKIRVIN şi colab., 1994).

ORTON (1987) arată că liniile de ţelină (*Apium graveolens* L.) izolate *in vitro* au variat cu 100% din punct de vedere cromozomal faţă de părinţi. Deşi rata variabilităţii somaclonale pare mare, trebuie avut în vedere că apariţia acesteia este un fenomen întâmplător care poate apare în oricare locaţie din genom.

Aceste schimbări întâmplătoare sunt totalizate ca rată totală a variabilităţii, prezentată în cele mai multe lucrări ştiinţifice. Adevărata rată a variabilităţii somaclonale este dificil de stabilit, datorită faptului că sunt multe gene individuale de examinat. Multe somaclone sunt identice, sugerând originea variaţională comună.

DAVIES şi colab.(1986) au demonstrat că anumite tipuri de variaţii au apărut repetat în cadrul grupurilor de plantule de *Paspalum dilatatum* Poir, derivate din aceeaşi sursă de explant. Ei au postulat că anomaliile apărute cu o rată mare sunt datorate variaţiei produse mai devreme în cultura de calus din care au fost selecţionate neintenţionat sectoare de calus şi apoi subcultivate.

LEE şi colab. (1987) au făcut observaţii asemănătoare la porumb (*Zea mays* L.). Ei au găsit că aceleaşi culturi, adesea produc mai multe plante care au segregat pentru variante fenotipic identice. Această variaţie a apărut, probabil, mai devreme în iniţierea culturii, ducând la o supraestimare a frecvenţei variabilităţii somaclonale. Bazat pe literatură şi experienţa profesională, autorii de mai sus consideră că cel mai real nivel al variabilităţii somaclonale aşteptat *in vitro* este, probabil, între 1% şi 3%. Aceasta nu

înseamnă că, în experiențe, ar trebui aşteptată o rată între 1 şi 3% a mutației la un anumit locus a plantelor regenerate, ci că 1% sau 3% din regeneranți variază față de părinți din punct de vedere fizic sau biochimic fără a şti, cu siguranță, dacă aceste variații sunt ereditare sau nu.

În concluzie, variabilitatea somaclonală este o sursă de variație valoroasă pentru ameliorarea plantelor. Până la ora actuală, variabilitatea somaclonală este considerată un proces întâmplător care poate deveni util cercetătorilor, cu condiția ca aceştia să-l poată controla şi direcționa în vederea atingerii țelurilor propuse. Dezvoltarea protocoalelor pentru regenerarea speciilor recalcitrante va facilita accesul la variația naturală şi indusă prin culturile *in vitro*.

1.2.1.7. Tipuri de modificări genetice asociate variabilității somaclonale

În celula vegetală cultivată *in vitro* apar frecvent o serie de modificări la nivelul materialului genetic: poliploidii, aneuploidii, restructurări cromozomale, schimbări ale structurii şi expresiei genelor etc. Unele modificări au fost observate şi la plantele obținute prin mutageneza clasică.

Poliploizi au fost obținuți la orez, orz, porumb, tutun, prin cultura de celule şi țesuturi. La *Nicotiana tabacum*, din calusul obținut din măduvă de tulpină de la plante haploide şi diploide a regenerat plante dihaploide şi tetraploide.

Poliploidia poate preexista în explante sub forma celulelor cu nuclei endoreduplicați, dar poate să apară şi *in vitro*, prin două mecanisme:

- perturbarea funcției fusului mitotic
- endoreduplicarea cromozomilor.

Aneuploizii sunt mai frecvenți în populațiile de plante regenerate la speciile poliploide decât la speciile diploide. Frecvența apariției plantelor aneuploide este infleunțată, de asemenea, de tipul de sistem de cultură *in vitro* şi de durata culturii. La lucernă, printre regeneranții din suspensii celulare s-au numărat hiper – şi hipoaneuploizii (BADEA şi colab, 2001).

Prin cultura *in vitro* de embrioni somatici la vița de vie s-au regenerat plante diploide şi tetraploide. Tetraploizii, obținuți şi cultivați în câmp au prezentat un fenotip diferit de cel normal: internodii şi pețioluri mai scurte şi mai groase, modificări

morfologice ale frunzelor şi creştere redusă. Testul "t" a relevat diferenţe semnificative în ceea ce priveşte lungimea internodiilor la somaclonele diploide şi cele tetraploide (KUKSOVA, 1997).

Pe un mediu adecvat de cultură *in vitro,* din antere de *Vitis latifolia* L. (viţa sălbatică) s-a obţinut calus, care prin subcultivare a produs embrioni somatici. Embrionii somatici obţinuţi au evoluat în plăntuţe care apoi au fost transferate în sol. S-a constatat că plantele regenerate au avut grade diferite de ploidie faţă de 2n = 38 şi n = 19 (SALUNKHE, 1999).

1.2.1.8. Mecanismele variabilităţii somaclonale

Până în prezent au fost avansate trei ipoteze privind mecanismele variabilităţii somaclonle. KARP (1991, 1994) consideră că mecanismul care determină apariţia, cu frecvenţă mare, a variabilităţii somaclonale ereditare constă în schimbarea nivelurilor de metilare ale ADN-ului, ceea ce induce modificări în secvenţa bazelor şi în structura cromatinei. Intensificarea metilării determină heterocromatinizarea cromatinei, având ca efect o replicare întârziată şi apariţia punţilor în anafază, ruperea cromozomilor şi apariţia rearanjamentelor (duplicaţii, inversii, translocaţii).

BARBARA MCCLINTOCK (1984) sugerează că apariţia variabilităţii genetice *in vitro* ar fi o reacţie la stres. Ea consideră că izolarea, cultivarea şi obţinerea calusului sunt experienţe traumatizante pentru celule.

1.2.1.9. Metode de evidenţiere a variabilităţii somaclonale

Analizând plantele regenerate *in vitro* din punct de vedere morfologic, fiziologic, biochimic, citogenetic şi molecular s-a putut constata existenţa unor variaţii evidente. Variabilitatea generată de cultura *in vitro* poate constitui o sursă de caractere valoroase pentru ameliorare, cu condiţia să fie stabilă şi să se transmită la descendenţi.

Stabilitatea regenerantelor este de dorit în micropropagare şi inginerie genetică, în timp ce variabilitatea lor este utilă în ameliorare. În ambele cazuri populaţia plantelor regenerate se evaluează la nivel fenotipic, biochimic, citogenetic şi molecular.

Studiul numărului şi structurii cromozomilor permite corelarea modificărilor fenotipice cu schimbările induse *in vitro* la nivelul genomului. Astfel, la lucernă, prin analiza cariotipului unor protoclone ce prezenta modificări fenotipice, s-a evidenţiat existenţa unor protoclone cu număr aneuploid de cromozomi şi două translocaţii.

Metodele moleculare pot evidenţia variaţia metilării ADN, modificări ale succesiunii bazelor sau a numărului de copii ale secvenţelor repetate la plantele regenerate din celule care au parcurs unul sau mai multe cicluri de cultură *in vitro*. Utilizarea sondelor specifice a evidenţiat, la cartof, polimorfism la nivel ADN corespunzător genelor care codifică ARN-ul ribozomal.

Utilizarea markerilor moleculari a evidenţiat somaclone la grâu, orez, tutun, usturoi, care prezentau polimorfism la nivelul ADN-ului nuclear şi citoplasmatic.

În cazul în care variaţiile fenotipice ale somaclonelor nu pot fi asociate unor modificări ale structurii şi sau numărului de cromozomi prin analize citogenetice se studiază descendenţa obţinută prin autofecundare. Se pot întâlni următoarele situaţii:

- identitatea descendenţei cu planta de origine;
- uniformitatea descendenţei în privinţa unui caracter fenotipic nou – mutaţie homozigotă, de o expresie genică nouă sau ca rezultat al amplificării ori deleţiei unor regiuni cromozomale implicate în determinarea caracterului respectiv;
- segregarea descendenţei conform rapoartelor mendeliene - mutaţie la nivelul unui locus implicat în determinarea unui caracter alternativ.

Mutaţiile genice pot fi induse şi prin transpoziţie sau restructurări cromozomale minore, care nu pot fi detectate prin analiza cariotipului. Pentru a determina compartimentul celular implicat în apariţia variabilităţii şi modul de transmitere a noului caracter, se poate recurge şi la încrucişări dialele sau reciproce (BADEA şi colab., 2001).

La viţa de vie, variabilitatea somaclonală a fost identificată, până în prezent, în majoritatea cazurilor, pe baza manifestărilor morfologice. Atunci când ele nu s-au etalat evident, au fost utilizate şi analizele biochimice comparative ce includ de obicei electroforeza unor proteine. Analiza microscopică a cromozomilor, deşi foarte laborioasă a fost des utilizată fără însă ca ea să poată fi aplicată la nivelul întregii

plante.

Progresele făcute în ultimii ani în domeniul biologiei moleculare privind utilizarea markerilor genetici şi în special după perfecţionarea reacţiei PCR (Polimerase Chain Reaction) de amplificare a unor fragmente de ADN (SAIKI şi colab., 1988, citaţi de Pamfil, 1999) au făcut ca identificarea variabilităţii somaclonale pe baza polimorfismului ADN să devină o realitate.

1.2.1.10. Mutageneza in vitro

Includerea, în mediul de cultură, a agenţilor mutageni poate induce, în celulele plantelor superioare cultivate *in vitro* un spectru larg de mutaţii biochimice şi metabolice. Astfel se pot obţine mutante rezistente la diferite substanţe chimice sau antimetaboliţi ca şi la diverse condiţii nefavorabile de mediu. De pildă, au fost selecţionate mutante rezistente la diferite antibiotice, erbicide, pesticide, toxine produse de ciuperci, derivaţi ai bazelor azotate purinice şi pirimidinice, exces de săruri etc.

Primele mutante *in vitro* au fost induse şi detectate de CARLSON (1967, 1970), BINDING (1970).

MALICA şi colab. (1973) au obţinut la *Nicotiana tabacum*, celule din care au regenerat plante rezistente la streptomicină, caracteristică transmisă pe linie maternă, fapt care indică o mutaţie citoplasmatică.

Un aspect practic important este obţinerea de linii mutante ce manifestă o producţie mărită de aminoacizi. Astfel, HIBBERG (1978) a obţinut linii celulare de porumb ce manifestă o capacitate ridicată de sintetizare a metioninei, lizinei sau izoleucinei.

CHALEFF şi CARLSON (1975), folosind amino-etil-cisteina, au obţinut linii celulare mutante de *Oryza sativa*, care au capacitatea de a acumula o cantitate dublă de lizină.

Rezistenţa la boli a fost prima caracteristică de interes agrochimic cercetată la nivel celular *in vitro* şi apoi la nivelul plantei întregi. Pentru inducerea rezistenţei la boli, mediul de cultură este suplimentat cu o concentraţie letală din toxina bolii. Metoda a fost aplicată pentru selecţia unor mutante de tutun rezistente la atacul

bacteriei *Pseudomonas tabaci*.

Cu toate avantajele pe care le prezintă, mutageneza *in vitro* are totuşi anumite limite. O serie de caracteristici agronomice nu pot fi manipulate în interacţiunea genotip – mediu aşa cum ar fi manipulate la nivel celular (TĂMAŞ, 1998).

În general, selecţia de mutante s-a realizat în culturi de celule obţinute de la plante diploide. Dacă mutantele observate sunt dominante ele se manifestă ca atare. Utilizarea de celule haploide se pare că ar fi mai eficientă deoarece în astfel de celule frecvenţa mutaţiilor observate este mult mai mare (se manifestă fenotipic şi mutaţiile recesive). Deocamdată nu există culturi de celule hapolide perfect stabile, care să poată fi folosite în lucrări de inducere a mutaţiilor.

Obţinerea unor mutante celulare şi, pe această bază, a unor plante cu rezistenţă la erbicide, la toxinele unor agenţi patogeni, la salinitatea solului, la temperaturi scăzute, precum şi a unor mutante cu producţii mărite ale unor aminoacizi, prezintă importanţă în ameliorarea plantelor. De asemenea, realizarea unor linii celulare mutante are importanţă aplicativă, ele putând fi folosite în culturile industriale de celule în suspensie, ca o alternativă la cultura plantelor. Pe această cale, va fi posibilă producţia industrială a unor substanţe medicinale, primele rezultate obţinute în această direcţie fiind încurajatoare. (CACHIŢĂ, 1984).

În vederea inducerii de mutaţii *in vitro* la viţa de vie s-au utilizat radiaţiile gamma – 5-100 Gy. În urma iradierii, s-a constatat o creştere a frecvenţei de apariţie a plantelor tetraploide din calus primar (7%) şi din cel embriogenic (7,6%), depistându-se totodată şi plante aneuploide (KUKSOVA, 1997). În acest studiu tratamentul cu colchicină nu a avut ca efect obţinerea de plante tetraploide. Variabilitatea plantelor regenerate a fost confirmată după testarea acestora în câmp (KUKSOVA, 1997).

Analizele citologice la plantele regenerate s-au efectuat din vârfuri de rădăcină. Rădăcinile tinere (de 10-14 zile au fost supuse unui pretratament cu soluţie de colchicină (0,03%) timp de 2 ore, apoi au fost fixate cu fixativ Carnoy (trei părţi etanol absolut: o parte acid acetic glacial) timp de 4-5 ore la 4^0C şi fixate cu orceină acetică 1%, timp de 5-6 zile la 4^0 C. Vârfurile de rădăcină colorate au fost zdrobite în acid acetic 45% şi apoi s-a realizat numărarea cromozomilor. La plantele tetraploide numărul de cromozomi a fost analizat şi la celulele meristemelor apicale. La fiecare

plantă s-au numărat cromozomii din 4-18 preparate metafazice (în medie 10 celule).

În timp ce calusurile iradiate cu doza de 500 Gy nu au produs embrioni somatici, iradierea cu 10 Gy se pare că a grăbit procesul de embriogeneză somatică. Embrionii somatici au apărut în timp de două săptămâni de la pasarea calusului de pe mediul DB8 pe mediul NB7, față de 3-4 luni care sunt necesare în mod obişnuit. Acest efect a fost pentru prima oară descris de NOVAK şi colab. (1985) la porumb, specie la care s-a observat că dozele mici de iradiere cu raze gamma stimulează embriogeneza somatică şi capacitatea de regenerare în culturile de calus.

Efectul iradierii în embriogeneza somatică la viță trebuie investigat din cauză că multe cultivare sunt recalcitrante la regenerare, iar asemenea noi abordări ale problemei pot fi utile (HÉBERT-SOULÉ şi colab., 1995). În urma iradierii embrionilor somatici s-au regenerat plante diploide şi tetraploide. Calusurile embriogene cu embrioni somatici în diferite stadii de dezvoltare au fost iradiate cu diferite doze. Doza de 500 Gy a fost letală pentru calusurile embriogene. Iradierea cu alte doze a dus la obținerea unor embrioni somatici secundari şi de plăntuțe. Între plantele regenerate în urma experimentelor numărul de tetraploizi (7,6%) a fost acelaşi cu tetraploizii obținuți în urma iradierii calusului primar (7%). S-a conchis că doza de 5 Gy a fost cea mai eficientă pentru producerea de plante tetraploide.

Rezultate surprinzătoare s-au obținut la calusurile iradiate cu 40 Gy; această doză a dus la apariția unui procent mare de plante aneuploide (67,4%). În general, iradierea cu raze gamma, atât a calusurilor primare cât şi a celor embriogene (cu embrioni somatici) s-a dovedit a fi o metodă eficientă pentru sporirea numărului de plante tetraploide, iar diferențele între plantele tetraploide iradiate şi cele neiradiate au fost statistic semnificative. Rezultatele sunt în concordanță cu alte date descrise în care s-a dovedit că radiațiile gamma cauzează endopoliploidizarea în culturile de țesuturi şi celule la mai multe specii (HOWLAND şi HART, 1977; CONSTANTIN, 1981).

Rezultatele sugerează că inducerea embriogenezei somatice, combinată cu iradierea cu raze gamma, duce la apariția variabilității somaclonale la vița de vie şi în mod deosebit la apariția tetraploizilor.

Dacă această metodă este acceptată de amelioratori, ea va constitui o alternativă a procesului clasic de producere a tetraploizilor de viță de vie (KUKSOVA, 1997).

1.2.1.11. Transformarea genetică

Transformarea genetică constituie procesul prin care sunt transferate plantelor cultivate gene care conferă caractere utile. Genele transferate poartă numele de transgene, iar plantele transformate se numesc transgenice.

Pentru obținerea de plante transgenice, trebuie identificată, izolată şi amplificată gena care determină caracterul util. Gena exogenă, numită şi de interes, trebuie să fie transferată în planta supusă transformării genetice. Transformarea genetică prezintă importanță prin faptul că extinde sursele de biodiversitate, şi uneori, accelerează la unele specii procesul de ameliorare.

La plante, transferul genelor de interes se poate realiza la nivelul protoplaştilor, celulelor sau țesuturilor, fie indirect prin intermediul vectorilor biologici, fie direct prin metode fizice şi chimice. Vectorii biologici curent folosiți sunt bacteriile (genul *Agrobacterium*) şi virusurile.

Metodele fizice şi chimice includ:

- incubarea protoplaştilor cu polietilen glicol;
- electroporarea protoplaştilor, celulelor şi țeusturilor;
- microinjecția ADN exogen în protoplaşti, polen, embrioni;
- electroforeza embrionilor;
- bombardarea cu particule purtătoare de ADN exogen;
- agitarea țesuturilor în amestec cu fibre de carbid silicon şi ADN exogen (BADEA şi colab., 2001).

La vița de vie, cu toate că s-au înregistrat progrese privind aplicarea metodelor de inginerie genetică prin transfer de gene există unele cultivare recalcitrante la transformarea genetică (MULLINS şi colab., 1990).

Unele cercetări arată faptul că la *Vitis vinifera* transformarea genetică mediată de unele specii din genul *Agrobacterium* cum ar fi *Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium rhizogenes* sau *Agrobacterium vitis* se realizează cu dificultate. Dintre factorii implicați în transformarea genetică se pot aminti: suşa bacteriană, mediul de cultură utilizat pentru menținerea calusului embriogen şi genotipul cultivarului de viță de vie (TORREGROSA şi colab., 2002) .

La vița de vie, un rol important în reuşita transformării genetice îl are identificarea unor protocoale privind selecția potențialelor plante transformate genetic prin intermediul bacteriilor din genul *Agrobacterium* (PEROS şi colab., 1998, BORNHOFF şi colab., 2000).

Plantele transgenice au fost regenerate *in vitro* prin organogeneză şi embriogeneză. Ca şi sură de explante s-au utilizat muguri apicali, limb şi pețiol de frunză şi embrioni zigotici. Regenerarea din embrioni somatici a fost utilizată pentru transformarea genetică a unor cultivare importante atât pentru producția de vin cât şi pentru struguri de masă. Plantele transgenice de viță de vie pot fi obținute prin transformarea calusului embriogen provenit din diferite țesuturi incluzând embrioni zigotitici, frunze, ovare şi filamente staminale (MEZZETTI şi colab., 2002).

Studii mai recente arată faptul că la unele specii de viță de vie s-au înregistrat progrese privind transformarea genetică a culturilor *in vitro* de embrioni somatici folosind co-cultivarea cu *Agrobacterium* sp. Astfel, plante transgenice au fost obținute la *Vitis rupestris*, soiul St. George, la *Vitis rotundifolia*, soiurile Alachua şi Carlos, la *Vitis vinifera*, soiurile Cabernet Franc, Chardonnay, Merlot, Pinot Noir, Sauvignon Blanc etc., precum şi la unii hibrizi (DHEKNEY şi colab., 2007).

1.3. EVIDENȚIEREA VARIABILITĂȚII GENETICE CU AJUTORUL MARKERILOR MOLECULARI

1.3.1. Markerii RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Polimorfisme de ADN amplificate aleator

Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction), clonarea ADN-ului şi secvențierea acestuia sunt tehnici folosite în mod curent în laboratoarele de biologie moleculară. Această metodă, descoperită în anul 1988 de către KARY MULLIS şi colaboratorii lui (SAIKI şi colab, 1985), constituie subiectul a peste 60 de cărți şi zeci de mii de articole din domeniul biologiei moleculare. În anul 1993, KARY MULLIS primeşte pentru descoperirea sa premiul Nobel pentru Chimie.

Metoda se bazează pe amplificarea enzimatică a ADN-ului *in vitro*. Pornind de la o cantitate foarte mică din matrița de ADN (la nivel de nanograme), se obțin

milioane de copii ale unuia sau mai multor fragmente țintă de ADN, care pot fi apoi supuse electroforezei şi vizualizate prin colorare sau prin autoradiografie. PCR-ul se caracterizează printr-o viteză mare, selectivitate şi sensibilitate. Aplicațiile lui în diferite variante şi scopuri au deschis o multitudine de noi posibilități în biologia moleculară (METZKER, 2001).

Tehnica PCR permite amplificarea selectivă a unor secvențe specifice de ADN într-un număr mare de copii, procedeul eliminând clonarea moleculară. Pentru amplificarea unui fragment "țintă" de ADN se concep două secvențe monocatenare oligonucleotidice de ADN (15-30 nt) denumite ***primeri*** sau ***amorse***. Secvențele primerilor sunt concepute în aşa fel încât într-o reacție de hibridizare moleculară ei să se ataşeze specific, pe bază de complementaritate, de secvențele situate de o parte şi de alta a secvenței "țintă" ce urmează a fi amplificată.

Amplificarea este eficientă atunci când situsurile de fixare ale celor doi primeri nu sunt mai depărtate de 4 kb (cu toate că amplificarea produşilor se poate face până la 10 kb). În prezența unei ADN polimeraze termostabile şi a celor patru dezoxiribonucleozid trifosfați (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), primerii inițiază sinteza a două noi catene de ADN, complementare catenelor din fragmentul de ADN- țintă (NEWTON, 1995).

În anul 1990 în mai multe laboratoare s-a introdus o strategie nouă pentru amplificarea PCR a unor secvențe de ADN genomic. Ea utilizează unul sau doi primeri cu o secvență arbitrară, bogați în G şi C pentru a obține produşi de amplificare PCR din ADN genomic. Aceste tehnici nu necesită informații despre secvența de ADN şi au fost denumite:

- ♦ analiza polimorfismelor ADN amplificate aleator (RAPD) (WILLIAMS şi colab., 1990);
- ♦ amprenta obținută prin amplificarea ADN (DAF) (CAETANO-ANNOLÉS şi colab., 1991);
- ♦ PCR cu primeri arbitrari (AP-PCR) (WELSH şi McCLELLAND, 1990).

Natura polimorfă a secvențelor de ADN amplificate este, la rândul ei, redată de o nomenclatură polimorfă. S-a propus un termen unic, MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling), care să descrie caracteristicile comune tehnicilor menționate

(tabelul 2).

Tabelul 2

Tehnicile MAAP (profilul ampliconilor aleatori multiplii)
(după DORDEA şi colab., 2000)

MAAP Techniques (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling)
(DORDEA et al., 2000)

Caracteristici *Characteristics*	DAF	AP-PCR	RAPD
Rezoluția fragmentelor	mare	intermediara	mică
Separarea fragmentelor	poliacrilamida	poliacrilamida	agaroza
Vizualizarea fragmentelor	colorare cu azotat de argint	radioactivitate	bromura de etidiu
Lungimea primerului	5-15 nt	20-34 nt	9-10 nt
Concentrația primerului	3-30 mM	3 mM	0,3 mM

Toate cele trei tehnici au în comun faptul că fragmentele de ADN necunoscute sunt amplificate cu primeri având o secvență de nucleotide aleatoare. Fragmentele de ADN amplificate, numite în PCR ampliconi, rezultă prin fixarea primerilor la situsuri parțial sau total complementare fiecărei catene de ADN. Cu toate că nu se cunoaşte nimic despre identitatea şi contextul secvenței din care provine un anumit produs de amplificare, prezența sau absența lui în diferite organisme constituie o informație importantă pentru evaluarea diversității genetice şi a relațiilor de înrudire. În unele cazuri rezultă modele caracteristice unui anumit genotip, care sunt o adevărată amprentă genetică, reprezentată asemănător codului de bare.

Analiza RAPD a fost prima oară descrisă de către WILLIAMS şi colaboratorii lui în anul 1990. Tehnic este cea mai simplă variantă a metodei PCR cu primeri arbitrari. În general se folosesc primeri cu 10 nucleotide şi cu un conținut în GC de cel puțin 50%. Produşii de amplificare sunt separați într-un gel de agaroză şi apoi sunt vizualizați prin colorare cu bromură de etidiu. Primerii cu un conținut scăzut de GC nu determină apariția produşilor de amplificare.

Datorită faptului că legătura G-C constă în trei punți de hidrogen şi cea de A-T din numai două, un hibrid primer/ADN cu mai puțin de 50% G-C nu va suporta temperatura la care are loc polimerizarea (72^0C). În consecință, hibridul primer/ADN se va topi înainte ca polimeraza să înceapă procesul de polimerizare. Din moment ce

ordinea nucleotidelor din cadrul primerului decamer este arbitrară, nu sunt necesare cunoştinţe prealabile despre secvenţa de ADN care urmează să fie amplificată, primerii putând fi utilizaţi în mod universal atât la eucariote cât şi la procariote.

Optimizarea protocolului RAPD poate fi o problemă extrem de dificilă, modificarea componentelor de reacţie sau a programului utilizat la amplificare putând avea consecinţe imprevizibile. Cel mai mare impact asupra rezultatelor îl au atât tipul de polimerază şi thermocycler-ul utilizat cât şi primerul şi temperatura de fixare a acestuia.

Concentraţia primerilor în amestecul de reacţie este în general optimă între 0,1-2 μM. Există o largă varietate de *polimeraze termostabile* care pot fi utilizate pentru amplificare, cele mai folosite fiind Taq polimeraza (Promega) şi AmpliTaq (Perkin Elmer). În 1988 SAIKI şi colab., utilizează pentru prima dată o ADN polimerază termostabilă (*ADN polimeraza Taq*), extrasă din bacteria termofilă *Thermus aquaticus*, fapt ce a permis automatizarea PCR, marcând începutul unei noi ere în genetica moleculară. Taq-Polimeraza este o ADN-polimerază cu greutatea moleculară de 94.000 dal, termostabilă, acţionând eficient la 75-80^{0}C. Această polimerază necesită pentru activitate prezenţa unei secvenţe de nucleotide ca primer (MOLDOVEANU şi colab., 2001).

Amprenta ADN diferă frecvent în funcţie de polimeraza folosită. Din această cauză alegerea iniţială este foarte importantă, schimbarea enzimei determinând, cel mai probabil, imposibilitatea comparării rezultatelor.

Utilizarea aceluiaşi program de amplificare la thermocycler-uri diferite poate duce la obţinerea unor amprente ADN diferite. Fenomenul se datorează, probabil, temperaturii diferite care se realizează în tuburile de reacţie :

Programul tipic PCR pentru RAPD este (www.cgr.wageningen-ur.sl, 2002) :

- 1 minut la 95^0 C – denaturarea urmată de 45 de cicluri;
- 2 minute la 35^{0}C - fixarea primerilor;
- 2 minute la 72^{0}C – elongaţia (extensia).

Temperatura de denaturare, desface legăturile de hidrogen şi separă cele două catene de ADN, acestea având apoi rol de matriţe.

Temperatura scăzută (35^{0}C) permite amorselor să se ataşeze la secvenţele lor

omoloage de pe matriță, iar în etapa de elongație sau extensie se asigură funcționarea Taq polimerazei, respectiv sinteza ADN-ului.

Profilul de temperatură propus de WILLIAMS şi colab. (1990) este următorul: 1 minut la 94^0C, 1 minut la 36^0C şi 2 minute la 72^0C. Timpul de tranziție între temperaturi nu trebuie să fie foarte scurt mai ales la trecerea de la etapa fixării la cea a extensiei. Cel mai frecvent omologia între primer şi secvența țintă este de 80-90%. Dacă temperatura creşte prea brusc atunci este posibil să aibă loc din nou denaturarea hibridului primer/ADN matriță înainte ca polimeraza să poată extinde capetele 3' ale primerilor pe o lungime suficient de mare ca să suporte temperatura de 72^0C. În mod obişnuit pentru amplificare se realizează 45 de cicluri.

Optimizarea concentrației de ADN matriță este, de asemenea, un factor important. Modificări ale amprentei ADN se constată, în special, atunci când se folosesc concentrații foarte mici de ADN matriță. Concentrația ADN matriță este, în general, cuprinsă între 5-500 ng/50 µl volum de reacție, optimul fiind între 10-50 ng/50 µl volum de reacție. Studiile au arătat că modificarea amprentelor are loc atunci când concentrația de ADN matriță scade sau creşte de 200 de ori.

Concentrația de Mg din amestecul de reacție influențează, de asemenea, calitatea amprentelor rezultate. În general se recomandă testarea unor concentrații între 2 –10 mM.

Metoda RAPD a fost foarte mult criticată în privința reproductibilității ei. Ca şi în cazul altor metode bazate pe tehnica PCR, RAPD necesită menținerea constantă a condițiilor de reacție. Uneori, pentru mărirea specificității şi eficienței reacției în amestecul de reacție, se poate adăuga DMSO, Tween, BSA sau gelatină.

Polimorfismele depistate prin analiza RAPD pot rezulta teoretic din mai multe cauze:

- *inserția* unui element mare de ADN între cele două situsuri de fixare ale primerului poate face ca fragmentul original să fie prea mare pentru a mai putea fi amplificat, determinând astfel pierderea lui;
- *deleția* unui fragment de ADN purtător de unul sau mai multe situsuri de fixare ale primerilor determină absența produsului de amplificare;
- *substituția* unei nucleotide poate afecta fixarea unuia sau ambilor primeri la un

anumit situs datorită schimbărilor în omologie, ceea ce poate duce la prezența/absența polimorfismelor sau la o schimbare a mărimii fragmentului;

♦ *inserția sau deleția* unui mic fragment de ADN poate duce la schimbarea mărimii fragmentului amplificat.

Cu toate acestea în practică se observă rar schimbări ale mărimii fragmentelor. În schimb se constată, de obicei, prezența (alela A) sau absența (alela a) unui anumit fragment RAPD. Această distribuție a alelelor este tipică pentru un marker dominant. Fragmentul apare atât în cazul homozigoților dominanți (AA) cât şi în cazul heterozigoților (Aa), dar lipseşte în cazul homozigoților recesivi (aa). În cazul markerilor codominanți, heterozigoții Aa pot fi deosebiți de homozigoții AA şi aa. În urma cercetărilor s-a descoperit că cel puțin 95% din fragmentele RAPD se comportă ca markeri dominanți, în timp ce procentul rămas de 5% se comportă codominant, ca două alele de mărimi diferite

Nivelul polimorfismelor depistate prin analiza RAPD este în general similar cu acela obținut prin analiza RFLP (polimorfisme de lungime ale fragmentelor de restricție).

Avantajele analizei RAPD constau în:

♦ relevarea unui număr relativ mare de polimorfisme;

♦ posibilitatea automatizării analizei;

♦ costuri scăzute;

♦ utilizarea metodelor de vizualizare prin fluorescență în locul celor bazate pe radioactivitate;

♦ analizarea unui număr mare de probe într-o singură zi;

♦ nu implică un grad foarte ridicat de pregătire al personalului din laborator.

Dezavantaje:

♦ Comportamentul dominant al markerilor RAPD. De exemplu, în genetica populațiilor frecvența alelelor nu poate fi exprimată din moment ce homozigoții (AA) nu pot fi deosebiți de heterozigoți (Aa). Acelaşi lucru este valabil pentru studiile de cartare genică în care se analizează generațiile de segregare F_1 sau F_2. Din moment ce indivizii AA nu pot fi deosebiți de cei Aa o informația valoroasă se pierde.

♦ Sensibilitatea mărită a tehnicii. În general s-a ajuns la un consens în ceea ce priveşte reproductibilitatea analizei RAPD, acceptându-se că aceasta este mare în cadrul aceluiaşi laborator. Rezultatele devin neconvingătoare atunci când datele trebuie transferate de la un laborator la altul. Din această cauză trebuie acordată o deosebită atenţie standardizării analizei între colaboratori aflaţi în laboratoare diferite.

STAUB şi colab. (1996) arată că sursa unor erori în analizele RAPD pot fi datorate vârstei ţesutului vegetal testat, infecţiei cu microorganisme şi contaminărilor intrapopulaţionale, precum şi modificărilor condiţiilor de reacţie.

Viţa de vie a fost deseori investigată cu ajutorul metodologiei RAPD, majoritatea analizelor fiind efectuate în scopul identificării şi caracterizării unor varietăţi de *Vitis vinifera*. Recent au început să fie utilizate şi alte metode bazate pe markerii moleculari pentru identificarea unor soiuri de viţă de vie şi pentru analiza unor specii de *Vitis* (LOUREIRO şi colab., 1998, citat de PAMFIL, 1999).

Utilizarea reacţiei PCR şi a unei amorse (primer) cu secvenţe arbitrare de nucleotide s-a constatat că poate evidenţia, relativ uşor, polimorfismul din structura amplificată a ADN-ului. Noua metodă (WILLIAMS şi colab., 1990) denumită RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) a găsit rapid largi aplicaţii în: studiul genomului, gene tagging, chromosome tagging, studiul populaţiilor, cel filogentic şi identificarea varietală (CAETANO-ANOLLÉS şi colab., 1991).

MULCAHY şi colab. (1995), au utilizat tehica RAPD pentru identificarea unor varietăţi de viţă de vie din Italia. Ei au analizat 58 de accesiuni, provenite de la 15 varietăţi de viţă de vie. Tehnica RAPD a permis ca varietatea cunoscută cu numele de Montepulciano să fie reclasificată şi denumită Sangiovese, completând caracterizarea ampelografică.

Tehnica RAPD a fost utilizată şi de VIDAL şi colab. (1999), pentru determinarea relaţiilor genetice între varietăţi de viţă de vie provenite din regiuni diferite ale Franţei şi Spaniei. În acest studiu, se arată că varietăţile catalogate ca aparţinând la *Proles pontica* (“Clairatte”, “Vermentino”) au fost încadrate lângă varietăţile ce aparţin la *Proles occidentalis* (respectiv “Albillo” şi ”Bourbulenc”). Această clasificare a fost considerată de către GALET (1956) (citat de VIDAL şi colab., 1999), ca fiind nedemonstrată geografic şi morfologic din cauza datelor

ştiinţifice foarte puţine cu privire la originea adevărată a speciilor. În 1967, GALET (citat de VIDAL şi colab., 1999) arată că "Negrul" încadrat la *Proles orientalis* (caracterizat teoretic ca fiind cu lăstari tineri glabrii) este încadrat alături de varietăţi cu densitate medie spre mare ("Muscat à petit graines", "Muscat d'Alexandrie", "Khalili") sau mare ("Cinsault") a perişorilor de pe vârful lăstarilor. Pe lângă aceasta, grupurile ecogeografice desemnate de BISSON au separat varietăţi care sunt strâns înrudite în studiile ampelografice ("Aligoté", "Melon", "Chardonnay"). Rezultatele sugerează că apartenenţa unor varietăţi la un grup sau altul trebuie să fie bine revizuită prin prisma analizelor genetice şi moleculare. Existenţa unei relaţii apropiate între varietăţi cu stabilitate genetică ("Chenin" şi "Gewurtztraminer") pot de asemenea sugera că principala diferenţiere genetică dintre cele trei grupuri principale definite în acest studiu a apărut de timpuriu în istoria cultivării viţei de vie (VIDAL şi colab., 1999).

NAZHAD şi colab. (2005) au utilizat de asemenea, tehnica RAPD pentru a studia polimorfismul genetic evidenţiat la şase soiuri autohtone de viţă de vie (Fakhri, Lal, Sangak, Red Yaghooti, White Yaghooti şi Cheshm Gavi) provenite din estul Iranului. Dendrograma obţinută evidenţiază patru grupe, autorii considerând că soiurile Red Yaghooti, White Yaghooti şi Lal au fost folosite în trecut ca genotipuri parentale în hibridări intraspecifice care au dus la formarea celorlalte soiuri analizate. Aceste rezultate dovedesc faptul că tehnica RAPD poate fi utilizată cu succes pentru studiul variabilităţii intraspecifice la viţa de vie.

Tehnica RAPD a fost utilizată şi pentru caracterizarea unor accesiuni de viţă de vie incluse în băncile de gene. Rezolvarea problemelor de identificarea a unor cultivare a constituit o prioritate pentru multe laboratoare de cercetare. Astfel de preocupări au avut şi BOWERS şi colab., 1993; STAVRAKAKIS şi colab., 1997; YE şi colab., 1998; BOHM şi colab., 1998; FANIZZA şi colab., 1999 etc.

1.3.2. Markerii AP-PCR (Arbitrary Primer PCR)

Metoda a fost descrisă de către WELSH şi McCLELLAND în anul 1990 şi se bazează pe amplificarea unor secvenţe de ADN cu ajutorul unor primeri arbitrari

alcătuiţi din peste 20 de nucleotide. Amplificarea secvenţelor are loc în condiţii speciale, separarea produşilor realizându-se în geluri de poliacrilamidă, iar evidenţierea lor prin autoradiografie. Este cea mai complicată metodă din cadrul MAAP datorită faptului că utilizează izotopi radioactivi şi probabil din acelaşi motiv este cel mai puţin utilizată în comparaţie cu alte tehnici. Există posibilitatea simplificării ei prin utilizarea gelurilor de agaroză şi colorarea fragmentelor cu bromură de etidiu (EtBr).

Se deosebeşte de metoda RAPD prin:

♦ Reacţia de amplificare are loc în trei etape distincte fiecare având un alt grad de specificitate: în primele două cicluri temperatura de fixare a primerilor determină o specificitate redusă a reacţiei (40^0C); în următoarele 10 cicluri temperatura de fixare este ridicată la 60^0C ceea ce asigură mărirea specificităţii reacţiei. Următoarele 20-30 de cicluri au loc în condiţii de specificitate mare în prezenţa dezoxinucleotidelor marcate radioactiv.

♦ Folosirea unei concentraţii mari de primer în primele cicluri de amplificare.

♦ Primerii folosiţi au fost concepuţi iniţial pentru alte scopuri (pentru secvenţiere) şi aleşi în mod arbitrar pentru această metodă.

Tehnica AP-PCR îşi găseşte mai puţine aplicaţii la viţa de vie. YE şi colab. (1996), au utilizat primeri cu lungimi cuprinse între 17-24 baze pentru amprentarea genetică a unor soiuri de viţă de vie şi păr. Rezultatele obţinute la viţa de vie, au relevat faptul că nu există o corelaţie pozitivă între lungimea primerilor şi numărul de benzi polimorfice/primer. Primerii decameri cu un conţinut în CG între 50-80% sunt de preferat în analizele moleculare la această specie.

1.3.3. Aplicaţiile tehnicii RAPD şi AP-PCR

Depistarea diversităţii genetice şi a gradului de înrudire între populaţiile de plante din flora spontană

Datorită capacităţii ei unice de a detecta şi cele mai mici niveluri de variaţie genetică, amprenta ADN obţinută prin tehnica RAPD poate deveni una dintre cele mai folositoare metode pentru astfel de cercetări.

Stabilirea relațiilor taxonomice la plante

Cercetările din cadrul taxonomiei plantelor se bazează pe un număr mare de caracteristici care definesc taxonii şi care sunt folosite la studiul relațiilor filogenetice. Amprenta ADN completează metodele taxonomice deja existente, mai ales în situațiile care implică niveluri taxonomice foarte apropiate.

Identificarea cultivarelor şi estimarea gradului de înrudire între acestea

Identificarea cultivarelor se poate realiza cu mare acuratețe prin amprenta ADN mai ales atunci când variabilitatea genetică este mare între diferite cultivare dar absentă în interiorul lor. Asemenea exemple sunt caracteristice plantelor care se înmulțesc vegetativ dar au provenit prin încrucişări între specii diferite, aşa cum este cazul majorității arborilor şi arbuştilor fructiferi.

Identificarea exactă a cultivarelor de plante este o cerință importantă atât pentru scopurile practice ale ameliorării cât şi pentru domeniile apropiate acesteia cum ar fi de exemplu protecția drepturilor de proprietate asupra soiurilor nou create. În ceea ce priveşte identificarea cultivarelor (unde problema constă în determinarea apartenenței unei probe de sămânță la un anumit cultivar sau la stabilirea identității unei probe necunoscute prin compararea ei cu varietățile existente într-o colecție de referință) tehnicile de analiză moleculară vor constitui metode rapide şi cu un cost rentabil.

Situația este alta atunci când se înregistrează un nou cultivar, fiind necesară stabilirea identității şi descrierea noilor selecții pentru prima oară precum şi verificarea uniformității şi stabilității acestora. Potențialul tehnicilor de analiză la nivel molecular nu a fost pe deplin exploatat iar utilizarea lor de către Uniunea Internațională Pentru Protecția Noilor Varietăți de Plante (UPOV) este încă în discuție. Din această cauză, ele nu au fost încă acceptate pentru caracterizarea noilor cultivare, cu toate că este recunoscut faptul că vor avea foarte probabil un rol important în viitor pentru determinarea diversității genetice.

Estimarea diversității genetice între cultivare şi rudele lor din flora spontană a atras de asemenea o atenție sporită în cadrul efortului depus pentru a face față fenomenului de reducere a diversității în procesul de ameliorare.

Cu toate acestea, pentru ca markerii moleculari să poată fi acceptați într-un

cadru legal, ei trebuie să îndeplinească unele criterii cum ar fi de exemplu: (1) capacitatea mare de a deosebi între ele diferite genotipuri, (2) interacţiunea minimă cu mediul înconjurător (inclusiv în timpul procedurilor de laborator), (3) posibilitatea de a oferi rezultate care pot fi echivalate între diferite laboratoare, (4) capacitatea de a estima distanţele genetice dintre cultivare, (5) informaţii despre localizarea lor în cadrul genomului şi posibilitatea verificării acestor poziţii şi (6) disponibilitatea metodologiei. Dacă primul criteriu legat de capacitatea mare de a deosebi între ele diverse genotipuri este îndeplinit de metodele de obţinere ale amprentei ADN, nu se poate spune acelaşi lucru şi despre celelalte cinci. Astfel echivalarea unor modele RAPD între diferite laboratoare s-a dovedit un lucru extrem de dificil.

Evidenţierea variabilităţii somaclonale la materialul vegetal înmulţit in vitro

Culturile *in vitro* se practică în mod obişnuit la multe specii de plante. Este cunoscut faptul că o parte din plantele regenerate pot să difere de tipul parental, fenomen cunoscut sub denumirea de "variabilitate somaclonală". Se presupune că această variabilitate provine fie din diversitatea genetică preexistentă în explant, fie din variabilitatea nou dobândită în timpul dediferenţierii celulare sau în timpul menţinerii calusului *in vitro*. Cu toate că există numeroase exemple asemenea variaţii sunt rar evidenţiate prin amprenta ADN.

La viţa de vie tehnica RAPD şi-a găsit cele mai mari aplicaţii în identificarea şi estimarea gradului de înrudire a unor cultivare, identificarea unor varietăţi autentice din diferite zone şi îmbunătăţirea clasificării realizate pe baza criteriilor ampelografice.

Prin metoda amprentei ADN, la viţa de vie s-a descoperit recent, că soiul Cabernet Sauvignon a apărut în urma unei încrucişări spontane între Cabernet Franc şi Sauvignon Blanc. Cele două soiuri fac parte din specia *Vitis vinifera*, Cabernet Sauvignon fiind considerat un hibrid intraspecific (BRATTSTEN, 2000).

Amprentele ADN generate cu ajutorul tehnicilor RAPD au fost folosite şi pentru compararea altor cultivare de *Vitis vinifera*, cum ar fi Cabernet Franc, Merlot, Carmenere, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Traminer, Regina, Sangiovese etc. (MULCAHY şi colab., 1995; VIDAL şi colab., 1999; FANIZZA şi colab., 1999; HERRERA şi colab., 2002).

În ultimii ani, tehnicile RAPD şi-au găsit aplicații pentru evidențierea variabilității genetice a materialului vegetal înmulțit *in vitro*. Astfel, se remarcă cercetările efectuate de PAMFIL (1996), PEROS şi colab. (1998), REGNER şi colab. (2000), AKBAŞ şi colab. (2004), IBANEZ şi colab. (2005), XU şi colab. (2005) etc.

1.3.4. Markerii RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Primele încercări de diagnosticare a variabilității somaclonale pe baza markerilor genetici au fost făcute prin metodologia RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), căreia autorul (POTTER, 1991) i-a modificat scopul inițial, de urmărire a distribuției polimorfice a alelelor într-o populație segregată, pentru a pune în evidență mutațiile într-o populație clonată. Ulterior, detectarea variabilității somaclonale a început să fie făcută şi pe baza analizelor RAPD. Această metodă prezintă numeroase avantaje comparativ cu RFLP: tehnica este mai simplă, mult mai rapidă, necesită o cantitate mică de material inițial, țesutul poate fi prelevat direct *in vitro*, absența radioactivității şi repetabilitatea destul de bună a analizelor RAPD.

1.3.5. Markerii AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Polimorfisme de lungime ale fragmentelor amplificate

AFLP reprezintă o tehnică elaborată de VOS şi colab. (1995) şi reprezintă o combinație între metoda RFLP şi PCR. Tehnica constă în digestia ADN–ului cu enzime de restricție, iar la capetele fragmentelor rezultate se ataşează secvențe dublu catenare specifice (*adapters*) cu ajutorul ADN ligazelor. Aceste secvențe împreună cu secvențele alăturate, reprezentând situsul de restricție al enzime, vor constitui locurile de fixare ale primerilor în vederea amplificării prin PCR. La capetele 3' ale primerilor se vor adăuga anumite nucleotide care vor permite amplificarea selectivă unei categorii de secvențe din setul de fragmente de restricție. Nu vor fi amplificate decât acele fragmente de restricție care au nucleotidele ce flanchează situsul de restricție complementare cu nucleotidele selective ale primerilor.

Separarea produşilor de amplificare se realizează prin electroforeză în geluri de

poliacrilamidă şi evidenţiere prin autoradiografie. Mai recent se utilizează şi marcajul cu fluorescenţă şi utilizarea secvenţiatoarelor automate.

Fragmentele de restricţie care urmează să fie amplificate se obţin cu ajutorul a două enzime de restricţie, *EcoRI* şi *MseI* (la una dintre ele situsul de restricţie apare cu o frecvenţă redusă în cadrul genomului - *rare cutter*, la cealaltă frecvenţa este mare – *frequent cutter*). Prin metoda AFLP are loc amplificarea predominantă a acelor fragmente de restricţie care au la unul din capete o secvenţă rezultată ca urmare a fragmentării cu o enzimă « frequent cutter » şi la celălalt capăt cu o enzimă « rare cutter ». Numărul fragmentelor amplificate poate fi controlat prin alegerea enzimei şi prin numărul bazelor care se adaugă la capătul trei al primerului. Cu o singură combinaţie de enzime (una care taie la şase baze iar cealaltă la patru baze) este posibilă amplificarea a 100.000 de fragmente din care se pot selecta pentru fiecare reacţie AFLP între 50 şi 100 de fragmente.

Ca şi în cazul markerilor RAPD fragmentele de interes pot fi extirpate din gel, purificate, clonate, secvenţiate şi transformate în markeri SCAR cu ajutorul unor primeri specifici.

Spre deosebire de metoda RAPD metoda AFLP are un grad mai ridicat de reproductibilitate, iar rezoluţia fragmentelor este mult mai bună. Cel mai mare avantaj al metodei este sensibilitatea cu care poate depista polimorfismele ADN.

La viţa de vie, metoda AFLP au fost aplicată în special pentru identificarea unor clone şi a diferenţelor genetice existente la nivel molecular între acestea, având în vedere că un aspect important în producţia şi calitatea vinului îl reprezintă caracterizarea clonelor. Astfel, BELLIN şi colab. (2000), au utilizat 50 de perechi de primeri cu scopul de a compara diferite clone de Pinot. VIGNANI şi colab. (1996) şi SENSI şi colab. (1996) au aplicat metoda AFLP şi SSR pentru stabilirea relaţiilor genetice între clonele de Sangiovese. Rezultatele încurajatoare obţinute au dus la concluzia că tehnicile bazate pe aceşti markeri moleculari pot fi utilizate pentru diferenţierea şi/sau identificarea unor clone. De asemenea, se remarcă şi studiile intreprinse de IMAZIO şi colab. (2002), asupra a 24 de clone de Traminer de provenienţă diferită. Ei au analizat comparativ clonele de Traminer utilizând tehnica SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

şi MSAP (Methyl-sensitive Amplified Length Polymorphsim). Rezultatele obţinute arată că cea mai adecvată tehnică pentru evidenţierea polimorfismului între clone s-a dovedit a fi tehnica AFLP. Tehnica MSAP a fost utilizată pentru evaluarea diferenţelor calitative privind gradul de metilare a ADN-ului între clonele analizate. Cercetările lor sugerează că diferenţele morfologice între clone sunt probabil, datorate efectului sinergic al modificărilor genetice şi epigenetice.

Variabilitatea genetică clonală la soiul Pinot noir a fost pusă în evidenţă de asemenea, tot prin tehnica AFLP, constatându-se faptul că în acest caz există variabilitate atât intra cât şi interclonală (BLAICH şi colab., 2007).

Tehnica AFLP fiind relativ ieftină, iar rezultatele obţinute având reproductibilitate între diferite laboratoare de analiză moleculară constituie un instrument valoros pentru identificarea şi analiza unor clone, facilitând eforturile de patentare clonală la vița de vie.

1.3.6. Markerii SSR (Simple Sequence Repeats)

Secvenţele microsatelit constituie repetiţii în tandem ale unor secvenţe di, tri sau tetra nucleotidice. Cele mai frecvente repetiţii sunt cele dinucleotidice, cum ar fi $(CA)_n$, $(CT)_n$, $(AT)_n$. La plantele superioare există o secvenţă microsatelit nucleotidică, care se repetă după 30-100 kb, cea mai frecventă fiind secvenţa $(AT)_n$ (NYBOM şi colab., 1989, 1990; HOEPFNER şi colab., 1993; BOTTA şi colab., 1995).

Polimorfismul microsateliţilor este dat de numărul de secvenţe nucleotidice care se repetă. În măsura în care se cunoaşte ordinea nucelotidelor la secvenţele învecinate microsateliţilor, se pot concepe primeri specifici, care vor permite amplificarea fragmentelor de ADN, ce înglobează microsateliţii. Lungimea acestor fragmente se determină apoi prin migrare în gel de poliacrilamidă. Variabilitatea markerilor microsateliţi se datorează diferenţelor de lungime a fragmentelor de ADN amplificate. În cazul secvenţelor automatizate, primerii specifici fiecărei secvenţe microsatelit sunt marcaţi cu o substanţă fluorescentă, profilul benzilor fiind citit cu ajutorul unui fascicul de laser, care va depista fiecare produs de amplificare în funcţie de substanţa fluorescentă cu care a fost marcat.

Markerii microsateliți au fost introduşi mai recent pentru identificarea viței de vie. THOMAS şi SCOTT (1993), citați de ULANOVSKY şi colab. (2001) au reuşit să caracterizez 20 de varietăți de viță de vie utilizând markeri microsateliți. Eu au propus utilizarea microsateliților pentru stabilirea unei baze de date internaționale referitoare la descrierea varietăților de viță de vie, datorită nivelului mare de polimorfism, a codominanței, simplicității şi repetabilității analizelor moleculare SSR.

BOTTA şi colab. (1995), citați de ULANOVSCY şi colab. (2001), au dovedit că markerii microsateliți posedă o buna capacitate pentru identificarea varietăților, dar nu şi a clonelor de viță de vie, concluzie la care au subscris şi SILVESTRONI şi colab. (1997) care au analizat la nivel molecular clone din cultivarele Sangiovese şi Fortana.

SEFC şi colab. (1998) utilizând 10 loci microsatelitari au obținut diferite benzi paterne pentru fiecare dintre cele 60 de varietăți de viță de vie din colecția de germoplasmă analizată. LOUREIRO şi colab. (1998), au utilizat de asemenea, tehnica SSR pentru identificarea varietății Albariño.

HERRERA şi colab. (2002) au folosit amprentele ADN generate cu ajutorul tehnicilor RAPD şi ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction) pentru a compara patru cultivare de *Vitis vinifera* folosite pe scară largă în Chile, respectiv Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot şi Carmenere. Referința externă a fost constituită din material vegetal provenit din Franța. Cele două tehnici au evidențiat diferențe între cultivarele studiate, metoda ISSR având o putere de diferențiere mai mare decât RAPD, ceea ce sugerează utilizarea tehnicii ISSR-PCR atunci când se lucrează cu număr mare de cultivare. Astfel, a fost observată variabilitate între clonele de Merlot, clona originală din Chile şi provenienţa din Franța, rezultatele sugerând că cele două clone reprezintă genotipuri diferite. În schimb, pentru celelalte cultivare, cele două tehnici demonstrează uniformitatea populațiilor din Chile.

Tehnica SSR şi AFLP a fost utilizată în amprentarea genetică a unor varietăți de viță de vie, pentru rezolvarea cazurilor de omonimie şi sinonimie, precum şi pentru identificarea genotipurilor parentale la unele varietăți remarcabile, cum este de exemplu soiul Cabernet Sauvignon (BOWERS, MEREDITH, 1997).

Într-un alt studiu AKKAK şi colab. (2005), au analizat diversitatea genetică a

unor soiuri şi varietăţi de viţă de vie autohtone provenite din bazinul Mării Mediterane şi Algeria, folosind 12 markeri SSR. Dintre cele 60 de cultivare analizate au fost identificate 34 de genotipuri diferite, ceea ce arată faptul că tehnica SSR poate fi utilizată cu succes şi în studiul relaţiilor intraspecifice la această specie.

Tehnicile RAPD, AFLP şi SSR au fost utilizate cu succes şi în studiile de cartare genetică la viţa de vie. Astfel, în anul 2002, THIS şi colab. s-au preocupat de întocmirea unei hărţi genetice de referinţă în cazul descendenţilor obţinuţi în cazul încrucişării dintre soiurile Syrah x Grenache. Întocmirea hărţii genetice s-a bazat pe utilizarea markerilor microsateliţi polimorfi VNI şi VMC. Hărţile genetice întocmite pe baza markerilor SSR sunt extrem de interesante, deoarece permit evidenţierea grupelor de linkage la nivelul unor combinaţii hibride. De asemenea, markerii SSR VMC au fost testaţi atât în cazul unor soiuri de *Vitis vinifera*, cât şi *Vitis riparia*. Aproximativ 80% dintre locusurile identificate cu ajutorul markerilor SSR la *Vitis vinifera* fiind reproductibile şi la *Vitis riparia*. Aceşti markeri sunt interesanţi pentru studiile filogenetice la unele specii înrudite.

CAPITOLUL II

OBIECTIVELE CERCETĂRII, MATERIALUL ŞI METODA

2.1. SCOPUL CERCETĂRILOR

Vița de vie (*Vitis vinifera*) constituie una dintre culturile horticole larg răspândite atât în România cât şi pe plan mondial.

Utilizarea metodele tradiționale de ameliorare, deşi au dat rezultate spectaculoase, are anumite limite din cauza duratei lungi a unei generații şi a naturii extrem de heterozigote a acestei culturi. Pentru clasificarea genurilor şi a speciilor familiei *Vitaceae* s-a folosit, cel mai adesea, criteriul asemănărilor morfologice, iar pentru identificarea acestora s-au întocmit chei de determinare. Există însă opinii după care criteriul morfologic de clasificare al genului *Vitis* nu este suficient, fapt care a generat opinii controversate. Pentru eliminarea acestora s-a recurs la analize de ordin genetic şi biochimic.

Progresele făcute în ultimii ani în domeniul biologiei moleculare privind utilizarea markerilor genetici şi în special după perfecționarea reacției PCR (Polimerase Chain Reaction) de amplificare a unor fragmente de ADN au făcut ca identificarea variabilității somaclonale pe baza polimorfismului ADN să devină o realitate.

Variabilitatea somaclonală este considerată o sursă de obținere de noi genotipuri în scop de ameliorare deschizând noi posibilități pentru aplicații în viticultură. Cu toate acestea, informații despre variabilitatea la plantele regenerate sunt destul de puține, până în prezent fiind raportate numai câteva exemple de variabilitate somaclonală la vița de vie.

Având în vedere aceste deziderate, s-a considerat utilă abordarea unor cercetări în domeniul biotehnologiilor şi al micropropagării la specia *Vitis vinifera*.

Scopul principal al cercetărilor noastre a constat în caracterizarea şi stabilirea relațiilor filogenetice între zece soiuri de viță de vie, cu ajutorul metodologiei RAPD,

precum şi inducerea variabilității somaclonale şi testarea heteromorfismului molecular a somaclonelor obținute din cinci soiuri de viță de vie larg cultivate în Transilvania şi chiar în România.

Cercetările inițiate de noi, constituie, probabil, primele încercări de identificare a variabilității somaclonale la vița de vie prin metoda RAPD.

2.1.1. Obiectivele urmărite în cercetările aferente tezei de doctorat

Obiectivele principale s-au concretizat în următoarele aspecte:

♦ Stabilirea procolului de extracții de ADN şi utilizarea tehnicii RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) în vederea identificării polimorfismului genetic *in vivo* la zece soiuri de viță de vie provenite din cinci stațiuni horticole amplasate în areale geografice diferite.

♦ Identificarea primerilor capabili să determine polimorfismul la nivel molecular între soiurile analizate.

♦ Stabilirea compoziției mediilor de cultură, a tipului de hormoni şi a concentrațiilor acestora care să favorizeze obținerea de neoplantule, creşterea şi proliferarea lăstarilor *in vitro* în urma multiplicării prin lăstărire axilară.

♦ Alegerea tipului de explant şi a mediilor de cultură adecvate pentru inducerea variabilității somaclonale, respectiv obținerea de calus.

♦ Subcultivarea calusului pe un mediu de creştere.

♦ Stabilirea mediilor de cultură pentru regenerarea plantelor prin transferul calusului pe medii de inducere a organogenezei.

♦ Punerea în evidență a eventualelor diferențe genetice apărute între regeneranți, respectiv între somaclone şi plantele mamă din care au provenit prin analiza RAPD.

2.2. MATERIALUL BIOLOGIC

2.2.1. Materialul biologic utilizat în experiențele de diferențiere a soiurilor cu ajutorul markerilor moleculari

Materialul biologic studiat a fost constituit din zece soiuri de viță de vie, provenite din cinci stațiuni viticole din țara noastră amplasate în condiții pedoclimatice total diferite. Au fost analizate cinci soiuri de viță de vie pentru vin alb, două soiuri pentru vin roşu şi trei soiuri pentru struguri de masă.

Soiurile pentru vin alb au fost: Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Muscat Ottonel, Traminer roz.

Soiurile pentru vin roşu au fost: Cabernet Sauvignon, Merlot.

Soiurile pentru struguri de masă au fost: Napoca, Timpuriu de Cluj, Cetățuia.

Stațiunile viticole din care s-a recoltat materialul biologic au fost: Recaş, Blaj, Valea Călugărească, Odobeşti şi Iaşi.

Din cele cinci stațiuni viticole s-au recoltat lăstari de viță de vie în anul 2000 şi 2001. Recoltarea s-a făcut primăvara, iar lăstarii au fost transportați în geantă frigorifică pentru evitarea pierderii turgescenței.

De la aceşti lăstari s-au recoltat frunzele tinere care au fost păstrate, până la prelucrare, în frigider la o temperatură de –70^{0}C.

Toate analizele au fost efectuate în cadrul laboratorului de Biotehnologii de la Facultatea de Horticultură.

2.2.1.1. Descrierea soiurilor luate în studiu

Fetească albă

Sinonime: Fetească albă, Fetişoară, Păsărească albă, Poamă păsărească, Poama fetei, Leanka.

Origine. Soiul Fetească albă era cunoscut la noi în țară cu mult înainte de invazia filoxerei. Asupra originii acestui soi nu se cunosc date precise. Se presupune că acest soi s-a „născut” într-o perioadă vitregă din istoria poporului român şi anume în mileniul de migrație a popoarelor, între anii 275-1241. Unii autori susțin că acest soi

ar fi fost adus în Ardeal, din Germania sau din Boemia, de către colonişti, dar acest lucru nu s-a dovedit istoric.

După ampelografii maghiari, soiul Fetească albă ar fi originar din Ardeal. Dar, acest soi este tot aşa de vechi şi în podgoriile noastre de la est şi sud de Carpați, fiind socotit ca soi local. Este menționat de la întemeierea vestitelor podgorii ale Moldovei, descris de Dimitrie Cantemir, intrând ca soi de bază în compunerea sortimentului pentru vinuri fine la Cotnari, împreună cu Grasa, Frâncuşa şi Tămâioasa, la Huşi şi la Odobeşti.

Soiul Fetească albă este cultivat pe importante suprafețe în Transilvania şi în Muntenia, unde dă cele mai bune rezultate.

De remarcat că soiul Fetească albă s-a impus în timp, fiind luat în cultură de toate țările viticole vecine cu România, iar în Germania este cultivat sub numele de Mädchentraube (www.ro.wikipedia.org/wiki/Fetească_Albă).

Caractere ampelografice. La deschiderea mugurilor rozeta este uşor scămoasă, de culoare verde, cu nuanță arămie-roşiatică. Lăstarul este glabru, striat, colorat în roşu-castaniu pe partea însorită.

Frunza adultă este mijlocie, mai mult lată decât lungă, pentalobată, cu lobul terminal scurt şi lățit; sinusurile laterale sunt adânci deschise în formă de liră sau de U; sinusul pețiolar, larg deschis în formă de acoladă, constituie caracterul de bază în recunoaşterea soiului. Limbul frunzei este de culoare verde, subțire şi lucios, glabru pe ambele fețe cu dinții rari şi lungi dispuşi neuniform.

Floarea este hermafrodită normală, pe tipul 5, prezentând uneori abateri către tipul şase, cu polen abundent şi fertil.

Strugurii mici spre mijlocii (90-110 g în medie), cilindrici sau cilindro-conici, aripați, deşi în boabe neuniforme ca mărime. Bobul este mic, sferic, de culoare verde gălbuie cu pielița subțire, acoperită cu un strat fin de pruină, cu punctul pistilar aparent, constituind un caracter de soi. Miezul este zemos, cu gust plăcut, armonios, nearomat (fig. 1).

Lăstarii au vigoare mare de creştere, meritale mijlocii (12-14 cm lungime), de culoare verde cu nuanțe slabe roşcate la noduri. Coarda prezintă striuri fine, de culoare galben brun.

Fig. 1. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Fetească albă
Ampelographic characters of leaf and cluster in Feteasca alba

Fetească albă este unul din cele mai viguroase soiuri româneşti de vin, având o putere ridicată de acumulare a zaharurilor în struguri şi o bună adaptare la condiţiile pedoclimatice din nordul ţării.

Vinurile de calitate deosebită ce se obţin sunt superioare seci, demiseci sau dulci-licoroase, armonios constituite şi cu buchet specific soiului (CONSTANTINESCU, 1959).

Fetească regală

Sinonime: Dănăşeană, Galbenă de Ardeal, Fetească de Ardeal.

Origine. Soiul a fost identificat, în jurul anilor 1920, în podgoria Târnave, mai exact în comuna Daneş – Sighişoara (jud. Mureş). De aceea, localnicii l-au „botezat": Dănăşană, Dănăşeana, Dăneşana sau Dunăşana. În literatura de specialitate a fost denumit şi Galbenă de Ardeal. Există şi ipoteza că soiul identificat în comuna Daneş ar fi fost cultivat de mult timp în Transilvania, fiind întâlnit sub diferite nume.

Majoritatea viticultorilor sunt de părere că soiul Fetească regală – Dănăşană este rezultatul încrucişării naturale între două soiuri româneşti ce se găseau de mult timp în zonă – Fetească albă şi Grasa de Cotnari. La început, acesta soi „Dănăşană" a fost înmulţit şi cultivat numai în podgoria Târnave, fiind foarte apreciat de localnici.

La Expoziția Națională de Vinuri şi Fructe ce a avut loc la Bucureşti, în 1928, vinul obținut din soiul identificat în comuna Daneş a fost prezentat sub numele de Fetească regală.

Caractere ampelografice. Dezmugurire scămoasă, cu rozeta de culoare verde albicioasă; primele frunzulițe şi vârful lăstarului sunt de culoare verde cu nuanțe albicioase datorate perilor rari şi lungi. Frunza adulta este mijlocie (11-13 cm lungime), ceva mai lată decât lungă, întreagă cu un început uşor de trilobie; sinusurile laterale superficiale deschise în formă de U; sinusul pețiolar deschis în liră sau U. Limbul frunzei este de culoare verde închis, lucios, cu marginile involute, scămos pe fața inferioară. La fel ca şi la soiul Grasă prezintă pe fața superioară a mezofilului adâncituri, mai închise la culoare sub forma unor "*lovituri de ciocan*".

Fig. 2. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Fetească regală

Ampelographic characters of leaf and cluster in Feteasca regala

Floarea este hermafrodită, normală pe tipul cinci, soiul fiind autofertil. Strugurii mijlocii (în medie 110-130 grame), cilindro-conici, deseori aripați, cu boabele aşezate des pe ciorchine. Bobul mijlociu, sferic, cu pielița subțire, de culoare verde gălbui, uşor pruinată; pulpa zemoasă, nearomată. Lăstarii sunt de vigoare mijlocie, colorați în verde, uşor bronzați pe partea însorită. Coardele în toamnă au culoare galben brun, fin striate (fig. 2).

Fetească regală este un soi semiaromat, vinul tânăr degajând o aromă originală, elegantă, de tip floral, uşor de recunoscut. Gustul plăcut, bine conturat, plin de finețe, este acrişor, şi aduce cu cel al unui măr romanesc de vară, ceea ce îi conferă o personalitate aparte. Vinurile obținute din acest soi sunt seci dar se pot obține şi vinuri demiseci sau chiar dulci.

Riesling italian

Sinonime: Riesling italian, Riesling de Italia, Riesling blanc

Origine. Locul de origine al soiului Riesling italian nu este bine stabilit. Unii ampelografi susțin că ar fi originar de pe malurile Rinului, alții consideră că ar fi originar din provincia Styria (Austria) sau din Italia, după nume.

Face parte din *Proles occidentalis.*

Riesling italian este unul din soiurile cu răspândire largă, cosmopolit, cunoscut aproape în toate țările viticole din Europa.

În țara noastră soiul Riesling italian a fost introdus încă înainte de invazia filoxerei şi astăzi are cea mai largă răspândire, fiind prezent în toate podgoriile.

Pe suprafețe mai întinse se cultivă în podgoriile din Transilvania şi Dealul Mare, unde dă şi cele mai bune rezultate.

Caractere ampelografice. La deschiderea mugurilor, rozeta este pufoasă, albă-verzuie, cu uşoară nuanță roz-violacee (CONSTANTINESCU, 1960). Frunza este mijlocie, cinci lobată, cu mezofilul subțire, de culoare verde-gălbui, caracteristic. Dinții sunt mari alungiți şi ascuțiți

Lăstarul este verde, glabru, cu striuri cafenii deschis, la vârf şi la noduri uşor scămos.

Floarea este hermafrodită normală, de tipul cinci, rareori şase. Strugurii sunt cilindrici, prima ramificare a rahisului fiind transformată într-o aripioară ce caracterizează acest soi (OŞLOBEANU şi colab., 1980).

Fig. 3. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Riesling italian

Ampelographic characters of leaf and cluster in Rieslina italian

Pedunculul este subțire, semilignificat. Boabele sunt dese, mici sau mijlocii, sferice,

bătute, cu diametrul de 12-14 mm, de culoare verde-gălbuie, mai auriu pe partea expusă la soare, cu punctul pistilar aparent sub formă de pată mică negricioasă, care constituie caracter de soi. Miezul este zemos, nearomat. Pielița este acoperită cu un strat subțire de pruină (fig. 3).

Coarda este de culoarea cojii de nucă, cu nuanțe gălbui, mai roşiatică la noduri, pronunțat striată şi punctată (CONSTANTINESCU,1959).

Soiul Riesling italian este utilizat pentru producerea vinurilor de calitate superioară, fiind unul din soiurile cele mai răspândite şi apreciate din țara noastră.

Vinurile sunt superioare seci, demiseci sau dulci licoroase (CONSTANTINESCU, 1959).

Muscat Ottonel

Sinonime: Muscat Ottonel, Ottonel, Tămâioasă Ottonel, Mottonel, Muscats, Muscat de Crăciunel Târnave, Muscat Ottonel blanc.

Origine. Muscat Ottonel este un soi originar din Franța, obținut din semințe şi introdus în cultură în anul 1852 de către Robert Moreau, un horticultor din Angers. Acest soi există în numeroase varietăți cu struguri de culoare galben – pal până la albastru-negru.Toate varietățile au un grad variabil de parfum şi gust "muscat", o caracteristică inimitabilă.

Face parte din *Proles orientalis - subproles caspica.*

Soiul Muscat Ottonel are o răspândire largă în cultură, fiind cultivat aproape în toate țările viticole.

La noi în țară, este răspândit în majoritatea podgoriilor, în special întâlnindu-se în podgoriile Dealul Mare, Odobeşti şi Drăgăşani (CONSTANTINESCU, 1960).

Caractere ampelografice. La deschiderea mugurilor, rozeta este scămoasă, de culoare verde-roşiatică, mai pronunțat colorată spre margini (fig. 4).

Frunza normală are în general dimensiuni cuprinse între 14-18 cm lungime şi 14-16 cm lățime, fiind glabră şi netedă, în mod frecvent cu trei sau cinci lobi. Marginea frunzei prezintă dinți mărunți, rotunjiți şi mucronați, aşezați de regulă alternativ, un dinte mare şi unu-doi mici (CONSTANTINESCU, 1960). Marginile frunzei sunt răsucite spre partea superioară, formând o pâlnie, care conduce către

punctul pețiolar (OŞLOBEANU şi colab., 1980).

Floarea este hermafrodită normală, de tipul cinci sau şase, cu staminele înclinate normal, mai lungi decât pistilul. Ovarul este verde, cu 2-3 loji şi respectiv 4-6 ovule. Polenul are conformație normală şi este fertil, soiul fiind autofertil.

Fig. 4. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Muscat Ottonel

Ampelographic characters of leaf and cluster in Muscat Ottonel variety

Strugurii sunt de formă cilindrică, uniaxiali, uneori aripați, cu boabele dese sau bătuți, având în medie 12-14 cm lungime. Bobul este sferic, de culoare galbenă-aurie, cu diametrul mediu de 12-14 mm, având miezul zemos, cu gust discret de muscat şi caracteristic, foarte plăcut şi mustul necolorat.

Lăstarii în iunie-iulie sunt glabri, de culoare verde-castanie, cu primele trei frunze verzi-arămii, uşor scămoase, care, pe măsură ce cresc devin verzi şi glabre. Coarda este striată, cu caneluri superficiale, rotundă sau uşor turtită în secțiune, de culoare roşie-cafenie, cu nodurile vineții. Culoarea roşie a coardei este caracteristică pentru acest soi.

Traminer roz

Sinonime: Traminer roz, Traminer roşiu, Tramini, Traminer.

Origine. Este un soi originar din Tirolul italian, din împrejurimile orăşelului Tramin, de unde îi vine şi numele. Este un soi foarte vechi, citat cu 500 de ani în urmă

de către Tragus, ca fiind cultivat în Bavaria. Se pare că are aceeaşi vechime pe care o are şi în provincia Franche Compté din Franța.

Face parte din *Proles occidentalis.*

Soiul Traminer roz este răspândit în majoritatea țărilor viticole din Europa, unde se cultivă pe suprafețe întinse.

La noi în țară este răspândit mai mult în Banat şi Transilvania, în special în podgoriile Alba Iulia şi Târnave. Pe suprafețe mai mici este răspândit şi în podgoriile din Odobeşti şi Dealul Mare.

Caractere ampelografice. În faza de dezmugurire rozeta este pufoasă, de culoare verde-albicioasă, cu slabe nuanțe roşiatice-liliachii.

Floarea este hermafrodită normală, de tipul cinci, uneori şase, cu staminele normal înclinate.

Polenul are o constituție normală, este fertil şi slab abundent, soiul fiind autofertil. Frunza normală este de 12,5-14,5 cm lungime şi 13-15 cm lățime, cu trei sau cinci lobi, uneori întreagă. Limbul este gros, gofrat, cu marginile uşor îndoite în jos, glabru pe partea superioară, cu peri şi scamă pe partea inferioară. Marginea frunzei prezintă dinți scurți, rotunjiți, vizibil mucromați; dinții din vârful lobilor sunt puțin evidenți. Strugurii au formă cilindrică sau cilindro-conică, uneori sunt uniaripați, de 7-12 cm lungime, cu boabele dese şi neomogene, cu pielița groasă şi de culoare roz, acoperită cu multă pruină. Bobul este sferic, cu diametrul de 12-15 mm, de culoare roz-cenuşie, cu miezul zemos, nearomat şi

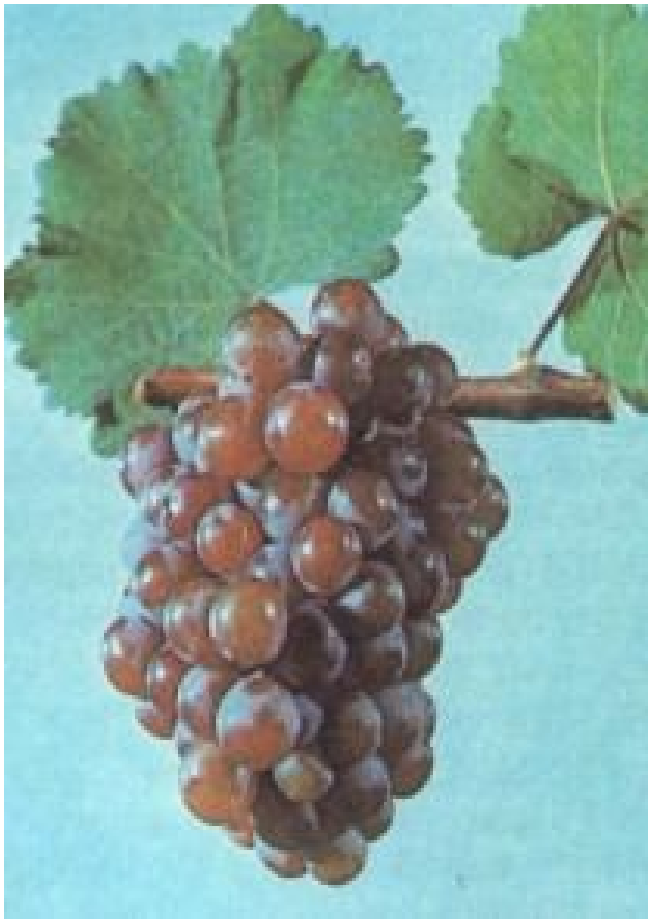


Fig. 5 Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Traminer roz

Ampelographic characters of leaf and cluster in Traminer rose variety

mustul incolor (fig. 5).

Lăstarul în iunie-iulie este verde, cu striuri roşiatice-vineții. Coarda este de culoare castanie-roşiatică, striată, pronunțat punctată. Scoarța lignificată se exfoliază în fâşii.

Traminer roz este unul din cele mai apreciate soiuri pentru producerea de vinuri superioare seci sau licoroase, strugurii putând fi culeşi la supracoacere. Ei pot fi vinificați singuri sau în amestec cu alte soiuri (CONSTANTINESCU, 1960).

Cabernet Sauvignon

Sinonime: Cabernet Sauvignon, Bordeaux, Caberne. În unele zone este cunoscut şi sub numele de Petit Cabernet, Sauvignon Rouge sau Vidure.

Origine. Soiul este originar din provincia Gironde – Franța, unde se cultivă pe suprafețe mari, fiind apreciat încă de pe vremea cardinalului Richelieu (1600).

Face parte din *Proles occidentalis.*

Soiul Cabernet Sauvignon are o largă răspândire în cultură. În Franța, în regiunile Medoc şi Bordeaux se cultivă în sortiment tehnologic cu Malbec şi Merlot, dând un vin cu renume mondial.

Cabernet Sauvignon poate fi socotit un soi cosmopolit, fiind unul dintre cele mai bune soiuri negre, depăşind cu mult soiul Cabernet franc.

În țara noastră este cunoscut încă dinainte de invazia filoxerei, fiind răspândit în podgoriile Drăgăşani, Sâmbureşti, Segarcea, Dealul Mare, Odobeşti.

Caractere ampelografice. În faza de dezmugurire, rozeta este pronunțat scămoasă, de culoare verde-albicioasă, cu nuanță roz-violacee pe margini (fig. 6).

Floarea este hermafrodită, normală, de tipul cinci, uneori prezintă abateri către tipul şase. Are 5-6 stamine, normal înclinate.

Frunza normală este aproape izodiametrică, de mărime mijlocie, având între 13,5 şi 18,5 cm lungime şi 13,5 şi 19 cm lățime; caracteristică cu cinci lobi, cu limbul uşor băşicat cu urme de scame pe partea superioară şi vizibil scămos pe partea inferioară. Marginea frunzei prezintă dinți uşor rotunjiți şi mucronați, cu intervale mari între ei, alternând neuniform cei mari cu cei mici.

Fig. 6. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Cabernet Sauvignon

Ampelographic characters of leaf and cluster in Cabernet Sauvignon *variety*

Strugurii sunt de mărime submijlocie sau chiar mai mică, având 10-15 cm lungime, uniaxiali sau adesea uniaripați, având boabele potrivit de dese. Pedunculul este foarte scurt, de 2-3 cm, puternic lignificat.

Bobul este mic, sferic, cu diametrul de 12-14 mm, negru, zemos, cu gust ierbos, mustul şi pensula necolorate.

Lăstarul în iunie-iulie este roşcat la bază, cu vârful şi prima frunzuliță alb-verzui, scămoase. Coarda este rotundă în secțiune şi uşor turtită, de vigoare mijlocie, cu diametrul între nodurile 4 şi 11 de 7/8-9/10 mm. Are culoarea cafenie-arămie, cu nodurile colorate mai intens.

Din strugurii soiului Cabernet Sauvignon se obțin cele mai bune vinuri roşii superioare. Vinul, aspru la început, dobândeşte prin învechire calități excepționale, fiind bine echilibrat, fin, intens colorat şi cu buchet caracteristic (CONSTANTINESCU, 1959).

Merlot

Origine. Acest soi este originar din Franța, regiunea Mèdoc, fiind cunoscut înainte de invazia filoxerei. Se presupune că face parte din familia Cabernet (DEBUIGNE, 1992). De asemenea, cercetătorii de la Universitatea Davies din California consideră că soiul Merlot provine din soiul Cabernet Franc, care la rândul lui este o varietate a soiului foarte vechi franțuzesc Carmenere. (www.en.wikipedia.org/wiki/Merlot).

Face parte din *Proles occidentalis.*

Este răspândit pe suprafețe mari în regiunea Bordeaux, în Franța. Se cultivă în Rusia, Italia, Germania, Bulgaria, Ungaria. Extinderea în cultură datează din a doua jumătate a secolului al XIX-lea (DEBUIGNE, 1992).

La noi în țară este mai răspândit în podgoriile din Moldova şi Dealul Mare.

Caractere ampelografice. Frunza este mijlocie, 5-lobată, gofrată, verde-închis, uşor scămoasă pe fața interioară. Marginile sunt curbate spre fața superioară (fig. 7).

Fig. 7. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Merlot

Ampelographic characters of leaf and cluster in Merlot variety

Strugurii sunt lungi, conici sau cilindro-conici, cu primele două ramificații mai mari. Boabele mijlocii, dese, sferice, cu pielița colorată în albastru-violaceu închis (OŞLOBEANU şi colab., 1980). Este un soi apreciat pentru vinurile roşii superioare (CONSTANTINESCU, 1959).

Napoca

Origine. Napoca este un soi de struguri pentru masă, omologat în anul 1984, fiind obținut la Stațiunea de Cercetări Horticole Cluj, de către Oprea Ştefan şi Ştefan Hontilă, prin selecție individuală, dintr-o populație rezultată din hibridare sexuată a soiurilor Alphonse Lavallée x elita F1 (Regina Viilor x Muscat Hamburg).

Se poate cultiva cu rezultate bune în zonele cu favorabilitate ecologică pentru

cultura economică a viţei de vie, cu precădere în Transilvania, în partea de vest a ţării, în Moldova şi chiar în podgoriile de pe dealurile Subcarpaţilor Meridionali (OPREA şi colab., 2007).

Caractere ampelografice. Frunzele adulte au mărime mijlocie cu trei lobi, iar florile sunt hermafrodite normale de tipul cinci, soiul fiind autofertil. Strugurii de formă cilindro-conică sunt mijlocii-mari, cu desime mijlocie de inserare a boabelor pe ciorchine, iar procesele de meiere şi mărgeluire în mod practic lipsesc (fig. 8). Bobul este mijlociu-mare, de formă ovală, cu pielița de culoare neagră-violacee mijlociu groasă, elastică, neaderentă la pulpă şi este acoperită cu un strat uniform de pruină. Pulpa este de culoare albă cu nuanță roz, crocantă, cu suculență echilibrată, aromă fină specifică şi gust dulce-acrişor plăcut (OPREA şi colab., 2007).

Fig. 8. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Napoca

Ampelographic characters of leaf and cluster in Napoca variety

Soiul Napoca se remarcă prin fertilitate şi productivitate ridicată, timpurietate, calitate superioară a strugurilor şi toleranță sporită la condițiile de iernare.

Timpuriu de Cluj

Origine. Soiul Timpuriu de Cluj a fost obținut la Stațiunea de Cercetări Horticole Cluj de către Oprea Ştefan, prin hibridare sexuată între soiurile Crâmpoşie x Frumoasă de Ghioroc, fiind omologat în anul 1979.

Se poate cultiva cu rezultate bune în zonele de favorabilitate ecologică pentru

cultura economică a viţei de vie, cu precădere în Transilvania şi în partea de vest a ţării, în zona centrală şi de sud a Moldovei, pentru satisfacerea nevoilor de consum local cu struguri pentru masă.

Caractere ampelografice. Frunzele adulte au mărime mijlocie cu trei şi cinci lobi, iar florile sunt hermafrodite normale de tipul cinci, soiul fiind autofertil. Strugurii de formă cilindro-conică, au mărime mijlocie, cu desime mijlocie de inserare a boabelor pe ciorchine (fig. 9). Bobul este mijlociu, de formă sferic-ovală, cu pielița de culoare alb-gălbuie, mijlociu groasă şi elastică, neaderentă la pulpă şi este acoperită cu un strat fin de pruină. Pulpa este semicrocantă cu aromă fină specifică şi gust dulce-acrişor plăcut (OPREA şi colab., 2007).

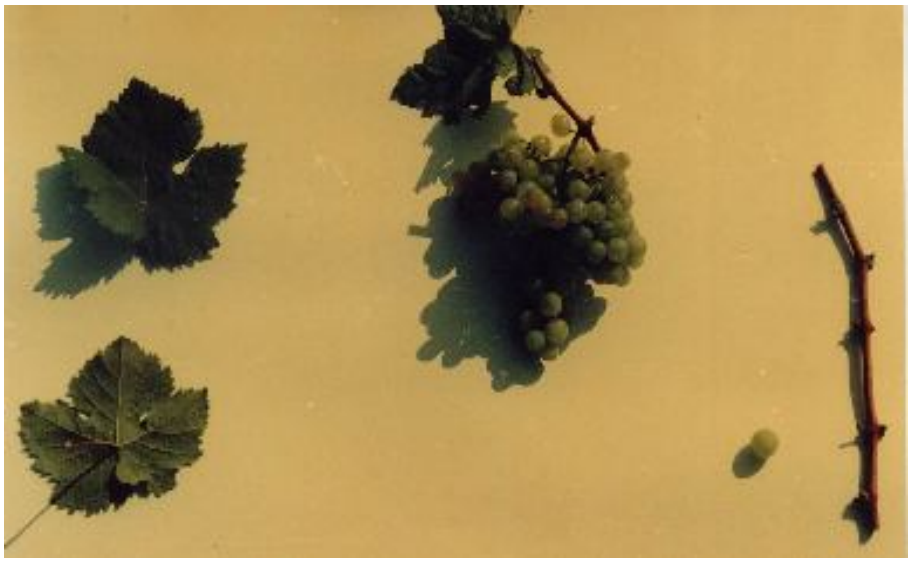


Fig. 9. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Timpuriu de Cluj

Ampelographic characters of leaf and cluster in Timpuriu de Cluj variety

Este un soi pentru consum în stare proaspătă, dar se pretează şi la prepararea vinurilor. Are rezistență bună la secetă şi boli. Este recomandat pentru cultura în podgoriile din Podişul Transilvaniei şi cea a dealurilor Crişanei şi Maramureşului.

Cetățuia

Origine. Acest soi a fost obținut la Stațiunea de Cercetări Horticole Cluj, de către Oprea Ştefan, prin hibridare sexuată între Crâmpoşie x Frumoasă de Ghioroc, fiind omologat în anul 1979.

Soiul se poate cultiva cu rezultate bune în toate zonele cu favorabilitate ecologică pentru cultura viței de vie, mai ales în Transilvania, partea de vest a țării, în Moldova şi chiar pe dealurile Subcarpaților Meridionali (OPREA şi colab., 2007).

Caractere ampelografice. Frunzele adulte au mărime mijlocie cu trei şi cinci lobi, iar florile sunt hermafrodite normale de tipul cinci, soiul fiind autofertil.

Fig. 10. Caracterele ampelografice ale frunzei şi ciorchinelui la soiul Cetățuia

Ampelographic characters of leaf and cluster in Cetatuia variety

Strugurii de formă cilindro-conică, au mărime mijlocie-mare şi desime mijlocie de inserare a boabelor pe ciorchine, iar procesele de meiere şi mărgeluire sunt absente (fig. 10) . Bobul este mijlociu-mare, de formă ovoidală, cu pielița de culoare neagră, mijlociu de groasă, elastică, neaderentă la pulpă şi este acoperită cu un strat uniform de pruină, care îi dă un aspect plăcut. Pulpa de culoare albă cu nuanțe verzui este semicrocantă, cu aromă fină specifică şi gust dulce acrişor plăcut.

Cetățuia este un soi de struguri pentru masa, remarcându-se prin calitatea superioară a strugurilor şi productivitatea ridicată.

2.2.1.2. Primerii utilizați în amplificarea ADN-ului

Pentru amplificarea probelor de ADN s-au utilizat un număr de 39 de primeri decanucleotidici, unul dintre primeri având 21 de nucleotide.

Proveniența primerilor a fost diferită, astfel: 15 primeri decanucleotidici sunt produşi de University of British Columbia (UBC), şase primeri de Pharmacia Biotech (PB), 18 de Mycroshinth (OPAB, OPA, OPE, OPAL, OPX, AB, GY169) (tabelul 3).

Tabelul 3

Primerii utilizați în amplificarea ADN

Primers used in DNA amplification

Nr. *No.*	Primer *Primer*	Secvența (5' – 3') *Sequence* (5' – 3')	Nr. *No.*	Primer *Primer*	Secvența (5' – 3') *Sequence (5' – 3')*
1.	UBC 228	GCT GGG CCG A	21.	PB 6	CCC GTC AGC A
2.	UBC 241	GCC CGA CGC G	22.	OPAB 11	GTG CGC AAT G
3.	UBC 245	CGC GTG CCA G	23.	OPAB 18	CTG GCG TGT C
4.	UBC 285	GGG CGC CTA G	24.	OPE 14	TGC GGC TGA G
5.	UBC 286	CGG AGC CGG C	25.	AB 11	GTG CGC AAT G
6.	UBC 421	ACG GCC CAC C	26.	OPA 04	AAT CGG GCT G
7.	UBC 436	GAG GGG GCC A	27.	OPA 03	AGT CAG CCA C
8.	UBC 537	CGA AAG GAC T	28.	OPAL 20	AGG AGT CGG A
9.	UBC 538	TGA TCT CTC C	29.	OPX O3	TGG CGC AGT C
10.	UBC 563	CGC CGC TCC T	30.	OPA 01	CAG GCC CTT C
11.	UBC 564	CGG CGT TAC G	31.	GY 169	CTA AGC TGC TTT TGT TTG AGC
12.	UBC 570	GGC CGC TAA T	32.	OPC-14	TGC GTG CTT G
13.	UBC 571	GCG CGG CAC T	33.	OPC 15	GAC GGA TCA G
14.	UBC 584	GCG GGC AGG A	34.	OPA 11	CAA TCG CCG T
15.	UBC 599	CAA GAA CCG C	35.	OPA 17	GAC CGC TTG T
16.	PB 1	GGT GCG GGA A	36.	70.08	CTG TAC CCC C
17.	PB 2	GTT TCG CTC C	37.	OPA 20	GTT GCG ATC C
18.	PB 3	GTA GAC CCG T	38.	70.03	ACG GTG CCT G
19.	PB 4	AAG AGC CCG T	39.	MIC – 07	TGT CTG GGT G
20.	PB 5	AAC GCG CAA C			

Primerii utilizați pentru amplificarea secvențelor de ADN au avut un conținut de G-C între 50 şi 80%. Primerii au fost aleşi aleatoriu sau pe baza datelor din literatura de specialitate (MULCAHY şi colab., 1995; VIDAL şi colab., 1999; LIN şi colab., 1997; ULANOWSKY. şi colab., 2001; YE şi colab., 1996; ROUT şi colab., 2002; BELLIN şi colab., 2001; WOLF şi colab., 2001; PAMFIL, 1999).

Cei 39 de primeri au fost utilizați pentru amplificarea soiurilor provenite de la toate cele cinci stațiuni viticole. Primerii care au dat polimorfism au fost utilizați, apoi, şi pentru compararea aceloraşi soiuri, dar care au provenit din stațiuni viticole diferite.

2.2.2. Materialul biologic utilizat în experiențele de producere a variabilității somaclonale în condiții de laborator

Materialul biologic utilizat pentru inițierea culturilor *in vitro* a fost constituit din lăstarii aparținând celor zece cultivare de viță de vie din cele cinci stațiuni viticole menționate mai sus. Pentru recoltarea de lăstari s-au ales plantele cele mai viguroase şi mai tipice soiului, cu aspect aparent sănătos şi fără urme caracteristice de boli sau dăunători.

In studiile privind inducerea calusogenezei s-au utilizat plantulele micropropagate *in vitro*.

Materialul biologic folosit pentru studierea variabilității somaclonale a fost reprezentat de regeneranții obținuți din cultura de calus, respectiv câte zece somaclone din fiecare soi (tabelul 4).

2.2.2.1. Medii de cultură folosite

Explantele vegetale, reprezentate de organe, țesuturi, celule sau protoplaşti, pot fi menținute în viață după detaşarea lor de organismul matern prin cultivarea şi creşterea acestora pe medii aseptice, cu o compoziție chimică complexă.

Reuşita cultivării *in vitro* a explantelor vegetale depinde foarte mult de realizarea unor compoziții nutritive care să corespundă cel mai bine cerințelor vitale ale țesuturilor cultivate. Unul din mediile de cultură cel mai des utilizat este Murashige-Skoog (MS).

In toate experiențele noastre, mediul de bază utilizat a fost Murashige – Skoog (1962) (a cărui compoziție este prezentă detaliat în Anexa 1), suplimentat cu diferiți hormoni, în funcție de scopul propus. Acest mediu a fost folosit de majoritatea autorilor în micropropagare la vița de vie (NAKANO şi colab., 1997; HELOIR şi colab., 1998; SIVRITEPE şi colab., 1999; KIM şi colab., 2002; OLAH şi colab., 2003; AKBAS şi colab., 2004; BERTSCH şi colab., 2005; XU şi colab., 2005; IBANEZ şi colab., 2005).

Mediul MS (1962) are, ca şi componente de bază, macroelemente, microelemente, vitamine, aminoacizi.

Tabelul 4

Somaclonele analizate de la cele zece cultivare de viță de vie în scopul evidențierii apariției variabilității somaclonale

Vine somaclones analysed in order to evidentiate somaclonal variability

Soiul *Cultivar*	Somaclona *Somaclone*		Soiul *Cultivar*	Somaclona *Somaclone*	
Fetească albă	Fa 1 Fa 2 Fa 3 Fa 4 Fa 5	Fa 6 Fa 7 Fa 8 Fa 9 Fa 10	Cabernet Sauvignon	CR 1 CR 2 CR 3 CR 4 CR 5	CR 6 CR 7 CR 8 CR 9 CR 10
Fetească regală	Fr 1 Fr 2 Fr 3 Fr 4 Fr 5	Fr 6 Fr 7 Fr 8 Fr 9 Fr 10	Traminer roz	Tr 1 Tr 2 Tr 3 Tr 4 Tr 5	Tr 6 Tr 7 Tr 8 Tr 9 Tr 10
Riesling italian	Ri 1 Ri 2 Ri 3 Ri 4 Ri 5	Ri 6 Ri 7 Ri 8 Ri 9 Ri 10	Timpuriu de Cluj	TCj 1 TCj 2 TCj 3 TCj 4 TCj 5	TCj 6 TCj 7 TCj 8 TCj 9 TCj 10
Muscat Ottonel	Mus 1 Mus 2 Mus 3 Mus 4 Mus 5	Mus 6 Mus 7 Mus 8 Mus 9 Mus 10	Napoca	N 1 N 2 N 3 N 4 N 5	N 6 N 7 N 8 N 9 N 10
Merlot	Mr 1 Mr 2 Mr 3 Mr 4 Mr 5	Mr 6 Mr 7 Mr 8 Mr 9 Mr 19	Cetățuia	Ce 1 Ce 2 Ce 3 Ce 4 Ce 5	Ce 6 Ce 7 Ce 8 Ce 9 Ce 10

Ca sursă de hidrați de carbon s-a utilizat zaharoza (Sigma) în concentrație de 2-3%. Ca agent de gelificare s-a utilizat agargel (Sigma) în concentrație de 0,75%.

2.2.2.2. Regulatorii de creştere utilizați, rol şi funcții hormonale

Regulatorii de creştere sunt compuşii organici, alții decât substanțele nutritive, care în cantități mici stimulează, inhibă sau modifică procesele fiziologice din plante.

S-a constat că hormonii vegetali nu acționează separat, ci se intercondiționează reciproc, astfel că reacția plantelor, în toate fazele de creştere şi dezvoltare, reprezintă

rezultatul unui echilibru între compuşii stimulatori şi inhibitori.

Substanţele biostimulatoare cuprind trei grupe mari de compuşi cunoscuţi: auxine, gibereline, citokinine, iar după MITCHELL şi colab. (1970) şi brasinosteroizii.

La prepararea mediilor de cultură, în experienţele noastre s-au folosit auxina, acidul alfa naftil acetic (ANA) şi citochinele, reprezentate de benzil aminopurina (BAP) şi tidiazuron (TDZ).

În funcţie de etapa parcursă în procesul de multiplicare *in vitro* s-a utilizat o anumită gamă de concentraţii pentru fiecare tip de hormon. Tipurile de hormoni vegetali şi concentraţiile utilizate sunt prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5

Substanţe biostimulatoare utilizate în cultura *in vitro* la viţa de vie (mg/l) Cluj-Napoca, 2003-2006

Types of regulators used in vitro culture for grapewine (mg/l) Cluj-Napoca 2003-2006

Tipul de hormon *Type of regulator*	Iniţierea culturii *in vitro* *Initiated culture in vitro*	Inducerea calusogenezei *Callus induction*	Regenerarea din calus *Regeneration of callus*
ANA (mg/l)	0,5	5,0; 10,0	0,5
BAP (mg/l)	0,5; 1,0; 2,5	1,0	-
TDZ (mg/l)	-	-	0,5; 1,0; 2,0

2.2.2.2.1. Auxinele

Auxinele sunt compuşi naturali care, în doze extrem de mici, direct sau indirect, pot stimula atât creşterea cât şi dezvoltarea plantelor, respectiv formarea organelor vegetative şi generative. Fitohormonii auxinici îndeplinesc numeroase funcţii biologice, având un rol multiplu şi complex în organismele vegetale.

Rolul esenţial al auxinelor constă în alungirea şi creşterea celulelor, prin mărirea plasticităţii şi permeabilităţii membranelor şi a pereţilor celulari. Având şi o puternică acţiune rizogenă, auxinele sunt folosite în înmulţirea vegetativă pentru stimularea înrădăcinării butaşilor.

Cele mai utilizate auxine sunt acidul alfa naftil acetic (ANA), acidul 3- indolil –

butiric (AIB), acidul beta indolilacetcic (AIA), iar pentru inducerea formării calusului, cel mai adesea literatura citează utilizarea acidul 2,4 diclorfenoxiacetic (2,4-D). Se cunosc şi numeroase exemple în care, pentru inducerea calusului, s-au utilizat concentraţii mai mari de auxine sau combinaţii între auxine şi citochinine (HUTTEMAN şi colab., 1993; NAKANO şi colab., 1997; OLAH şi colab., 2003).

Se apreciază că, pentru diferenţierea şi alungirea celulelor din tulpini, concentraţia de auxină trebuie să fie între 10^{-5} M - 10^{-6} M. Concentraţia de auxine care acţionează pentru stimularea mugurilor se apreciază la 10^{-8} M, iar pentru alungirea celulelor din rădăcini de la 10^{-10} până la 10^{-12} M. Concentraţiile mai mari de auxine duc la producerea unor tulburări morfologice, apariţia de hipertrofii şi de hiperplastii care constă în formarea de ţesuturi tumorale (MILICĂ şi colab., 1983).

2.2.2.2.2. Citochininele

Citochininele sunt adenine substituite cu un nucleu purinic. Ele stimulează diviziunea celulară şi au un rol important şi în stimularea celulelor vegetale mature nemeristematice (CACHIŢĂ, 2000).

La plantele superioare, biosinteza citochininelor are loc în ţesutul meristematic din vârful rădăcinii, de unde sunt transportate prin ţesuturile conducătoare către celelalte ţesuturi şi organe ale plantei.

Activitatea fitohormonală de bază a citochininelor în cadrul metabolismului, constă în stimularea biosintezei acizilor nucleici (ARNr, ARNm) şi a activităţii proteinelor sau inhibarea activităţii unor enzime (HIGGINS şi colab., 1978), procese care inhibă îmbătrânirea celulelor şi a ţesuturilor vegetale.

Citochininele au un rol important în procesul de morfogeneză al plantelor (BUTIUC şi colab., 1996). Un conţinut mai mare de kinetină în mediul nutritiv, faţă de cel al auxinei, determină formarea de muguri pe calus, muguri din care se vor forma tulpini. Dacă însă se măreşte conţinutul auxinei, pe când cel al kinetinei rămâne la acelaşi nivel, pe ţesutul medular apar rădăcini adventive (HUSSEY, 1977, PAMFIL, 1983, LOYD şi colab., 1988).

Pentru inducerea apariţiei centrilor meristematici, care să genereze muguraşi şi

apoi tulpinițe, cel mai adesea în mediile de cultură este necesară prezența unei citochinine, în concentrații de 1-5 mg/l.

Caulogeneza este stimulată de prezența în substratul de cultură a unui anumit raport între auxine şi citochinine. Înainte de descoperirea citochininelor, a fost mult apreciată combinația dintre auxina 2,4-D şi laptele de nucă de cocos, ca fiind eficientă în inducerea formării calusului. După descoperirea citochininelor, pentru inducerea calusogenezei kinetina a fost mult utilizată, deşi nu în toate cazurile cu aceleaşi rezultate. Treptat laptele de nucă de cocos a fost înlocuit de citochinine. Abia mai târziu s-a demonstrat că efectul benefic al laptelui de nucă de cocos s-a datorat faptului că el conține mulți compuşi derivați ai citochininei. Realitatea că auxinele şi citochininele sunt esențiale pentru calus a fost acceptată unanim după descoperirea prezenței citochininei în laptele de nucă de cocos (PIERIK, 1987).

Tidiazuronul este considerat printre cele mai active citochinine. Această citochinină induce *in vitro* o proliferare mult mai mare la multe specii, în comparație cu alte citochinine. De asemenea, s-a constat că este eficientă în micropropagarea multor specii recalcitrante, cum sunt speciile lemnoase (HUTTEMAN şi colab., 1992).

2.2.2.3. Prepararea soluțiilor stoc pentru mediile de cultură

Mediile de cultură se compun din substanțe anorganice: macroelemente, microelemente şi fier chelatizat (FeEDTA) şi dintr-o serie de substanțe organice: vitamine, aminoacizi, glucide, hormoni, şi un agent gelificant.

În general, se prepară soluții stoc separat pentru: macroelemente, microelemente, FeEDTA, vitamine, aminoacizi şi pentru fiecare tip de hormon utilizat.

La prepararea soluțiilor stoc, s-a ținut seama de câteva reguli:

- dizolvarea substanțelor s-a făcut numai în solventul adecvat (apă bidistilată, alcooli, hidroxizi, acizi etc.);
- compuşii anorganici au fost dizolvați succesiv, în ordinea indicată de protocol;
- atunci când substanța s-a solubilizat mai greu, amestecul s-a încălzit uşor, pe o plită cu agitator magnetic.

Soluțiile stoc de macroelemente au fost preparate în concentrație de 10 ori mai mare decât cea prevăzută în rețeta mediului de cultură.

Soluțiile stoc de microelemente au avut o concentrație de 100 de ori mai mare decât cea prevăzută în formula de bază a mediului.

Fierul, un microelement necesar în mediile de cultură, a fost utilizat sub formă de chelat ($Na_2FeEDTA$). În cazul chelatului de fier nu s-au pregătit soluții stoc, acesta fiind cântărit în momentul utilizării.

Soluțiile stoc de vitamine, aminoacizi şi hormoni necesare au fost preparate în concentrație de 10%. Având în vedere că soluțiile stoc se recomandă să fie reînnoite periodic la circa trei luni de zile, pentru vitamine, aminoacizi şi hormoni s-a ales un volum de 100 ml.

Hidrolizatul de cazeină a fost dizolvat în momentul utilizării într-o soluție 1 N NaOH (hidroxid de sodiu).

Aşa după cum recomandă literatura de specialitate, hormonii au fost dizolvați în alcool etilic sau hidroxid de sodiu.

Auxina utilizată, respectiv acidul alfa naftil acetic (ANA) a fost dizolvată într-o mică cantitate de alcool etilic 96^0 şi apoi s-a diluat cu apă bidistilată până la obținerea soluției de concentrație 10%.

Citochinina, respectiv benzil aminopurina (BAP), a fost dizolvată, de asemenea, într-o mică cantitate de soluție 1 N de NaOH şi apoi diluată cu apă bidistilată până la obținerea soluției finale stoc cu concentrația de 10%. TDZ - thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3,-thidiazol-5-yl urea) a fost dizolvat în DMSO (dimetil sulf oxid) pentru a obține soluția stoc (10%).

Pentru toate soluțiile stoc aducerea la volum final s-a realizat în baloane cotate.

Vița de vie este una din plantele care necesită cantități mari de azot organic. Ca sursă de aminoacizi dar şi ca sursă de azot organic se utilizează adesea hidrolizatul de cazeină în concentrație de 0,1 – 1,0 g/l, peptona 0,25-3,0 g/l, triptona 0,25-2,0 g/l şi extractul de malț 0,5-1,0 g/l.

Pentru a suplini aportul de azot organic din mediul de cultură s-a utilizat hidrolizatul de cazeină. Hidrolizatul de cazeină a fost solubilizat într-o soluție 1 N de NaOH în momentul utilizării. Cantitate de hidrolizat de cazeină utilizată a fost de 100

mg/l mediu de cultură.

Soluțiile stoc au fost păstrate în frigider la temperatura de 2-4^{0}C şi au stat la baza preparării mediului propriu-zis de cultură.

2.2.2.4. Primerii utilizați în amplificarea ADN-ului regeneranților obținuți

Primerii utilizați pentru amplificarea ADN-ului regeneranților obținuți din cultura de calus au fost cei care au dat polimorfism în cazul amplificării ADN-ului la cultivarele de viță de vie *in vivo*. Proveniența celor 22 de primeri a fost diferită, astfel: 5 primeri decanucleotidici produşi de University of British Columbia (UBC), 5 primeri de Pharmacia Biotech (PB), 12 de Mycroshinth (OPAB, OPA, OPE, OPAL, OPX, AB) (tabelul 6).

Tabelul 6

Primerii utilizați în amplificarea ADN a regeneranților obținuți

Primers used in DNA amplification of regenerants obtained

Nr. *No*	Primer *Primer*	Secvența (5' – 3') *Sequence (5' – 3')*
1.	UBC 228	GCT GGG CCG A
2.	UBC 245	CGC GTG CCA G
3.	UBC 563	CGC CGC TCC T
4.	UBC 584	GCG GGC AGG A
5.	UBC 599	CAA GAA CCG C
6.	PB 1	GGT GCG GGA A
7.	PB 3	GTA GAC CCG T
8.	PB 4	AAG AGC CCG T
9.	PB 5	AAC GCG CAA C
10.	PB 6	CCC GTC AGC A
11.	OPAB 11	GTG CGC AAT G
12.	OPAB 18	CTG GCG TGT C
13.	OPE 14	TGC GGC TGA G
14.	AB 11	GTG CGC AAT G
15.	OPA 04	AAT CGG GCT G
16.	OPA 03	AGT CAG CCA C
17.	OPAL 20	AGG AGT CGG A
18.	OPX O3	TGG CGC AGT C
19.	OPA 01	CAG GCC CTT C
20.	70.08	CTG TAC CCC C
21.	70.03	ACG GTG CCT G

Nr. *No*	Primer *Primer*	Secvența (5' – 3') *Sequence (5' – 3')*
22.	MIC – 07	TGT CTG GGT G

2.3. METODE DE LUCRU

2.3.1. Metode de lucru aplicate în experiențele cu material biologic produs *in vivo*

2.3.1.1. Extracția de ADN în vederea executării analizelor RAPD

Metodele de izolare a ADN-ului au ca şi criterii de bază puritatea, integritatea şi cantitatea de ADN obținută.

S-a demonstrat că puritatea ADN-ului este unul dintre cei mai importanți factori în reproductibilitatea metodei RAPD. Utilizarea matriței de ADN cu o puritate mare asigură reproductibilitate prin metoda RAPD. Amprentele RAPD vor fi identice în repetiții numai dacă ADN-ul are o calitate adecvată.

Multe din aceste metode urmăresc eliminarea polifenolilor şi a polizaharidelor care determină izolarea unor extracte de ADN cu o culoare brună, inaccesibile enzimelor de restricție.

Extracția ADN-ului la vița de vie este dificilă datorită prezenței polifenolilor şi a poliglucidelor în cantitate mare. De aceea, în experiențele noastre s-a încercat optimizarea unui protocol de extracție a ADN-ului prin care să se obțină o puritate cât mai mare.

In acest sens, a fost adăugat în tamponul de extracție polivinilpirolidona (PVP), mercaptoetanol, acid ascorbic şi acidul dietilditiocarbamic (DIECA).

De asemenea, prin adăugarea soluției apoase de clorură de sodiu (NaCl) 5M şi etanol s-a mărit solubilitatea polizaharidelor, împiedicând totodată şi precipitarea concomitentă a polizaharidelor cu ADN-ul.

Pentru a obține un ADN de calitate care să poate fi utilizat în tehnica RAPD au fost testate trei metode de izolare:

Protocolul A descris de ROGER şi colab. 1988

Protocolul B – descris de ROGER şi colab., 1988 modificat

Protocolul C – descris de LODHI şi colab., 1994, modificat (POP şi colab., 2003).

Protocol A extracţie ADN după ROGER şi colab., 1988

Soluţii necesare pentru izolarea ADN-ului:

- *2 x CTAB 2% - 100 ml*

  2 % CTAB
  100 mM Tris HCl
  20 mM EDTA
  1,4 M NaCl
  1% PVP

- *Soluţie salină CTAB 5% - 100 ml*

  5% CTAB
  0,7 M NaCl

- *Tampon TE salin 100 ml*

  10 mM Tris pH8
  1 mM EDTA pH 8
  1 M NaCl

- *Tampon 0,1 x TE 100 ml*

  1,0 mM Tris pH 8
  0,1 mM EDTA pH 8

- *Cloroform : alcool izoamilic*

  24 : 1 - 100 ml

- *Alcool etilic 95% - 100 ml*
- *Alcool etilic 80% - 100 ml*
- *RNA-ază 1 mg/1 ml*

Izolarea ADN-ului s-a realizat din 500 mg ţesut foliar, mojarat în azot lichid. Etapele de extracţie a ADN-ului au fost:

♦ Materialul biologic se mojarează în azot lichid. Mojarul se răceşte în prealabil cu azot lichid.

♦ Se adaugă 700 µl tampon de extracţie (2 x CTAB) încălzit la temperatura de 65^0C şi se continuă încălzirea într-o baie marină la această temperatură încă 1-5 minute.

♦ PVP-ul se adaugă în tamponul de extracţie doar în momentul folosirii.

♦ Se transferă circa 100 mg din pudră (fără a o lăsa să se topească) într-un tub Eppendorf de 1,5 ml.

♦ Se adaugă 700 µl cloroform : alcool izoamilic (24:1) şi se agită uşor.

♦ Se centrifughează 5 minute la 11.000 rotaţii/minut.

♦ Se transferă faza apoasă de la suprafaţă într-un nou tub Eppendorf. Se îndepărtează faza cu cloroform de la bază.

♦ Se adaugă 1/10 din volum soluţie 5% CTAB (sau 1/5 din volumul soluţie) şi se amestecă prin inversare.

♦ Se realizează o nouă extracţie cloroform alcool izoamilic (24:1) repetând paşii de la punctele 4-6.

♦ Se adăugă tampon de precipitare, în volum egal şi se amestecă uşor. Tuburile se pun în ghiaţă sau la frigider (2-4^{0}C) pentru 5-30 de minute.

♦ Se centrifughează 10-60 secunde la 10.000 rotaţii/minut. Se îndepărtează supernatantul.

♦ Se rehidratează pellet-ul în tampon TE salin.

♦ Se adăugă două volume de alcool etilic 95% rece (-20^{0}C) şi se amestecă uşor.

♦ Se centrifughează 15 minute la 10.000 rotaţii/minut. Se îndepărtează supernatantul.

♦ Se adăugă alcool etilic 80% până la volumul original şi se centrifughează 5 minute la 10000 rotaţii/minut. Se îndepărtează supernatantul.

♦ Se aşteaptă până la evaporarea completă a lichidului.

♦ Se rehidratează pellet-ul în soluţie tampon 0,1 TE.

♦ Se tratează cu RNA-ază 1 µl /100 µl ADN la 37^{0}C, o oră pentru eliminarea ARN-ului.

♦ Materialul se poate păstra în congelator la –20^{0}C sau –70^{0}C.

Protocol B extracţie ADN după ROGER S.O. şi colab., 1988, modificat

Soluţii necesare pentru izolarea ADN-ului:

2 x CTAB 2% - 100 ml

2 % CTAB
100 mM Tris HCl
20 mM EDTA
1,4 M NaCl
2% PVP
2% mercaptoetanol

Tampon 0,1 x TE - 100 ml

1 mM Tris pH 8

0,1 mM EDTA pH 8

Soluţie salină CTAB 5% - 100 ml

5% CTAB
0,7 M NaCl

Tampon TE salin - 100 ml

10 mM Tris pH 8
1 mM EDTA pH 8
1 M NaCl

Cloroform : alcool izoamilic 24 :1- 100 ml

Alcool etilic 95% - 100 ml
RNA-ază 1 mg/1ml

În cazul acestui protocol, în tamponul de extracţie s-a adăugat o cantitate mai

mare de PVP, respectiv 2% şi 2% mercaptoetanol.

Etapele de extracție au fost aceleaşi ca şi în cazul protocolului A.

Protocol C extracție ADN după LODHI şi colab., 1994 modificat

Soluții necesare pentru izolarea ADN-ului:

- *2 x CTAB 2% - 100 ml*

  2 % CTAB
  100 mM Tris HCl
  20 mM EDTA
  1,4 M NaCl
  2% PVP
  10 mM acid ascorbic
  4 mM DIECA

- *Tampon TE 100 ml*

  10 mM Tris HCl pH 8
  1 mM EDTA phH 8

- *Tampon de precipitare - 100 ml*

  5 M NaCl

- *Cloroform : alcool izoamilic 24 : 1*

  100 ml

- *Alcool etilic 95% - 100 ml*

- *Alcool etilic 80 % - 100 ml*
- *RNA-ază 1 mg/1 ml*

Pentru obținerea extractului de ADN s-au parcurs următoarele etape:

♦ Se mojarează 0,5 g material biologic în azot lichid până se obține o pulbere.

Este important ca prin mojarare să nu se obțină o pulbere foarte fină.

♦ În tuburile Eppendorf se pipetează câte 700 µl tampon de extracție. În momentul utilizării în tamponul de extracție se adaugă PVP, acid ascorbic şi DIECA. Se transferă circa 100 mg din pudra obținută prin mojarare şi se amestecă cu grijă, prin inversarea tuburilor Eppendorf.

♦ Se incubează tuburile pentru 25 de minute la temperatura de 65^0C şi apoi se lasă să se răcească la temperatura camerei.

♦ Se adaugă 700 µl cloroform : alcool izoamilic şi se omogenizează bine prin inversarea tuburilor de 20-25 ori pentru obținerea unei emulsii.

♦ Se centrifughează pentru 15 minute la 11.000 rotații/minut la temperatura camerei.

♦ Se transferă faza apoasă într-un nou tub eppendorf.

♦ Pentru o extracţie mai bună, respectiv pentru asigurarea unei purităţi superioare a soluţiei de ADN se repetă paşii 5-6-7.

♦ Se adaugă 0,5 volume soluţie apoasă de NaCl 5 M şi se omogenizează bine.

♦ Se adaugă două volume de alcool etilic 95% rece (-20^{0}C) şi se păstrează tuburile la frigider 15-30 de minute (4-6^{0}C). Soluţia poate fi ţinută la frigider o oră sau mai mult, dacă este necesar.

♦ Se centrifughează 3 minute la 3000 rotaţii/minut apoi se creşte turaţia la 11.000 rot/minut pentru 5 minute, la temperatura camerei. Această diferenţă de centrifugare ajută la sedimentarea ADN-ului în tubul de centrifugare.

♦ Se îndepărtează supernatantul.

♦ Se adaugă 700 µl alcool etilic 80% rece (0-4^{0}C), pentru spălarea pellet-ului. Se centrifughează 5 minute la 10.000 rotaţii/minut.

♦ Se îndepărtează supernatantul. Se aşteaptă până la evaporarea completă a alcoolului etilic , circa 20-30 de minute.

♦ Se rehidratează pellet-ul în soluţie de TE – 50 µl/tub.

♦ Se tratează cu 1 µl RNA-ază/100 µl ADN soluţie şi se incubează la 37^{0}C timp de 15 minute.

ADN-ul se păstrează în soluţie TE (Tris – EDTA) sau în apă sterilă deionizată. Probele de ADN se pot păstra pe o perioadă mare de timp în frigider sau congelator. Dacă se are în vedere menţinerea probelor pentru o perioadă mai scurtă de timp se recomandă păstrarea la temperatura de –20^{0}C, iar pentru o perioadă îndelungată de timp (luni sau ani) se recomandă temperatura de –70^{0}C.

In cazul protocolului C, modificarea a constat în adăugarea, în tamponul de extracţie, a următoarelor componente: 2% polivinilpirolidonă (PVP), 10 mM acid ascorbic şi 4 mM acid dietilditiocarbamic (DIECA). Aceste substanţe au fost adăugate înainte de utilizare.

Soluţiile necesare pentru extracţia ADN-ului au fost preparate în soluţii stoc (100 ml) şi păstrate în frigider sau la temperatura camerei (Vezi anexa 1).

2.3.1.2. Cuantificarea ADN-ului

După extracția ADN-ului, probele au fost cuantificate spectofotometric cu ajutorul aparatului BioPhotometer Eppendorf.

Metoda spectofotometrică se bazează pe faptul că majoritatea substanțelor biologice au o rată de absorbție caracteristică în domeniul radiațiilor ultraviolete. Astfel, rata de absorbție de 260 nm corespunde acizilor nucleici, cea de 280 nm proteinelor, iar 230 nm diferiților contaminanți.

Densitatea optică a fost măsurată la rata de absorbție A 260 nm şi A 280 nm, făcând raportul dintre cele două rate de absorbție.

ADN-ul este considerat suficient de pur, dacă raportul celor două citiri, respectiv A_{260}/A_{280}, are valori cuprinse între 1,7 şi 2,0. Valorile mai mici de 1,7 indică impurificări cu proteine, iar cele mai mari de 2,0 impurificări cu alți contaminanți.

Aparatul BioPhotometer Eppendorf redă atât concentrația ADN-ului, cât şi cantitatea de ADN exprimată în ng/µl sau µg/ml. Legea lui Beer-Lambert arată că există o relație de liniaritate între concentrația unui compus şi absorbanța sa la o anumită lungime de undă. Pe acest fapt se bazează calcularea concentrației de ADN, dar se fac şi aprecieri asupra purității ADN-ului în raport cu proteinele.

Intre cele trei metode de extracție a ADN-ului au rezultate diferențe atât în ceea ce priveşte puritatea ADN-ului cât şi cantitatea acestuia (tabelul nr. 4 şi 8).

Datele obținute au fost interpretate prin analiza varianței, testul comparațiilor multiple.

2.3.1.3. Protocol de amplificare RAPD

Concentrația ADN matriță trebuie să fie, în general, cuprinsă între 5-500 ng/50 µl volum de reacție, cu un optim între 10-50 ng/50 µl volum de reacție. Pentru obținerea soluției de ADN de lucru cu această concentrație, ADN-ul a fost diluat cu TE (Tris HCl – EDTA).

Componența reacției PCR

Amestecul de reacție RAPD a avut un volum de 25 µl/tub eppendorf, cu următoarea compoziție:

- 50 ng ADN
- 200 µM amestec dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
- 0,2 µM primer
- 2,5 mM $MgCl_2$
- 2,5 mM 10 x buffer
- 1 U Taq DNA Polymerase (Promega)
- 2% PVP (Sigma)
- apă bidistilată sterilă

Prepararea amestecului de reacție s-a realizat în hota cu flux laminar, în condiții sterile. Proba martor (control) conține toate componentele amestecului de reacție cu excepția ADN-ului.

Amplificarea probelor s-a realizat în aparatul Eppendorf Mastercycler gradient programat astfel:

- 3 minute la 95^0C – predenaturare, urmată de 45 de cicluri cu următorul profil de temperatură :
    1. 1 minut la 93^0C – denaturare
    2. 1 minut la 34^0C – fixarea primerilor
    3. 1 minut la 72^0C – extensie
    4. extensia finală 10 minute la 72^0C.

Temperatura de denaturare desface legăturile de hidrogen şi separă cele două catene de ADN, conferindu-le rol de matrițe.

Temperatura de hibridare, respectiv de fixare a primerilor, permite amorselor să se ataşeze la secvențele lor omoloage de pe matriță.

Temperatura de extensie, asigură funcționarea optimă a Taq polimerazei, respectiv sinteza ADN-ului.

Pentru amplificare s-au utilizat 39 de primeri decanucleotidici, un primer având 21 de nucleotide (tabelul 3). Primerii au fost utilizați pentru amplificarea soiurilor

provenite de la toate cele cinci stațiuni viticole. Primerii care au dat polimorfism au fost utilizați apoi şi pentru compararea aceloraşi soiuri, dar care au provenit din stațiuni viticole diferite.

2.3.1.4. Electroforeza în gel de agaroză

2.3.1.4.1. Prepararea gelurilor de agaroză şi a probelor de ADN

Ca metodă standard de separe, identificare şi purificare a fragmentelor de ADN se utilizează electroforeza în gel de agaroză şi poliacrilamidă. Gelurile de agaroză au o putere de rezoluție mai mică decât cele de poliacrilamidă, dar au o gamă mult mai largă de separare: fragmente de la 200 pb până la aproximativ 50 Kb, în funcție de concentrația de agaroză.

Prepararea gelurilor a constat în topirea agarozei în cuptorul cu microunde, în tampon de electroforeză Tris-borat 0,5 x (TBE) şi turnarea acestora, după răcire la circa 55^0C, în cuva de electroforeză. Migrarea gelurilor s-a realizat în cuva de electroforeză orizontală, în tamponul Tris-borat 0,5x (TBE). Pentru obținerea gelurilor s-a utilizat agaroza (Sigma) în concentrație de 1,4%. Amplificarea probelor s-a făcut în trei repetiții pentru fiecare primer analizat.

Cantitatea maximă de ADN, care poate fi încărcată într-un godeu, depinde de numărul de fragmente şi de mărimea lor. Cantitatea minimă de ADN care poate fi detectată prin fotografiere, într-un gel colorat cu bromură de etidiu, este de 2 ng, într-o bandă lată de 5 mm. Dacă o asemenea bandă conține mai mult de 500 ng, de ADN, înseamnă că godeul a fost supraîncărcat, din care cauză rezultă formarea unei benzi continue, fără individualizare de-a lungul gelului (smearing, trailing). Când sunt analizate relativ puține fragmente de lungimi diferite în aceeaşi probă, este recomandată încărcarea cu 100-500 ng ADN într-un godeu cu lățimea de 5 mm. Dacă sunt analizate un număr mare de fragmente, cu lungimi diferite, este posibilă încărcarea cu o cantitate mult mai mare de ADN, de 20-30 µg/godeu. Volumul maxim de încărcare este determinat de volumul godeului (de exemplu 5 mm x 5 mm x 1,5 mm) adică aproximativ 37,5 µl (DORDEA şi colab., 2000).

Probele de ADN amplificate au fost preparate în tampon de încărcare colorat cu albastru de bromfenol. În fiecare tub eppendorf s-a adăugat câte 5 µg de colorant. În fiecare godeu al gelului s-au pipetat câte 12 µl din produsul de amplificare. Primul godeu a fost încărcat cu 12 µl marker ADN standard (100 pb DNA Step Ladder, Promega).

2.3.1.4.2. Migrarea electroforetică

Electroforeza este un fenomen fizico-chimic de deplasare a particulelor purtătoare de sarcini electrice sub influența unui câmp electric. Într-un câmp electric uniform generat de doi electrozi, particulele încărcate electric se deplasează înspre electrozii de sarcină electrică opusă. In condiții standardizate ale mediului de migrare şi ale câmpului electric, mobilitatea electroforetică depinde în mod esențial de mărimea şi forma moleculelor. Particulele de mărime mai mică se deplasează mai repede decât cele de mărime mai mare.

Sursa de putere a fost programată la 0,57 V, respectiv 0,56 mA, iar durata de migrare a fost de 2 ore şi 30 minute.

Sursa de putere asigură curent continuu la bornele sale. Păstrarea constantă a tensiunii şi intensității curentului electric, de-a lungul întregului proces, este esențială pentru o electroforeză corectă.

In timpul migrării, bromura de etidiu migrează spre catod, în sens opus față de ADN. Dacă migrarea durează foarte mult, o cantitate semnificativă de bromură de etidiu este îndepărtată din gel, făcând dificilă vizualizarea benzilor sărace în ADN. Timpul de migrare este mărit în prezența EtBr, deoarece mobilitatea ADN-ului dublu catenar liniar este micşorată cu circa 15% față de ADN-ul fără molecule de EtBr intercalate.

Pentru a nu contamina cuva de electroforeză cu bromură de etidiu, gelurile au fost colorate după migrare. În plus, există şi părerea că benzile formate în absența bromurii de etidiu (EtBr) sunt mai precise. De aceea se preferă colorarea ulterioară a gelurilor, deşi această procedură prezintă dezavantajul că benzile nu pot fi urmărite în diferite stadii în cursul migrării (prin oprirea migrării şi examinarea în UV).

In experiențele noastre, după separare, gelul a fost imersat în 150 ml 0,5x TBE

la care s-a adăugat o soluție de bromură de etidiu 0,5 µg/ml. În această soluție gelul a fost menținut pe o platformă agitatoare, timp de 30 de minute.

2.3.1.5. Preluarea imaginilor

Bromura de etidiu îşi pierde relativ repede fluorescența în UV, astfel că gelurile colorate cu acest colorant nu se pot păstra, fotografierea gelului, expus la UV făcându-se imediat după migrare.

Vizualizarea produşilor de amplificare s-a realizat în lumină UV, imaginea gelurilor fiind achiziționată cu o cameră video Alpha Innotech.

Preluarea imaginilor s-a realizat cu ajutorul programului Alfa Imager.

2.3.1.6. Analiza imaginilor

In analiza statistică s-au inclus doar benzile cu o intensitate luminoasă mare. Benzile au fost detectate automat cu ajutorul programului Total Lab TL 100. Acest program stabileşte mărimea fragmentelor de ADN prin compararea acestora cu un ADN standard (Ladder ADN 100 pb). ADN-ul standard utilizat constă din 40 de fragmente cuprinse între 100 şi 4000 pb.

In urma comparării cu ADN-ul standard s-a putut stabili mărimea fiecărui fragment amplificat. Prezența benzii cu aceeaşi mărime a fost notată cu 1, iar absența ei din cultivarele analizate s-a notat cu 0. Analiza gelurilor s-a făcut cu ajutorul programului Total Lab TL 100, obținându-se matricea binară.

Matricea binară s-a utilizat apoi pentru calcularea distanțelor genetice. Pentru calcularea distanțelor genetice şi realizarea dendrogramei s-a utilizat programul RAPDistance 1.04, utilizând coeficientul Jaccarrd pentru distanțele genetice, respectiv metoda Neighbor Joining Tree pentru dendrogramă.

Formula utilizată pentru calculul coeficientului Jaccard (J_{ij}) este următoarea:

$$J_{ij} = C_{ij} / (n_i + n_j - C_{ij}$$

unde:

C_{ij} - reprezintă numărul de benzi identice prezente la cele două genotipuri;

n_j - reprezintă numărul total de benzi identificate la genotipul i şi respectiv j.

Distanţele genetice calculate cu ajutorul coeficientului lui Jaccard au fost analizate pentru realizarea dendrogramei prin metoda "Neighbor – Joining". Prezentarea grafică a dendrogramei s-a realizat cu pachetul de programe RAPDistance 1.04.

2.3.2. Metode de lucru aplicate în experienţele cu material biologic produs *in vitro*

2.3.2.1. Metodele de multiplicare in vitro utilizate în experienţe

Înmulţirea asexuată *in vitro* se poate realiza prin mai multe procedee:

- inducerea şi accelerarea proliferării mugurilor axilari sau lăstărirea axilară multiplă;
- inducerea formării mugurilor adventivi;
- inducerea diferenţierii embrionilor somatici identici cu cei zigotici;
- inducerea formării organelor de rezervă – bulbi, bulbili, microtuberculi etc.

Alegerea unei metode de micropropagare are în vedere anumiţi factori cum ar fi:

- rata multiplicării şi posibilităţile de menţinere a acesteia la un anumit nivel;
- diferenţele genotipice;
- posibilitatea obţinerii unor variante sau mutante.

Pentru iniţierea culturilor *in vitro*, la cele 10 cultivare de *Vitis vinifera*, în experienţele noastre s-a utilizat sistemul de multiplicare prin lăstărire axilară.

2.3.2.2. Multiplicarea prin lăstărire axilară

Prin acest sistem de micropropagare se poate asigura o mare uniformitate genetică a descendenţilor, deoarece lipseşte faza de calus. Se consideră că fiecare

lăstar este o potențială plantă, fapt ce poate asigura o rată de multiplicare foarte mare care poate fi menținută la un nivel constant pe parcursul unui număr mare de pasaje. Literatura de specialitate arată că rata de multiplicare poate ajunge la 10^4 - 10^8/ an.

Multiplicarea prin lăstărire axială suprimă dominanța apicală, ceea ce va determina funcționarea meristemelor mugurilor care sunt formați pe plantă în alte poziții decât apicală.

Ca şi tipuri de explante se pot utiliza vârfurile de lăstari, meristeme, muguri terminali sau axilari, apexuri de lăstari, noduri sau inflorescențe.

Etapele multiplicării prin lăstărire sunt:

- Inițierea culturii pornind de la diferite tipuri de explante.
- Stimularea reactivării meristemelor şi formarea lăstarilor, în acest scop fiind necesară alegerea unui mediu adecvat, cel mai adesea cu o concentrație mică de citochinine.
- Utilizarea neoplantulelor ca sursă de explante, de la acestea prelevându-se nodurile şi apexurile care vor constitui noi lăstari.
- Inducerea lăstăririi axilare multiple şi formarea de tufe de lăstari, fenomen ce poate fi obținut prin utilizarea unui mediu bogat în citochinine.
- Multiplicarea prin divizarea tufelor de lăstari.
- Înrădăcinarea lăstarilor *in vitro* şi aclimatizarea plantelor obținute. În cazul în care lăstărirea este foarte intensă se poate provoca alungirea lăstarilor înainte de înrădăcinare.

Cultura *in vitro*, la toate soiurile de viță de vie studiate, a fost inițiată din segmente nodale, cu cel puțin un mugure axilar, detaşate de pe lăstarii recoltați din câmp.

2.3.2.3. Cultura de calus

Utilizarea altor tipuri de explante decât meristemul, în scopul regenerării de neoplantule, necesită parcurgerea obligatorie a unui stadiu de cultură de calus.

Calusul este o masă neorganizată, informă, de celule parenchimatice proliferate care, prin cultivare, formează focare de celule meristematice, elemente de sisteme conducătoare, celule pigmentate etc.

Pentru obținerea de calus este nevoie de un mediu agarizat care să susțină masa celulară, în creştere. Periodic, calusul trebuie fragmentat şi subcultivat pentru a nu intra în senescență. Formarea calusului poate fi indusă şi acesta proliferează, în special pe medii de cultură cu 2,4-D. De asemenea, şi alți regulatori de creştere, fie auxine, fie citochinine aflați în concentrații mari în mediul de cultură, pot genera calus.

Operațiunile care trebuie efectuate în scopul obținerii de calus sunt (CACHIȚĂ, 1984):

- alegerea materialului vegetal, din care se va executa prelevarea explantelor, acesta putând fi reprezentat de: semințe, embrioni, rădăcini, țesut de rezervă, frunze, ramuri, antere, ovare etc.;
- prepararea mediilor de cultură şi alegerea tipului de mediu adecvat;
- sterilizarea vaselor şi a mediilor de cultură;
- pregătirea materialului vegetal în vederea dimensionării explantelor;
- dimensionarea explantelor;
- inocularea explantelor;
- incubarea inoculilor fie la întuneric, fie la lumină;
- observarea proceselor de formare a calusului şi urmărirea creşterii acestuia;
- repicarea periodică şi transferarea fragmentelor de calus pe medii proaspete, de obicei la circa 4-6 săptămâni;
- urmărirea proceselor de organogeneză sau embriogeneză.

2.3.2.4. Multiplicarea prin muguri sau lăstari adventivi

Prin acest sistem de micropropagare se induce indirect, în calusuri, sau direct pe explante formarea mugurilor. Se consideră că fiecare mugure poate fi o potențială plantă nouă. Acest tip de multiplicare a fost utilizat în experiențele noastre de propagare *in vitro* a regeneranților şi în cele de formare a calusului şi subcultivarea repetată a acestuia.

Ca şi tip de explante se utilizează frunze, tulpini sau calusul.

Etapele multiplicării prin inducerea formării lăstarilor adventivi sunt:

- inițierea culturii folosind fragmente de organe, țesuturi, protoplaşti, polen;
- inducerea formării mugurilor adventivi din celulele explantului, utilizând un mediu de cultură adecvat;
- creşterea lăstarilor obținuți din muguri fie pe acelaşi tip de mediu fie pe un mediu diferit pentru a stimula alungirea;
- formarea calusului primar prin inducerea diviziunii şi dediferențierea celulelor explantului inițial;
- subcultivarea calusului pe un mediu de creştere;
- regenerarea plantelor prin transferul calusului pe un mediu de inducere a organogenezei, menținerea calusului pe medii făcându-se prin pasări succesive;
- înrădăcinarea lăstarilor *in vitro* prin utilizarea unui mediu bogat în auxine sau un mediu fără hormoni.

Acest sistem de multiplicare poate duce la obținerea unor variații genetice sau epigenetice. Metoda este indicată în cazul speciilor la care stabilitatea genotipică nu este obligatorie sau atunci când ea poate fi evaluată în stadiul de plantulă. În cazul în care obiectivul principal îl reprezintă menținerea stabilității genetice, acest sistem de multiplicare este contraindicat.

Pentru a obține plante care pot prezenta variații genetice sau epigenetice este necesară creşterea numărului de subcultivări şi monitorizarea concentrației regulatorilor de creştere, regenerarea indirectă din calus şi a păstrării variațiilor identificate.

2.3.2.5. Sterilizarea materialului biologic, a recipientelor şi mediilor de cultură utilizate în experiențele in vitro

Materialul biologic donator de explante a fost constituit din lăstari tineri proveniți de la zece soiuri de viță de vie, recoltați din cinci stațiuni viticole din țară.

Pentru inițierea culturii *in vitro* s-au folosit lăstari de viță de vie recoltați direct din câmp de la care s-au prelevat apoi segmente nodale.

Lăstarii de viță de vie au fost fasonați în fragmente cu dimensiuni cuprinse între 6-8 cm după ce în prealabil au fost îndepărtate frunzele.

Aceste fragmente nodale au fost sterilizate cu o soluție de hipoclorit de sodiu (NaOCl) 5%, la care s-au adăugat câteva picături de Tween-20. Fragmentele nodale au fost menținute în soluția dezinfectantă timp de 20 minute cu agitare periodică.

Pentru a evita acțiunea remanentă a agentului de dezinfectare, segmentele nodale au fost imersate în apă distilată sterilă, unde au fost menținute timp de cinci minute, după care au urmat trei spălări repetate cu apă distilată sterilă.

Pentru a preîntâmpina apariția infecțiilor, sticlăria utilizată, respectiv eprubetele şi borcanele pentru inoculare, diverse recipiente au fost sterilizate înainte de introducerea mediului de cultură. Sterilizarea s-a realizat prin autoclavare la 134^0C, timp de 15 minute.

Toate mediile de cultură utilizate au fost sterilizate prin autoclavare, la 121^0C, timp de 20 de minute. De asemenea, toate operațiile de prelevare, inoculare, pasare s-au executat în condiții sterile, în hota cu flux laminar.

2.3.2.6. Organizarea experiențelor realizate în condiții de cultură in vitro

2.3.2.6.1. Multiplicarea prin lăstărire axilară

Pentru studierea capacității regenerative la viță de vie, au fost utilizate ca sursă de explante segmentele nodale provenite de pe lăstarii recoltați din câmp.

Segmentele nodale au fost sterilizate, apoi fasonate la dimensiunea de 0,5 cm şi inoculate pe mediile de cultură.

Sterilizarea şi prelevarea explantelor s-a făcut în hota cu flux laminar. Inocularea explantelor s-a făcut în eprubete.

Mediul pentru inițierea culturii *in vitro* a fost Murashige –Skoog (1962) suplimentat cu concentrații diferite de hormoni, realizând trei variante de medii de cultură:

V_1 = Mediul MS – 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l ANA, 100 mg/l hidrolizat de cazeină

V_2 = Mediul MS - 1,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l ANA, 100 mg/l hidrolizat de cazeină

V_3 = Mediul MS – 2,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l ANA, 100 mg/l hidrolizat de cazeină

Mediul bazal MS a fost suplimentat cu zaharoză 30 g/l şi agar 7,5 g/l pentru toate cele trei variante de concentrații hormonale. pH-ul mediului a fost ajustat la 5,8, înainte de adăugarea agarului. Mediul a fost repartizat în eprubete care apoi au fost sterilizate prin autoclavare la 121^0C timp de 15 minute.

După inoculare, explantele au fost menținute în camera de creştere la o fotoperioadă de 16/8 ore, intensitate luminoasă de 2500 lucşi şi la o temperatură de $22\text{-}24^0$C.

După primele trei zile de la inoculare s-au îndepărtat eprubetele cu explante infestate sau necrozate.

Evaluarea *in vitro* a culturii de segmente nodale a fost efectuată la 8 săptămâni de la incubare şi a constat în determinarea următorilor parametri: numărul de lăstari formați, lungimea lăstarilor, şi numărul de noduri/lăstar.

In continuare plantulele obținute *in vitro* pe varianta V_3 de mediu au fost divizate şi repicate periodic (la circa opt săptămâni) pe acelaşi tip de mediu. Inocularea explantelor s-a făcut în borcane. În fiecare borcan au fost inoculate 4-5 explante.

2.3.2.6.2. Cultura de calus

Cultura de calus a fost inițiată atât din segmente nodale cât şi din frunze, de la plantulele obținute *in vitro* pe mediul de cultură MS (1962), varianta V_3.

În vederea inițierii culturii de calus, segmentele nodale au fost cultivate pe mediul bazal MS (Murashige –Skoog, 1962), suplimentat cu acid naftil acetic (ANA) în două concentrații:

- MS_1 - cu 10 mg/l ANA şi 1,0 mg/l BAP
- MS_2 – cu 5,0 mg/l ANA şi 1,0 mg/l BAP

Ambele variante de mediu au fost suplimentate cu zaharoză 20 g/l şi agargel (Sigma) 7,5 g/l.

pH-ul mediului a fost ajustat la 5,8, înainte de adăugarea agarului.

Frunzele au fost detaşate de pe plantulele obţinute *in vitro*. Acestea au fost secţionate perpendicular pe axa nervurii principale şi plasate în vasele de cultură cu partea inferioară a frunzei în contact cu mediul de cultură. Inocularea explantelor s-a făcut în eprubete.

La şase săptămâni calusul a fost subcultivat pe mediu proaspăt în vase de cultură mai mari, respectiv în borcane autoclavabile.

Culturile au fost incubate în aceleaşi condiţii experimentale ca şi pentru etapa de iniţiere a culturii *in vitro*.

Menţinerea calusului în cultură, respectiv multiplicarea acestuia cu menţinerea celulelor viabile şi totipotente, necesită transferarea şi subcultivarea pe medii proaspete. Astfel, periodic, la interval de circa patru săptămâni, calusul a fost fragmentat şi subcultivat pe medii proaspete. Fragmentarea calusului constă în divizarea inoculului şi înlăturarea părţilor necrozate sau senescente.

Pentru a testa creşterea calusului şi menţinerea lui în cultura *in vitro*, a fost iniţiat un nou experiment care a constat din pasarea calusului pe trei variante de medii:

- MS – fără regulatori de creştere, dar suplimentat cu 100 mg/l hidrolizat de cazeină;
- MS – suplimentat cu 1,0 mg/l ANA, 1,5 mg/l TDZ, 100 mg/l hidrolizat de cazeină;
- MS – suplimentat cu 2,5 mg/l BAP, 1,0 mg/l ANA, 100 mg/l hidrolizat de cazeină.

Mediul cel mai favorabil a fost utilizat în continuare pentru subcultivarea calusului şi menţinerea lui în cultură *in vitro*.

2.3.2.6.3. Inducerea şi dezvoltarea lăstarilor multipli

Pentru inducerea formării lăstarilor multipli, calusul morfogenetic obţinut din segmentele nodale a fost transferat pe mediul MS suplimentat cu concentraţii variate de TDZ - thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3,-thidiazol-5-yl urea) în combinaţie cu acidul alfa naftil acetic, în concentraţie de 0,5 mg/l. Concentraţia de zaharoză a fost de 3%.

Cele trei variante de mediu au fost:

MS – TDZ – 0,5 mg/l TDZ, 0,5 mg/l ANA

MS – TDZ – 1,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l ANA

MS – TDZ – 2,0 mg/l TDZ, 0,5 mg/l ANA

Din masa de calus obținută pe mediul MS suplimentat cu ANA în concentrație de 10 mg/l s-a prelevat calusul care prezenta caracteristici embriogene. Fragmentele de calus detaşate au fost inoculate în borcane conținând cele trei variante de mediu. În fiecare borcan s-au inoculat câte patru fragmente de masă calusală. Apariția primilor lăstari a fost observată după circa 14 zile. Efectul variantelor de mediu, ilustrat prin media numărului de lăstari şi media lungimii lăstarilor formați, a fost calculat la 45-50 de zile. Experimentul a fost realizat în trei repetiții, măsurătorile fiind executate pe câte 30 de explante/repetiție.

Pe un fragment de calus s-au regenerat mai mulți lăstari care au fost separați şi fragmentați, urmând să fie subcultivați pe medii proaspete. Regeneranții obținuți *în vitro* au fost pasați pe mediul MS suplimentat cu TDZ 0,5 mg/l. Pe acest mediu s-a format un număr mare de lăstari scurți, cu frunze mici, cu aspect de tufă. Neoplantulele formate au fost pasate periodic, la interval de 8 săptămâni, pe mediu proaspăt. În general, lăstăraşii neoformați la nivelul calusurilor au un aspect diferit de acela al tulpinițelor formate din meristeme, fapt constat şi de alți autori (CACHIȚĂ, 1984).

TDZ - thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3,-thidiazol-5-yl urea) este un derivat al difenilureei. TDZ, fenilurea, este considerată ca fiind una dintre cele mai active citochinine pentru inducerea lăstarilor în culturile de țesuturi (HUETTEMAN şi colab., 1993; MURTHY şi colab., 1999). Activitatea acestei citochinine a fost raportată în anul 1982, de atunci dovedindu-se foarte eficientă în stimularea multiplicării şi proliferării lăstarilor axilari sau pentru formarea mugurilor adventivi.

S-a constatat că TDZ induce regenerarea de lăstari la diferite explante provenite de la specii recalcitrante, cum ar fi cele medicinale şi lemnoase. De asemenea, mulți autori sugerează că TDZ are rezultate mai bune în regenerarea lăstarilor decât alte citochinine. Morfogeneza indusă de TDZ probabil depinde de nivelul endogen al regulatorilor de creştere şi poate avea capacitatea de a modula nivelul endogen de auxină. Combinația sinergetică a auxinei şi citochininei promovează regenerarea

lăstarilor (GŰREL şi colab., 2001; KHAWAR şi colab., 2004; YOUMBI şi colab., 2006).

2.3.2.6.4. Extracţia ADN-ului

De la plantulele regenerate din calus s-au detaşat frunzulițe care apoi au fost supuse extracţiei de ADN.

Extracţia de ADN s-a făcut din frunzele neoplantulelor obţinute după a 5-a, a 10-a şi a 15-a pasare pe medii noi de cultură. De la fiecare cultivar s-au analizat câte zece somaclone. Notarea somaclonelor de la fiecare soi este prezentată în tabelul 4.

Extracţia ADN-ului s-a făcut, în toate cazurile, aplicând protocolul lui LODHI şi colab., 1994 modificat de noi (POP şi colab., 2003), protocol care a dat cele mai bune rezultate şi în cazul extracţie ADN-ului de la plantele *in vivo*. Protocolul de lucru şi materialele necesare au fost prezentate în capitolul anterior (subcapitolul 2.3.1.).

2.3.2.6.5. Cuantificarea, amplificarea ADN-ului şi electroforeza în gel de agaroză

Ca şi în cazul altor metode bazate pe tehnica PCR, metoda RAPD necesită menţinerea constantă a condiţiilor de reacţie (profilul de temperatură al termocyclerului, temperatura de fixare a primerilor, concentraţia polimerazei, concentraţia primerilor, matriţa de ADN etc.). Uneori, pentru mărirea specificităţii şi eficienţei reacţiei în amestecul de reacţie se poate adăuga DMSO, Tween, BSA sau gelatină.

Având în vedere aceste considerente probele de ADN obţinute din regeneranţii *in vitro* au fost cuantificate spectofotometric cu acelaşi aparat folosit şi pentru probele *in vivo*, respectiv BioPhotometer Eppendorf.

De asemenea, pentru amplificare s-a păstrat acelaşi volum de reacţie, respectiv de 25 µl/tub eppendorf şi aceeaşi compoziţie ca şi în cazul probelor obţinute la materialul *in vivo*. Pentru amplificarea probelor s-a utilizat tot aparatul Eppendorf Mastercycler gradient.

Gelurile pentru electroforeză a fost de asemenea preparate ca şi în cazul precedent în soluție de 0,5 TBE cu concentrația de 1,4%.

Vizualizarea produşilor de amplificare s-a realizat în lumină UV, imaginea gelurilor fiind achiziționată cu sistemul Biospectrum AC Imaging (UPV Inc.).

2.3.3. Metode statistice de calcul şi interpretare a rezultatelor

In cazul experiențelor efectuate cu material biologic provenit *in vivo* valorificarea rezultatelor experimentale s-a făcut prin analiza varianței, modelul variabilității trifactoriale. Aceste modele trifactoriale au fost utilizate pentru rezultatele privind puritatea şi cantitatea de ADN. Au fost redate tabelele varianței, cu proba F, iar interpretarea rezultatelor s-a făcut prin testul comparațiilor multiple (Duncan sau Tuckey), doar pentru factorii şi combinațiile de factori pentru care F calculat a avut valori semnificative pentru P 5%.

Interpretarea gelurilor obținute s-a făcut prin analiza statistică a imaginilor. Mărimea fragmentelor amplificate a fost stabilită cu ajutorul programului Total Lab TL 100, program care a redat şi matricea binară. În cazul gelurilor cu regeneranții obținuți *in vitro*, datele primare obținute cu programul Total Lab TL 100 au fost prelucrate cu programul FreeTree (HAMPL şi colab., 2001). Matricele binare obținute a servit apoi pentru calcularea distanțelor genetice şi realizarea dendrogramelor utilizând programul RAPDistance 1.04 cu aplicarea coeficientului Jaccarrd şi a metodei Neighbor Joining Tree.

Pentru experiențele de micromultiplicare, valorificarea rezultatelor experimentale s-a făcut prin analiza varianței caracteristică modelelor trifactoriale şi bifactoriale. Modelele trifactoriale au fost utilizate în experiențele de micromultiplicare, pentru rezultatele referitoare la numărul de neoplantule obținute, lungimea acestora şi numărul de noduri/neoplantulă. Modelele bifactoriale au fost utilizate în experiențele de calusogeneză şi regenerare ale calusului, obținut de la cele zece soiuri de viță de vie.

În toate cazurile în care au fost implicate experiențele trifactoriale şi bifactoriale au fost redate tabelele varianțelor cu probele F prin care se justifică prezentarea

rezultatelor finale în tabele bilaterale cuprinzând efectele a doi factori şi a interacțiunii dintre aceştia.

Interpretarea rezultatelor s-a făcut prin testul comparațiilor multiple (Duncan sau Tuckey). Semnificația diferențelor dintre efectele factorilor experimentali este realizată prin notarea cu litere majuscule, iar a interacțiunilor dintre factori prin notarea cu litere minuscule.

CAPITOLUL III

REZULTATE ŞI DISCUŢII

3.1. REZULTATE PRIVIND EXTRACŢIA PROBELE DE ADN PROVENITE DIN MATERIALUL BIOLOGIC *IN VIVO*

În cazul viţei de vie, izolarea ADN-ului, şi ulterior, utilizarea acestuia în vederea obţinerii produşilor PCR este foarte dificilă datorită abundenţei polifenolilor, polizaharidelor, a prezenţei ARN-ului şi a altor produşi secundari (ROUT şi colab., 2002). Polifenolii şi alţi compuşi secundari din plante degradează ADN-ul şi, de asemenea, inhibă activitatea Taq polimerazei. Aceşti compuşi însoţesc ADN-ul când are loc liza celulei. Liza celulelor prin mojarare în azot lichid, urmată de incubarea în tamponul de extracţie, determină şi liza organitelor celulare.

La un număr considerabil de specii de plante ADN-ul obţinut are o culoare brună datorită oxidării polifenolilor şi a compuşilor chinonici. Oxidarea puternică degradează ADN-ul şi proteinele. In consecinţă, cantitatea şi puritatea ADN-ului la aceste specii este foarte mică. Chiar şi în prezenţa PVP-ului şi a altor absorbanţi polifenolici în tamponul de extracţie, în concentraţie de 1-4%, fenolii pot să rămână în extractul de ADN, colorându-l. Includerea în tamponul de extracţie a inhibitorilor de fenoloxidază, cum ar fi acidul dietilenditiocarbamic (DIECA) şi a antioxidanţilor (acidul ascorbic sau a mercaptoetanolului) reduce brunificarea extractului.

Având în vedere aceste considerente s-a urmărit obţinerea unui ADN de puritate cât mai mare dar şi a unei cantităţi corespunzătoare pentru a putea fi utilizată apoi în reacţia de amplificare PCR.

Primul protocol de extracţie a ADN-ului folosit de noi a fost după ROGER S.O. şi colab., 1988, protocol care utilizează CTAB-ul (Cetyl trimethylammonium Bromide).

La plante, cantităţile mari de metaboliţi secundari nu pot fi extrase cu fenol sau cloroform şi pot îngreuna considerabil purificarea ADN-ului. De aceea, pe lângă

extracția proteinelor, se procedează la precipitarea ADN-ului şi separarea sa prin centrifugare. CTAB este folosit, la plante, atât pentru liza membranelor celulare cât şi pentru formarea de complexe insolubile, reversibile cu ADN. Aceste complexe sedimentează la centrifugare. Moleculele de CTAB au capacitatea de a forma complexe insolubile cu ADN-ul la concentrații scăzute de săruri (aproximativ 0,5 M NaCl), de a se disocia de ADN şi a resolubiliza la concentrații crescute de săruri. Bazându-se pe aceste proprietăți, metoda permite separarea ADN-ului precipitat cu CTAB prin centrifugare şi îndepărtarea supernatantului, împreună cu marea majoritate a contaminanților. Eficiența metodei este de 100 până la 500 µg ADN izolat/gram de țesut proaspăt, în fragmente de 50 kb sau mai mult (DORDEA şi colab., 2000).

La speciile lemnoase izolarea ADN este foarte dificilă, datorită conținutului ridicat de polifenoli şi polizaharide care contaminează ADN-ul interferând cu analizele ulterioare (CHENG şi colab., 1997).

Un alt aspect important în procesul de izolare a ADN-ului este acela de a elimina polizaharidele, compuşi care determină izolarea de ADN cu o consistență vâscoasă. O modalitate de eliminare a polizaharidelor este acela de a mări concentrația de CTAB în tamponul de izolare (WEISING şi colab., 1995).

Polizaharidele şi polifenolii interferează în reacția în lanț a polimerazei prin inhibarea activității Taq polimerazei. Polifenolii, în formă oxidată, se fixează de ADN prin legături covalente, împiedicând analizele ulterioare. O modalitate de a evita problemele create de polifenoli este aceea de a congela țesutul, atât înainte cât şi în timpul mojarării. (STANGE şi colab., 1998, KOONJUL şi colab., 1999).

Deşi protocolul cu CTAB este des utilizat, în cazul viței de vie nu a dat rezultate corespunzătoare. Puritatea ADN-ului a fost foarte mică (tabelul 11) iar extractul, la cele mai multe soiuri, a avut o culoare brună.

Cel de-al doilea protocol (B) a constat într-o îmbunătățire a metodei de extracție a ADN-ului. In acest sens, în tamponul de extracție s-a mărit cantitatea de PVP, respectiv la 2%, şi în plus s-a mai adăugat şi 2% mercaptoetanol. Acest protocol a îmbunătățit calitatea ADN-ului, dar numai la unele soiuri (tabelul 11), Fetească albă, Fetească regală, Muscat Ottonel, Riesling italian, Traminer roz având cele mai scăzute purități şi după parcurgerea acestui protocol. La aceste soiuri puritatea ADN-ului a

avut valori cuprinse între 1,2 –1,5, indiferent de staţiunea de la care au provenit.

Amplificarea slabă a secvenţelor de ADN, ne-a determinat să recurgem la un nou protocol de extracţie deoarece este cunoscut faptul că puritatea ADN-ului este unul dintre cei mai importanţi factori în reproductibilitatea metodei RAPD. Numai utilizarea matriţei de ADN cu o puritate mare asigură rezultate reproductibile prin metoda RAPD. Dacă ADN-ul are o calitate adecvată, amprentele RAPD vor fi identice în repetiţii (McCLELAND şi WELSH, 1994).

Cel de-al treilea protocol de extracţie (C) utilizat de noi a fost după LODHI şi colab., 1994, protocol căruia i s-au adus unele modificări (POP şi colab., 2003). Modificarea a constat în primul rând în adăugarea unor noi componente în tamponul de extracţie. Astfel, tamponul de extracţie a fost îmbunătăţit prin adăugarea de 10 mM acid ascorbic şi 4 mM acid dietilditiocarbamic (DIECA). Aceste substanţe au fost adăugate în tamponul de extracţie doar în momentul utilizării. Protocolul standard prezentat de LODHI şi colab. (1994) conţinea în tamponul de extracţie 2% PVP şi 0,2% beta mercaptoetanol.

Polivinilpirolidona solubilă (PVP 40) adăugată în tamponul de izolare, în concentraţie de 2%, a avut rol de absorbant al polifenolilor. Acidul dietilditiocarbamic (DIECA) adăugat în tamponul de izolare a avut rol de inhibitor al fenoloxidazei. Inhibarea oxidării polifenolilor s-a realizat prin includerea unei concentraţii mari de antioxidant, respectiv acidul ascorbic 4 mM, în tamponul de extracţie. Rolul acidului ascorbic ca inhibitor al oxidării polifenolilor a fost constatat şi de alţi autori (WEISING şi colab., 1995).

Adăugarea acidului ascorbic şi a acidului dietilditiocarbamic s-a dovedit a fi benefică, puritatea ADN-ului îmbunătăţindu-se semnificativ, ajungând la valori mult mai mari (1,7-1,9) la toate soiurile analizate din toate cele cinci staţiuni. Extracţia de ADN prin această metodă a dus la obţinerea unei soluţii de ADN incolore la toate probele analizate.

De asemenea, un efect favorabil asupra purităţii ADN-ului l-a avut şi utilizarea soluţiei de clorură de sodiu 5 M şi a alcoolului etilic, care au favorizat mărirea solubilităţii polizaharidelor, împiedicând totodată precipitarea concomitentă a polizaharidelor şi a ADN-ului. LODHI şi colab., (1994) arată că adăugarea de clorură

de sodiu în concentrație mare a avut un efect sporit în îndepărtarea polizaharidelor la speciile de *Vitis* (ROUT şi colab., 2002).

Cantitatea de ADN obținută prin cele trei variante de extracție a fost corespunzătoare (77,5-4518,6 ng/µl), având în vedere că pentru amplificare s-au utilizat 50 ng. Cea mai mică cantitate de ADN s-a obținut la soiul Cetățuia provenit de la Valea Călugărească, atunci când pentru extracție s-a aplicat protocolul A (77 ng/µl). Cea mai mare cantitate de ADN respectiv de 4518,6 ng/µl, s-a obținut tot la soiul Cetățuia, provenit de această dată de la Blaj, prin utilizarea protocolului C. Datele privind cantitățile de ADN obținute sunt prezentate în tabelul 7.

Tabelul 7

Cantitatea de ADN obținută prin cele trei metode de extracție

DNA concentration determined in three extraction metods

Soiul *Cultivar*	Localitatea *Provenance*	Cantitatea de ADN ng/µl *DNA concentration ng/µl*		
		Protocol A	Protocol B	Protocol C
Fetească albă	Blaj	449,50	202,00	2111,30
	Recaş	387,50	92,30	1328,50
	Odobeşti	1100,50	257,20	1487,40
	Iaşi	403,00	557,00	1088,90
	Valea Călugărească	1395,00	108,00	1377,30
Fetească regală	Blaj	1054,00	218,30	3447,20
	Recaş	575,80	95,00	701,20
	Odobeşti	440,00	286,20	2112,10
	Iaşi	434,00	563,20	2289,20
	Valea Călugărească	1550,00	287,00	670,30
Muscat Ottonel	Blaj	604,50	189,90	2101,90
	Recaş	682,00	246,60	1289,50
	Odobeşti	759,50	175,30	958,30
	Iaşi	217,00	599,20	768,00
	Valea Călugărească	1302,00	349,00	1068,60
Riesling italian	Blaj	992,00	256,20	3549,90
	Recaş	449,50	287,00	2254,00
	Odobeşti	759,50	185,20	1113,70
	Iaşi	496,00	634,00	1068,30
	Valea Călugărească	449,50	371,20	1208,00
Traminer roz	Blaj	372,00	420,10	2958,60
	Recaş	542,50	139,00	3756,90
	Odobeşti	186,00	538,20	3028,50
	Iaşi	232,50	93,30	1285,90
	Valea Călugărească	372,00	290,00	2064,10

Tabelul 7
continuare

Cantitatea de ADN obținută prin cele trei metode de extracție

DNA concentration determined in three extraction metods

Soiul *Cultivar*	Localitatea *Provenance*	Cantitatea de ADN ng/µl *DNA concentration ng/µl*		
		Protocol A	Protocol B	Protocol C
Cabernet Sauvignon	Blaj	780,60	802,20	833,90
	Recaş	790,50	820,20	1025,20
	Odobeşti	765,50	810,50	856,70
	Iaşi	775,00	815,60	4276,80
	Valea Călugărească	1317,50	868,60	1226,50
Cetățuia	Blaj	475,60	726,30	4518,60
	Recaş	468,50	595,60	733,50
	Odobeşti	449,50	625,80	728,60
	Iaşi	139,50	736,50	1349,00
	Valea Călugărească	77,50	379,40	723,80
Napoca	Blaj	146,60	325,70	1022,50
	Recaş	150,70	360,60	3750,50
	Odobeşti	139,50	325,90	1040,40
	Iaşi	248,00	425,60	4482,00
	Valea Călugărească	279,50	385,70	2340,10
Timpuriu de Cluj	Blaj	1612,20	1825,30	3746,70
	Recaş	225,80	457,50	1886,80
	Odobeşti	232,50	458,70	1894,70
	Iaşi	217,00	745,90	3485,90
	Valea Călugărească	212,00	455,70	2026,50
Merlot	Blaj	850,50	835,90	1650,90
	Recaş	1038,50	1234,20	1353,60
	Odobeşti	403,00	645,70	2767,70
	Iaşi	93,00	847,30	3339,50
	Valea Călugărească	775,00	863,20	1643,60

Rezultatele, prelucrate prin analiza varianței (tabelul 8), au fost interpretate cu ajutorul testului comparațiilor multiple (testul Duncan) şi sunt prezentate în tabelele 9 şi 10, doar pentru interacțiunile soi x metodă de extracție şi localitate de proveniență x metodă de extracție.

Din datele tabelului 8 se observă că toți cei trei factori experimentali (soiul, metoda de extracție şi localitatea de proveniență), au influențat distinct semnificativ cantitatea de ADN extrasă.

Tabelul 8

Analiza varianței pentru experiența trifactorială de tipul 10 x 3 x 5 (soi x metodă de extracție x localitate de proveniență)
(Influența soiului, a metodei de extracție şi a localității asupra cantității de ADN obținută la vița de vie)

Three way ANOVA experiment 10 x 3 x 5 (influence of cultivars x extraction methods x provenance upon quantity of DNA extracted)

Cauza variabilității *Cause of variability*	SP *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Totală	429205404,32	449		
Parcele mari	13054135,48	29		
Repetiții	106624,98	2		
Factorul A (soiul de viță de vie)	12546370,29	9	1394041,14	62,55**>1,92; 2,50
Eroare (a)	401140,199	18	22285,56	
Parcele mijlocii	238711388,47	60		
Factorul B (metoda de extracție)	201849801,59	2	100924900,8	11861,27**>3,04; 4,71
Interacțiunea A x B	36521235,78	18	2028957,5	238,45**>1,62; 2,09
Eroare (b)	340351,10	40	8508,75	
Parcele mici	177439880,37	360		
Factorul C (localitatea de proveniență)	12721038,74	4	3180259,68	948,11**>2,41; 3,41
Interacțiunea A x C	54962768,60	36	1526743,57	455,16**>1,45; 1,69
Interacțiunea B x C	21469055,66	8	2683631,96	800,05**>1,98; 2,60
Interacțiunea A x B x C	87481979,72	72	1215027,50	362,23**>1,35; 1,53
Eroare (c)	805037,63	240	3354,32	

Întrucât în această fază interesul nostru s-a îndreptat în principal spre găsirea celui mai eficient protocol de extracție a ADN-ului, din punctul de vedere al cantității de ADN obținute, datele experimentale au fost interpretate prin testul Duncan doar pentru interacțiune soi x metodă de extracție şi localitate de proveniență x metodă de extracție.

În tabelul 9 se prezintă influența soiului şi a metodei de extracție asupra cantității de ADN obținută. Se observă că între soiuri există diferențe asigurate statistic privind cantitatea de ADN obținută, indiferent de metoda de extracție, ceea ce sugerează că genotipul, la vița de vie, influențează în mod hotărâtor cantitatea de ADN ce poate fi extrasă prin metode curent folosite în acest scop. In ceea ce priveşte metoda

de extracție (tabelul 9) şi aceasta a avut o influență semnificativă asupra cantității de ADN obținută.

Tabelul 9

Influența soiului (A), a metodei de extracție (B) şi a interacțiunii (A x B) asupra cantității de ADN obținută

Effect of cultivar (A), method for DNA extraction (B) and interaction (A x B) upon quantity of DNA obtained

Soiul *Cultivar*	Metoda de extracție *Method for DNA extraction*			**Media soi** ***Mean of cultivar***
	Protocol A	Protocol B	Protocol C	
Fetească albă	747,10 jk	243,30 q	1478,68 f	**823,03 G**
Fetească regală	810,76 i	289,94 p	1844,00 d	**981,57 EF**
Muscat Ottonel	713,00 k	312,00 op	1237,26 g	**754,09 H**
Riesling italian	629,30 l	346,72 n	1838,78 d	**938,27 F**
Traminer roz	341,00 no	296,12 op	2618,80 a	**1085,31 CD**
Cabernet Sauvignon	885,83 h	823,43 i	1643,84 e	**1117,70 C**
Napoca	192,83 r	364,71 n	2527,10 b	**1028,21 DE**
Cetățuia	322,12 nop	612,72 l	1610,70 e	**848,51 G**
Timpuriu de Cluj	499,90 m	788,62 ij	2608,12 a	**1298,88 A**
Merlot	632,00 l	885,26 h	2151,06 c	**1222,77 B**
Media metodei de extracție ***Mean of extraction method***	**577,38 N***	**496,28 P**	**1955,83 M**	

DS 5% pentru doua medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 66,08 - 75,87
DS 5% pentru doua medii metoda de extracție (*SD 5% for two means of culture medium*) = 21,54 - 26,13
DS 5% pentru doua medii soi x metoda de extracție (*SD 5% for two means of interaction*) = 37,81-45,87

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
** The differences between any two values followed by at least a commom letter are not significant*

Cea mai mare cantitate de ADN a fost realizată la extracția cu ajutorul protocolului C, iar cea mai redusă cantitate a rezultat prin extracția cu protocolul B.

Interacțiunea soi x metodă de extracție a înregistrat, la rândul ei, diferențe semnificative între valorile prezentate în interiorul tabelului 9, dar acest lucru interesa mai puțin, întrucât, indiferent de soi, ADN-ul trebuia extras în cantități cât mai mari

posibile din proba respectivă.

Aceeaşi concluzie se desprinde şi din analiza datelor privind interacţiunea localitate x metoda de extracţie (tabelul 10). Şi în acest caz, între localităţi sunt diferenţe semnificative din punctul de vedere al cantităţii de ADN extrase de la cele zece soiuri. De asemenea, diferenţele între media cantităţii de ADN obţinută prin cele trei metode de extracţie se menţin semnificative, ordinea metodelor rămânând aceeaşi: cea mai mare cantitate de ADN s-a obţinut prin protocolul C şi cea mai mică cantitate prin protocolul B.

Tabelul 10

Influenţa localităţii (B), a metodei de extracţie (C) şi a interacţiunii (B x C) asupra cantităţii de ADN extrase

Effect of provenance (B), method for DNA extraction (C) and interaction (A x B) upon quantitative of DNA obtained

Localitatea *Provenance*	Protocol de extracţie *Protocol extraction*			**Media localităţii *Mean of provenance***
	A	B	C	
Blaj	733,74 g	580,19 h	2594,15 a	**1302,70 A**
Recaş	531,13 i	432,80 j	1807,97 c	**923,97 C**
Odobeşti	523,55 i	430,87 j	1598,82 d	**851,08 E**
Iaşi	325,50 k	601,76 h	2343,35 b	**1090,20 B**
Valea Călugărească	773,00 f	435,78 j	1434,88 e	**881,22 D**
Media metodei de extracţie *Mean of extraction method*	**577,38 N***	**496,28 P**	**1955,83 M**	

DS 5 % pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 16,90-22,81
DS 5% pentru două medii metoda de extracţie (*SD 5% for two means of method*) = 21,54-26,13
DS 5% pentru două medii localitate x metoda de extracţie (*SD 5% for two means of interaction*) = 27,34-36,91

* Diferenţele dintre oricare două variante urmate de cel puţin o literă comună sunt nesemnificative
* *The differences between any two values followed by at least a commom letter are not significant*

Deoarece în analizele de polimorfism la nivel molecular interesează, pentru amplificarea PCR, nu doar cantitatea ci şi puritatea ADN-ului obţinut, în tabelele 11, 12, 13 şi 14 sunt prezentate datele referitoare la acest caracter.

Puritatea ADN-ului obţinută în experienţele noastre se prezintă sub formă de

date brute în tabelul 11. Interpretarea statistică a datelor s-a făcut ca şi în cazul cantităţii de ADN obţinute, respectiv prin testul comparaţiilor multiple (Duncan sau Turckey).

Tabelul 11

Puritatea ADN-ului obţinută prin cele trei metode de extracţie

DNA purity obtained with three methods for DNA extraction

Soiul *Cultivar*	Staţiunea *Provenance*	Puritate ADN (A_{260}/A_{280}) *Ratio absorbance (A_{260}/A_{280})*		
		Protocol A	Protocol B	Protocol C
Fetească albă	Blaj	1,6	1,6	1,9
	Recaş	1,4	1,4	1,9
	Odobeşti	1,2	1,4	1,9
	Iaşi	1,6	1,3	1,7
	Valea Călugărească	1,5	1,2	1,9
Fetească regală	Blaj	1,5	1,5	1,9
	Recaş	1,4	1,4	2,0
	Odobeşti	1,2	1,3	2,0
	Iaşi	1,6	1,3	1,9
	Valea Călugărească	1,2	1,2	2,0
Muscat Ottonel	Blaj	1,5	1,4	1,8
	Recaş	1,2	1,1	1,9
	Odobeşti	1,2	1,4	1,7
	Iaşi	1,5	1,3	1,9
	Valea Călugărească	1,2	1,2	2,0
Riesling italian	Blaj	1,7	1,5	1,9
	Recaş	1,6	1,3	1,9
	Odobeşti	1,2	1,4	1,6
	Iaşi	1,7	1,3	2,0
	Valea Călugărească	1,3	1,4	1,7
Traminer roz	Blaj	1,5	1,7	1,9
	Recaş	1,2	1,3	2,0
	Odobeşti	1,3	1,2	2,0
	Iaşi	1,5	1,4	1,9
	Valea Călugărească	1,6	1,3	1,9
Cabernet Sauvignon	Blaj	1,5	1,5	1,9
	Recaş	1,5	1,6	2,0
	Odobeşti	1,5	1,5	1,9
	Iaşi	1,7	1,7	1,9
	Valea Călugărească	1,2	1,5	1,9
Cetăţuia	Blaj	1,3	1,6	1,9
	Recaş	1,3	1,6	1,6
	Odobeşti	1,3	1,5	1,6
	Iaşi	1,5	1,6	1,7
	Valea Călugărească	1,2	1,6	1,9

Tabelul 11
continuare

Puritatea ADN-ului obținută prin cele trei metode de extracție

DNA purity obtained with three methods for DNA extraction

Soiul *Cultivar*	Stațiunea *Provenance*	Puritate ADN (A_{260}/A_{280}) *Ratio absorbance (A_{260}/A_{280})*		
		Protocol A	Protocol B	Protocol C
Napoca	Blaj	1,4	1,5	1,8
	Recaş	1,3	1,5	1,8
	Odobeşti	1,3	1,5	1,9
	Iaşi	1,7	1,7	1,9
	Valea Călugărească	1,4	1,6	1,8
Timpuriu de Cluj	Blaj	1,7	1,7	1,9
	Recaş	1,3	1,5	1,9
	Odobeşti	1,4	1,5	1,9
	Iaşi	1,5	1,6	1,9
	Valea Călugărească	1,3	1,6	1,9
Merlot	Blaj	1,5	1,6	1,9
	Recaş	1,6	1,6	1,9
	Odobeşti	1,6	1,7	1,9
	Iaşi	1,5	1,6	2,0
	Valea Călugărească	1,2	1,6	1,9

In tabelul 12 se prezintă analiza varianței pentru experiența trifactorială, rezultatele fiind interpretate cu ajutorul testului comparațiilor multiple.

Analizând datele acestui tabel se observă că cei trei factori experimentali au influențat distinct semnificativ puritatea ADN-ului. Această semnificație se păstrează şi în cazul interacțiunilor duble soi x metodă de extracție, localitate x metodă de extracție, localitate x soi, ca şi pentru interacțiunea triplă soi x metodă de extracție x localitate. Testul Duncan s-a folosit şi în acest caz pentru interacțiunile soi x metodă de extracție şi localitate x metodă de extracție.

In tabelul 13 se prezintă influența soiului şi a metodei de extracție asupra purității ADN-ului. Se poate observa că între soiuri există diferențe asigurate statistic, indiferent de metoda de extracție folosită, genotipul având influențe evidente asupra purității ADN-ului. Metoda de extracție a avut, de asemenea, o influență semnificativă asupra purității ADN-ului, protocolul C dând cele mai bune rezultate, pe ultimul loc situându-se, de această dată, protocolul A.

Interacțiunea soi x metodă de extracție a înregistrat diferențe semnificative între valorile prezentate în interiorul tabelului

Tabelul 12

Analiza varianței pentru experiența trifactorială de tipul 10 x 3 x 5 (soi x metodă de extracție x localitatea de proveniență)
(Influența soiului, metodei de extracție şi a localității asupra purității ADN-ului obținut)

Three way ANOVA experiment 10 x 3 x 5 (influence of cultivars x methods for DNA extraction x provenance upon DNA purity)

Cauza variabilității *Cause of variability*	SP *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Totală	32,57	449		
Parcele mari	1,49	29		
Repetiții	0,02	2		
Factorul A (soiul de viță de vie)	1,35	9	0,15	19,77**>1,92; 2,50
Eroare (a)	0,136	18	0,008	
Parcele mijlocii	23,18	60		
Factorul B (metoda de extracție)	20,76	2	10,38	772,07**>3,04; 4,71
Interacțiunea A x B	1,88	18	0,10	7,78**>1,62; 2,09
Eroare (b)	0,538	40	0,0134	
Parcele mici	7,90	360		
Factorul C (localitatea de proveniență)	1,45	4	0,36	57,70**>2,41; 3,41
Interacțiunea A x C	1,62	36	0,05	7,18**>1,45; 1,69
Interacțiunea B x C	1,02	8	0,13	20,34**>1,98; 2,60
Interacțiunea A x B x C	2,30	72	0,03	5,08**>1,35; 1,53
Eroare (c)	1,507	240	0,0063	

Din analiza datelor privind interacțiunea localitate x metodă de extracție (tabelul 14), se observă că apar diferențe semnificative atât între localități, cât şi în ceea ce priveşte metoda de extracție, privind caracterul analizat. Se poate observa că, în acest caz, spre deosebire de analiza caracterului cantitate, între localități, datele sunt mai puțin diferențiate între ele, două localități (Iaşi şi Blaj) având valori foarte apropiate, respectiv 1,69 şi 1,68. Diferențele între media purității ADN-ului obținut prin cele trei protocoale se mențin semnificative, cel mai eficient protocolul fiind C, protocolul A situându-se pe ultimul loc.

Tabelul 13

Influența soiului (A), a metodei de extracție (B) şi a interacțiunii (A x B) asupra purității ADN-ului obținut

Effect of cultivars (A), methods for DNA extraction (B) and interaction (A x B) upon DNA purity

Soiul *Cultivar*	Metoda de extracție *Method for DNA extraction*			**Media soi *Mean of cultivar***
	Protocol A	Protocol B	Protocol C	
Fetească albă	1,46 k	1,38 m	1,92 c	**1,59 D**
Fetească regală	1,42 l	1,38 m	1,97 ab	**1,59 D**
Muscat Ottonel	1,34 n	1,34 n	1,89 d	**1,52 E**
Riesling italian	1,53 h	1,36 mn	1,87 d	**1,58 D**
Traminer roz	1,43 l	1,38 m	1,98 a	**1,59 D**
Cabernet Sauvignon	1,50 i	1,61g	1,96 ab	**1,69 AB**
Napoca	1,47jk	1,60 g	1,87 d	**1,65 C**
Cetățuia	1,35 n	1,59 g	1,81e	**1,58 D**
Timpuriu de Cluj	1,46 k	1,60 g	1,94 bc	**1,67 BC**
Merlot	1,49 ij	1,65 f	1,98 a	**1,71 A**
Media metodei de extracție *Mean of extraction method*	**1,44 P***	**1,49 N**	**1,92 M**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,03
DS 5% pentru două medii metoda de extracție (*SD 5% for two means of method*) = 0,03
DS 5% pentru două medii soi x metoda de extracție (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,03

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
** The differences between any two values followed by at least a commom letter are not significant*

Deoarece în această experiență metodologică obiectivul principal urmărit a fost acela al identificării celui mai adecvat protocol de extracție ADN, atât din punctul de vedere al cantității cât şi din cel al purității extractului, s-a procedat la calcularea ecuației de regresie şi a coeficientului de corelație dintre cantitatea de ADN şi puritatea acestuia.

In figura 11 este prezentată linia şi ecuația de regresie, precum şi coeficientul de corelație dintre cantitatea de ADN şi puritatea acestuia, determinate din datele interacțiunii soi x metodă de extracție.

Din datele prezentate în această figură se observă că relația dinte cantitate şi puritate este liniară, datele individuale grupându-se destul de strâns în jurul liniei de regresie.

Tabelul 14

Influența localității de proveniență (C), a metodei de extracție (B) şi a interacțiunii (B x C) asupra purității ADN-ului obținut

Effect of provenance (C), methods for DNA extraction (B) and interaction (B x C) upon DNA purity

Localitatea *Provenance*	Protocol de extracție ADN *Protocol for DNA extraction*			**Media localității *Mean of provenance***
	A	B	C	
Blaj	1,55 f	1,58 e	1,94 a	**1,69 A**
Recaş	1,41j	1,45 i	1,93 ab	**1,60 B**
Odobeşti	1,33 k	1,46 h	1,89 c	**1,56 C**
Iaşi	1,61 d	1,50 g	1,92 ab	**1,68 A**
Valea Călugărească	1,33 k	1,44 i	1,91 bc	**1,56 C**
Media metodei de extracție *Mean of extraction method*	**1,44 P***	**1,49 N**	**1,92 M**	

DS 5% pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 0,03 – 0,04
DS 5% pentru două medii metoda de extracție (*SD 5% for two means of methods*) = 0,03
DS 5% pentru două medii localitate x metodă (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,03 - 0,04

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
* *The differences between any two values followed by at least a commom letter are not significant*

Corelația dintre cele două variabile este directă şi pozitivă, creşterea cantității de ADN ducând la o creştere a purității acestuia.

Valoarea r = 0,89** indică o semnificație a dependenței purității ADN de cantitatea extrasă.

In figura 12 este prezentată linia şi ecuația de regresie a purității ADN față de cantitatea de ADN extrasă, calculate pe baza datelor medii ale interacțiunii localitate x metodă de extracție.

Se observă că şi de această dată avem de a face cu o regresie liniară simplă exprimată prin ecuația de gradul întâi y = 1,3 + 0,0003x, datele individuale grupându-se relativ strâns în jurul liniei de regresie.

Coeficientul de corelație r = 0,86** indică, şi de această dată, o legătură directă între cele două variabile, sugerând că şi pe media localităților creşterea cantității de ADN duce în mod automat la sporirea semnificativă a purității acestuia.

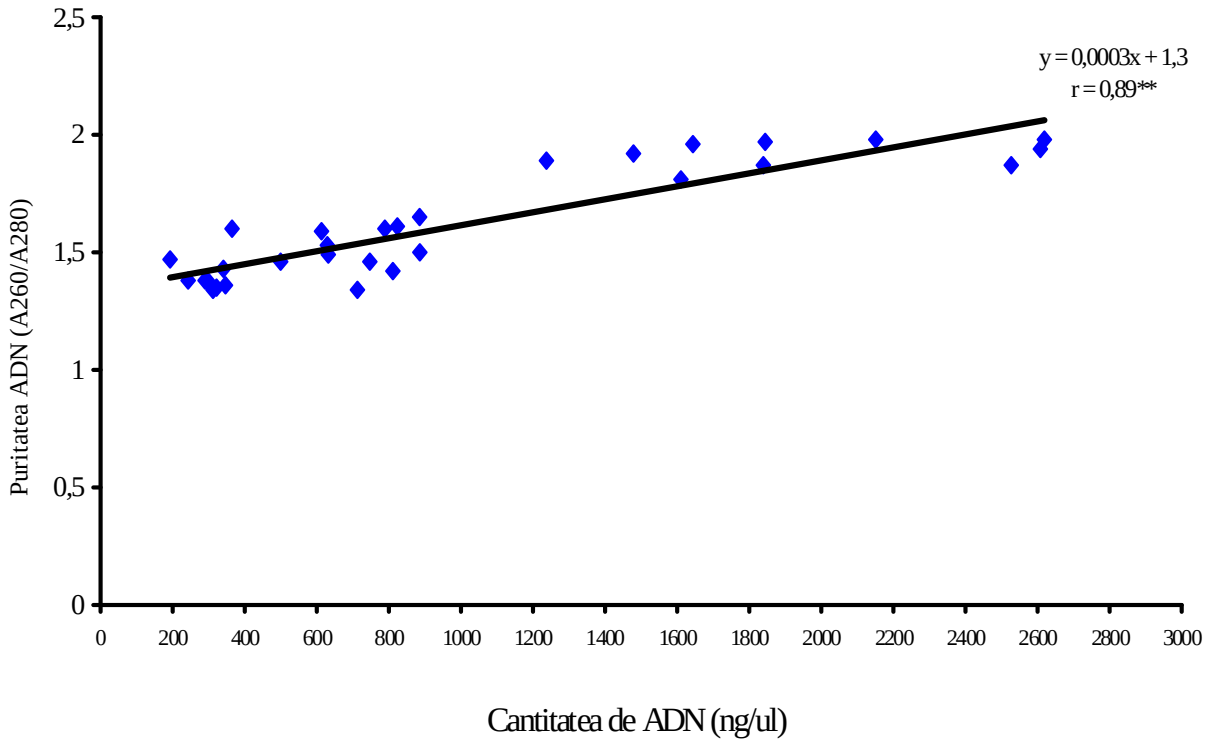


Fig. 11. Linia şi ecuaţia de regresie a purităţii ADN în funcţie de cantitatea acestuia, determinată din datele interacţiunii soi x metodă de extracţie

Regression line and equation for DNA quantity and purity in genotype x extraction method interaction

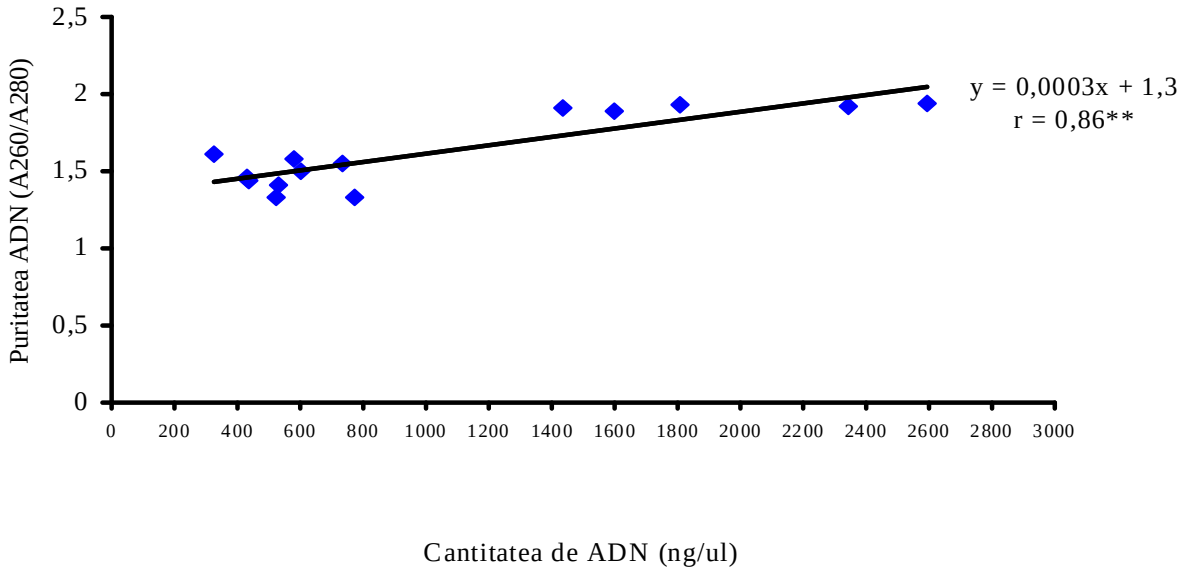


Fig. 12. Linia şi ecuaţia de regresie a purităţii ADN în funcţie de cantitatea acestuia, determinată din datele interacţiunii localitate de proveniență x metoda de extracţie

Regression line and equation for DNA quantity and purtiy in provenance x extraction method interaction

Ca o concluzie a celor discutate pe baza rezultatelor de mai sus, recomandăm aplicarea protocolului C de extracție a ADN-ului, protocol prin care şi pe media soiurilor şi pe media localităților s-au obținut cantitățile cele mai mari de ADN şi nivelul cel mai înalt de puritate ale acestuia. Poate nu este lipsit de semnificație faptul Ca o concluzie a celor discutate pe baza rezultatelor de mai sus, recomandăm aplicarea protocolului C de extracție a ADN-ului, protocol prin care şi pe media soiurilor şi pe media localităților s-au obținut cantitățile cele mai mari de ADN şi nivelul cel mai înalt de puritate ale acestuia. Poate nu este lipsit de semnificație faptul că, pe baza unor rezultate anterioare obținute la alte specii (porumb, mur, măr, zorele, salată), date confirmate şi de cele expuse anterior, colectivul de la disciplina de genetică şi biotehnologii ale USAMV Cluj-Napoca foloseşte aproape în exclusivitate protocolul C de extracție a ADN-ului, cu modificările aduse de POP şi colab., 2003.

3.1.1. Rezultate privind amplificarea şi electroforeza produşilor de reacție

În literatura de specialitate, de dată mai recentă (KOONJUL şi colab., 1999; IANDOLINO şi colab., 2004), se arată că o mai bună amplificare a fragmentelor de ADN, mai ales pentru metoda RAPD, este dată de includerea în amestecul de reacție a PVP-ului. Se apreciază că polifenolii rămaşi în soluția de ADN matriță pot inhiba amplificarea ADN-ului, dar prin adăugarea PVP-ului, aceştia pot fi absorbiți. Concentrația de PVP adăugată de noi în amestecul de reacție a fost de 2%.

Influența PVP-ului asupra intensității benzilor din gel este importantă având în vedere faptul că rezultatele finale ale studiului RAPD depind de marcarea corectă a benzilor. In literatura de specialitate (LODHI şi colab., 1997; HERRERA şi colab., 2002; NAZHAD şi colab., 2005; SOLOKI şi colab., 2005) se arată că puritatea ADN are un efect major asupra amplificării şi rezoluției benzilor în gelul de agaroză. Contaminarea ADN-ului cu polizaharide, polifenoli sau alți contaminanți duc la apariția unor benzi difuze sau de o intensitate slabă şi foarte dificil de interpretat. Cu toate că se recomandă marcarea benzilor cu o intensitate luminoasă puternică, există cazuri în care lipsa marcării benzilor difuze influențează considerabil rezultatele finale (GABOREANU, 2002).

În amestecul de reacție s-au folosit diluții de ADN care au fost reînnoite la două luni, deoarece prin menținerea acestora la o temperatură de 4^0C ADN-ul se degradează şi se constată o slabă amplificare a probelor prin metoda RAPD.

Amplificarea probelor s-a făcut în trei repetiții pentru fiecare primer. De asemenea, acelaşi primer a fost folosit pentru amplificarea tuturor probelor din fiecare stațiune în parte, obținându-se de fiecare dată acelaşi profil electroforetic.

Ordinea probelor din gelurile de agaroză a fost întotdeauna aceeaşi, notațiile din imagini fiind următoarele: Fa (Fetească albă), Fr (Fetească regală), MO (Muscat Ottonel), Ri (Riesling italian), Tr (Traminer roz), Ce (Cetățuia), Ca (Cabernet Sauvignon), Me (Merlot), Na (Napoca), TCj (Timpuriu de Cluj).

Pentru a evidenția posibilele diferențe existente între acelaşi soi dar care a provenit din stațiuni diferite, probele au fost amplificate concomitent şi ulterior migrate alăturat în acelaşi gel de agaroză (fig. 13).

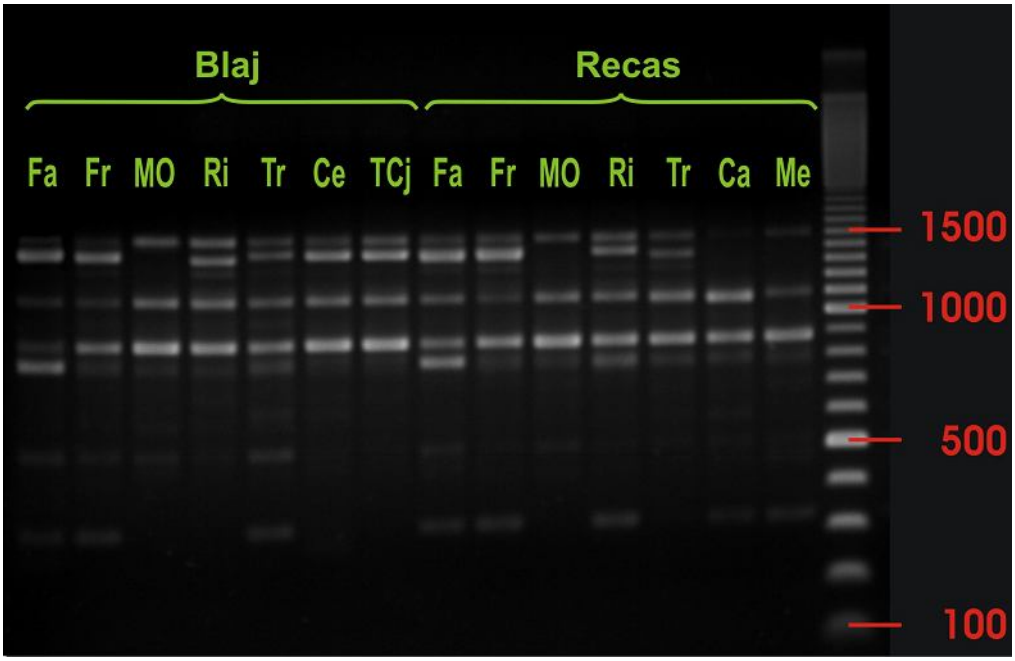


Fig. 13. Produşii de amplificare obținuți cu primerul UBC 584, la soiuri de viță de vie din stațiunile viticole Blaj şi Recaş

Amplification products obtained with primer UBC in cultivars of Vitis vinifera from Blaj and Recas

Din analiza gelurilor se observă că nu există diferenţe între proveniențele aceluiaşi soi. Acest lucru se poate explica prin faptul că vița de vie se înmulţeşte cel mai adesea vegetativ, prin altoire, soiurile fiind înmulțite în stațiuni sau centre de cercetare unde este controlată riguros provenienţa acestora.

Repetarea amplificărilor, în cazul metodei RAPD, cel puțin de două ori, este de o importanță fundamentală datorită sensibilității evidente a metodei.

Din totalul de 39 de primeri utilizați inițial, s-au obținut polimorfisme cu un număr de 22 primeri, primeri care au fost utilizați şi pentru amplificarea somaclonelor obținute în experiențele *in vitro* (tabelul 6).

Separarea fragmentelor de ADN s-a realizat în geluri de agaroză cu o concentrație de 1,4% şi la tensiuni ale curentului de 0,57 V, respectiv 0,56 mA, iar durata de migrare a fost de 2,30 ore.

Pentru o mai uşoară încărcare a gelului, probele de ADN au fost preparate în tampoane de încărcare colorate cu albastru de bromfenol. Tampoanele de încărcare sunt mai dense decât tamponul de migrare, ceea ce creează un avantaj deosebit în timpul încărcării probelor în godeuri. Datorită densității mai mari, probele de ADN colorate înlocuiesc treptat volumul de tampon din godeu care este mai uşor. Soluția tampon de electroforeză utilizată de noi a fost Tris-borat 0,5x (TBE).

Colorarea probelor de ADN ne-a facilitat şi urmărirea vizuală a procesului de migrare, având în vedere că gelurile au fost imersate în soluția de bromură de etidiu numai după migrare. Colorantul folosit, ca de altfel toți coloranții migrează electroforetic spre anod. Prin urmărirea fronturilor colorate s-a putut estima stadiul migrării. Pentru o corectă apreciere a mărimii fragmentelor din diferite benzi ale gelului şi markerul ADN utilizat a fost preparat în acelaşi tampon de încărcare.

Fragmentele rezultate prin amplificarea cu primerii polimorfici au avut lungimea cuprinsă între 200 şi 2000 pb, majoritatea având între 300 şi 1200 pb (fig. 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

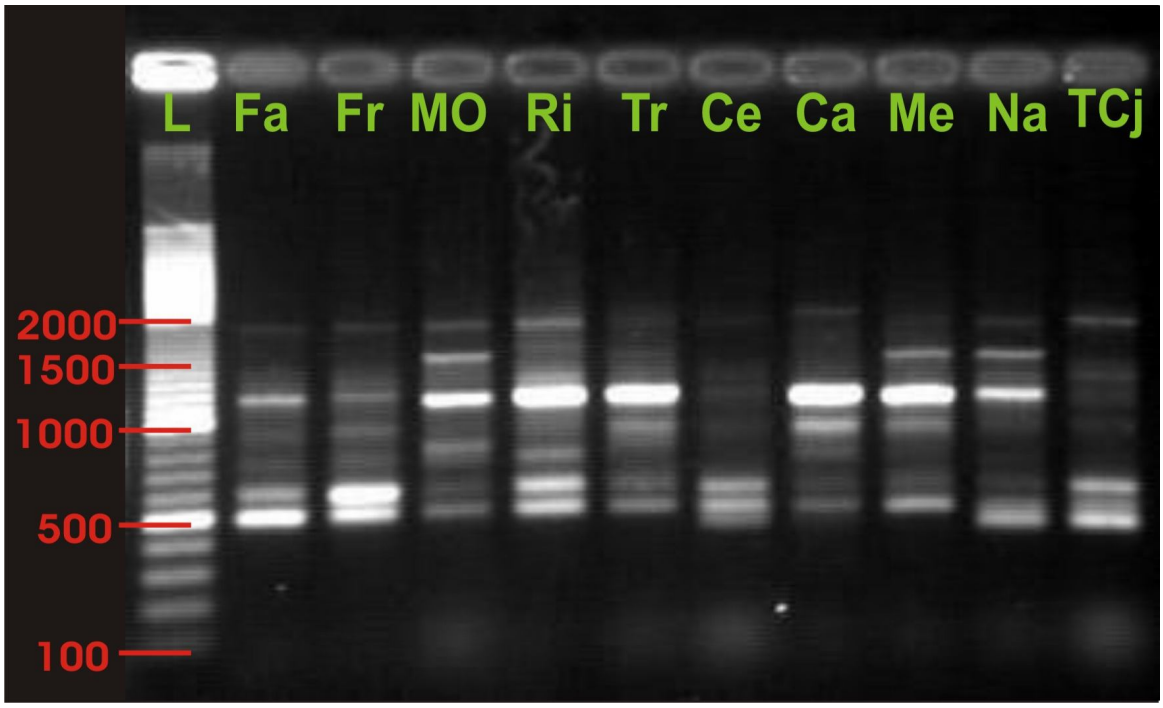


Fig. 14. Produşii de amplificare obținuți cu primerul OPAL 20, la cele zece soiuri de viță de vie

Amplification products obtained with primer OPAL 20 in ten cultivars of Vitis vinifera tested

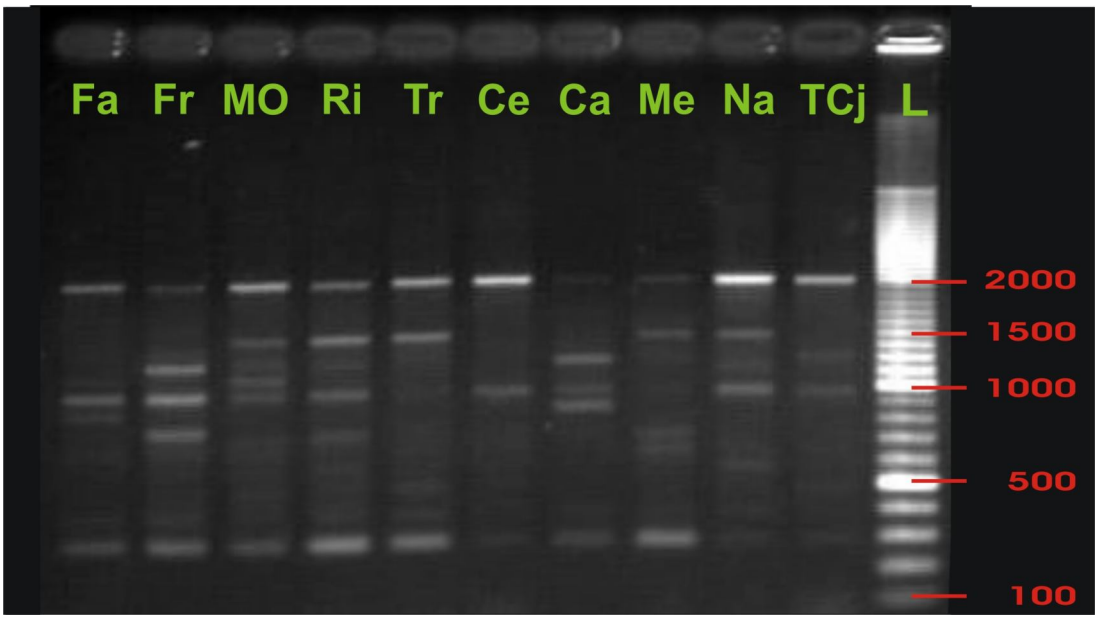


Fig. 15. Produşii de amplificare obținuți cu primerul OPX 03, la cele zece soiuri de viță de vie

Amplification products obtained with primer OPX 03 in ten cultivars of Vitis vinifera tested

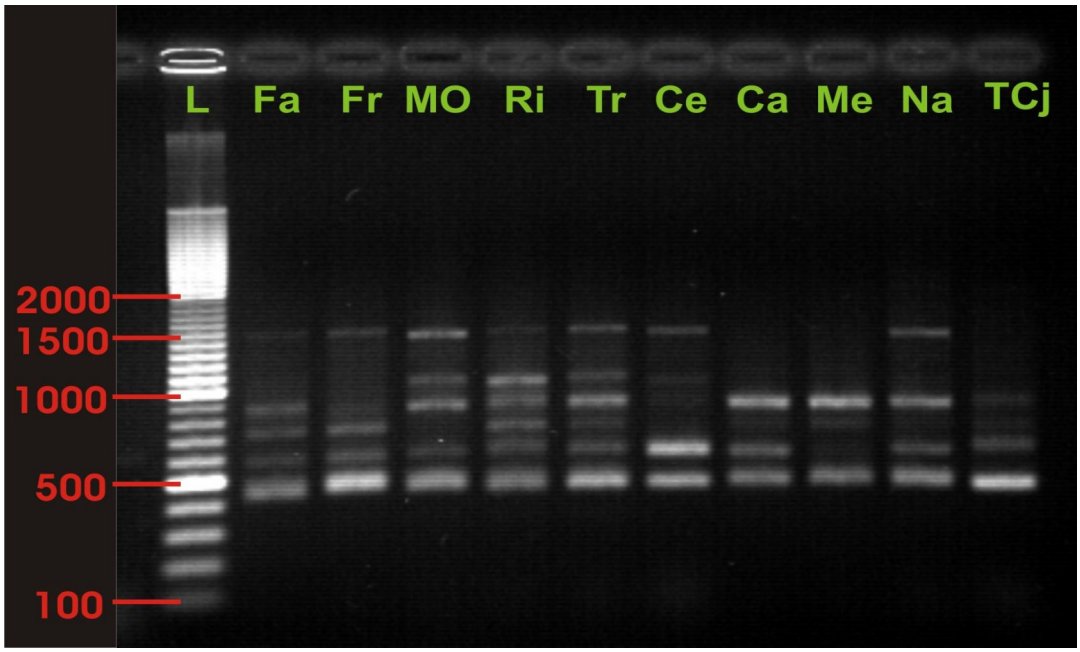


Fig. 16. Produşii de amplificare obținuți cu primerul 70.08 la cele zece soiuri de viță de vie analizate

Amplification products obtained with primer 70.08 in ten cultivars of Vitis vinifera tested

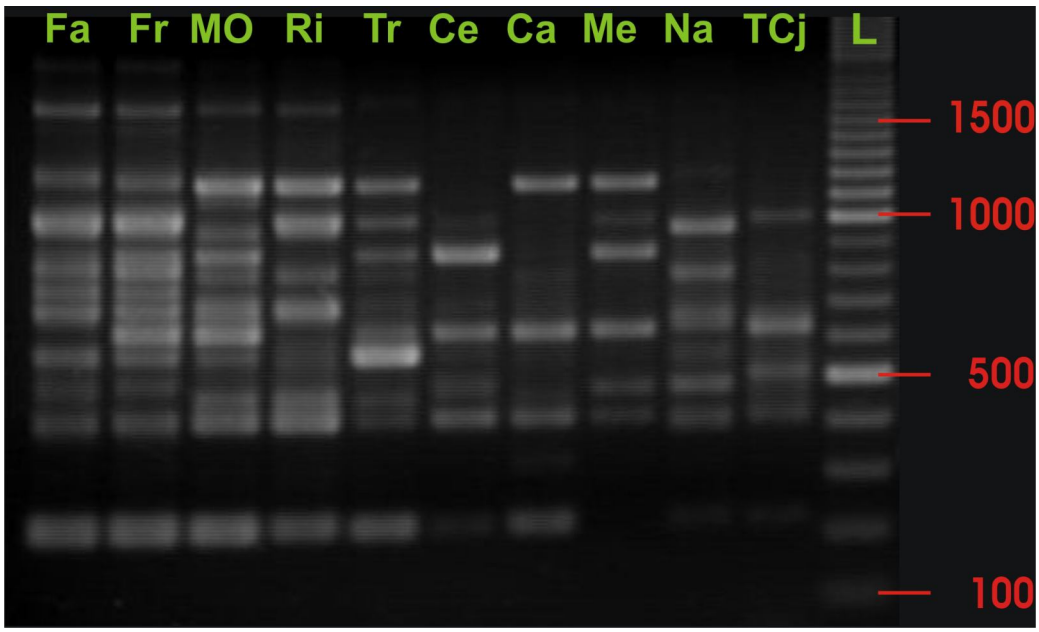


Fig. 17. Produşii de amplificare obținuți cu primerul PB 5 la cele zece soiuri de viță de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 5 in ten cultivars of Vitis vinifera tested

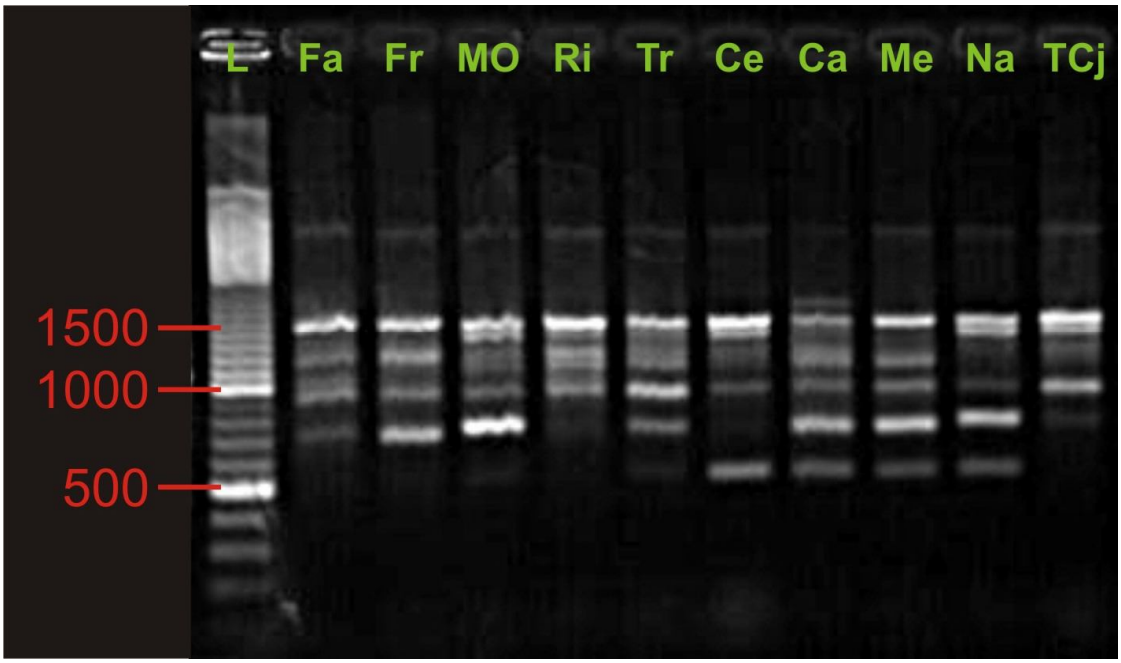


Fig. 18. Produşii de amplificare obţinuţi cu primerul OPA 04 la cele zece soiuri de viţă de vie analizate

Amplification products obtained with primer OPA 04 in the ten cultivars of Vitis vinifera tested

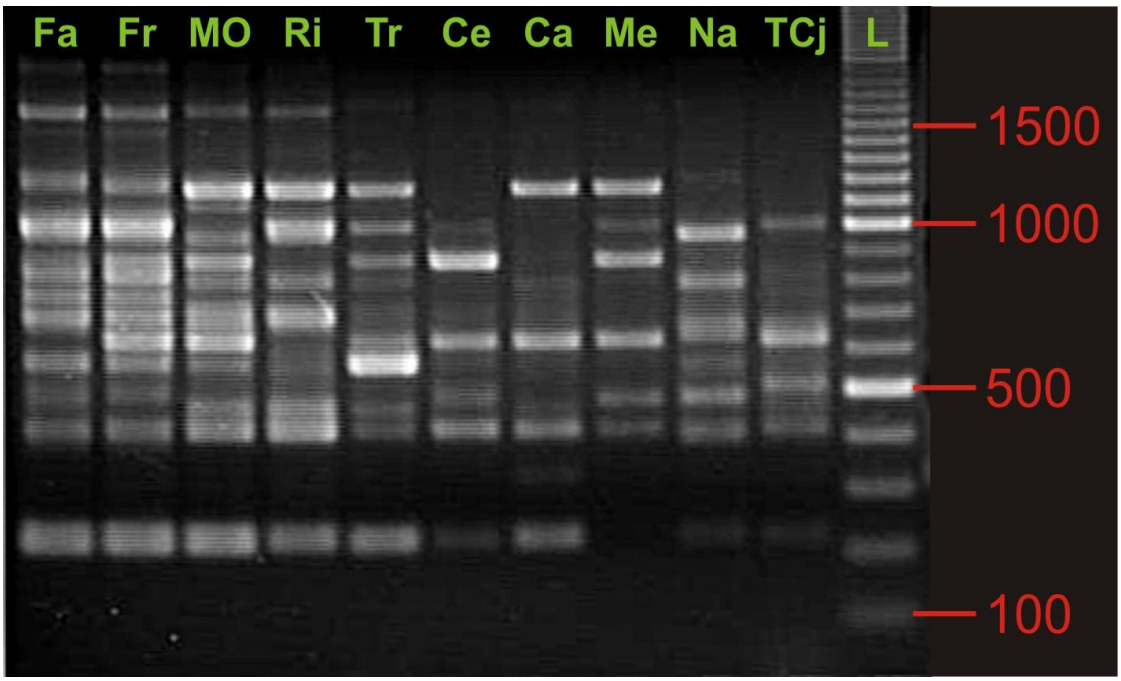


Fig. 19. Produşii de amplificare obţinuţi cu primerul PB 3 la cele zece soiuri de viţă de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 3 in the ten cultivars of Vitis vinifera tested

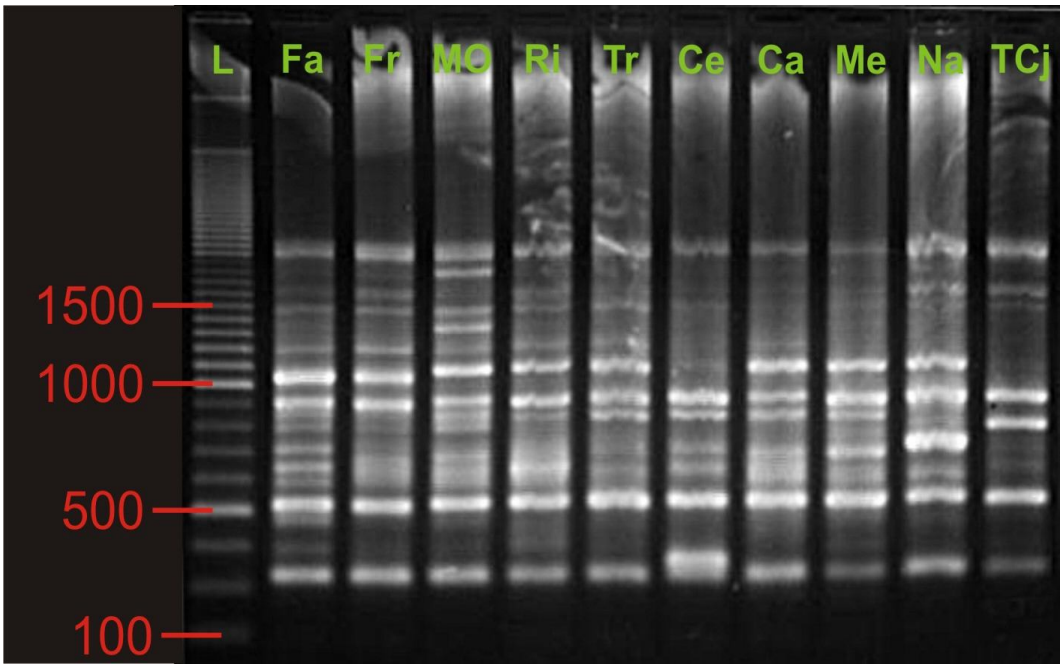


Fig. 20. Produşii de amplificare obținuți cu primerul PB 6 la cele zece soiuri de viță de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 6 in ten cultivars of Vitis vinifera tested

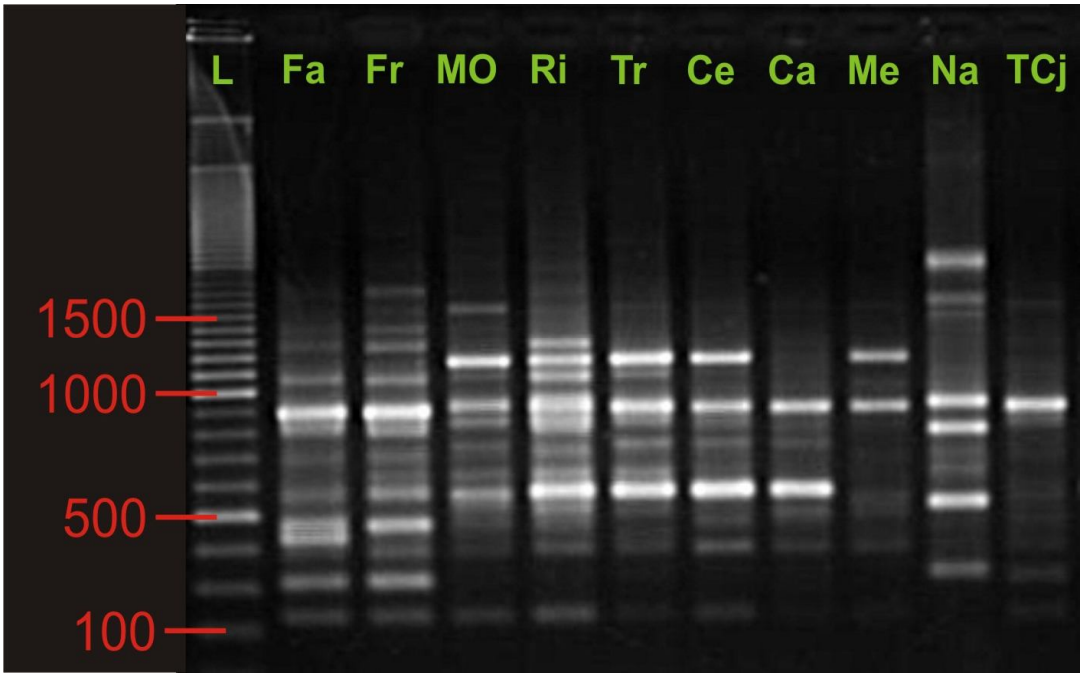


Fig. 21. Produşii de amplificare obținuți cu primerul PB 1 la cele zece soiuri de viță de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 1in the ten cultivars of Vitis vinifera tested

3.1.2. Rezultate privind analiza imaginilor şi interpretarea datelor

Notarea benzilor s-a realizat direct pe fotografiile gelurilor, prin raportarea la markerul ADN. Benzile polimorfice au fost notate cu 1, iar cele monomorfice cu 0. Prezența benzilor (notate cu 1) şi absența benzilor (notate cu 0) au fost înscrise într-un tabel sub formă de matrice binară. Numărul total de benzi generate a fost de 192, dintre care 165 de benzi au fost polimorfice (tabelul 15), benzile monomorfice fiind excluse din interpretarea statistică a datelor.

Tabelul 15

Date obținute din analiza imaginilor RAPD

RAPD primers used to analyze genetic variation in Vitis vinifera cultivars

Primer *Primer*	Nr. total de benzi *No. of bands*	Nr. de benzi polimorfice *No. of polymorphic bands*	Nr. de benzi monomorfice *No. of monomorphic bands*	% polimorfism *Percent polymorphism*
UBC 228	10	10	0	100,0
UBC 245	5	4	1	80,0
UBC 563	6	5	1	83,3
UBC 584	8	6	2	75,0
UBC 599	11	10	1	90,9
PB 1	14	13	1	92,8
PB 3	14	12	2	85,7
PB 4	10	10	0	100,0
PB 5	14	13	1	92,8
PB 6	**18**	**15**	**3**	**83,3**
OPAB 11	8	7	1	87,5
OPAB 18	4	2	2	50,0
OPE 14	6	6	0	100,0
AB 11	9	9	0	100,0
OPA 04	7	5	2	71,4
OPA 03	6	4	2	66,6
OPAL 20	8	7	1	87,5
OPX O3	9	7	2	77,7
OPA 01	4	2	2	50,0
70.08	6	5	1	83,3
70.03	10	9	1	90,0
MIC – 07	5	4	1	80,0
Total benzi	**192**	**165**	27	

Numărul total de benzi generate ne-au permis o bună interpretare a rezultatelor, fapt confirmat şi de literatura de specialitate, în care se menţionează că un număr mai mare de benzi polimorfice determină o mai bună interpretare a modului de grupare a datelor experimentale în dendrograme, prin utilizarea aceleaşi metode de analiză (HANSEN şi colab., 1998; CALDERINI şi colab., 1999).

Din datele prezentate în tabelul 15 rezultă că toţi primeri utilizaţi au generat un număr de minim două benzi polimorfice. Procentul de polimorfism a avut valori cuprinse între 100% (în cazul primerul UBC 228) şi 50% (pentru primerii OPAB 18 şi OPA 01), valori care conform metodei de analiză a datelor pot fi considerate asigurate statistic (CALDERINI şi colab., 1999).

Analiza gelurilor din experienţele organizate de noi relevă faptul că numărul cel mai mare de benzi polimorfice au fost obţinute cu primerul PB 6, respectiv 15 benzi (fig. 20), urmat de primerul PB 5 (13 benzi polimorfice) (fig. 17). Numărul cel mai mic de benzi au fost generate de primerul OPA 01 – 3 benzi.

Datele primare, obţinute cu ajutorul programul Total Lab 100 au fost prelucrate cu programul RAPDistance 1.04, care a calculat distanţele genetice pe baza coeficientului Jaccard.

Distanţele genetice calculate sunt prezentate în tabelul 16. Cu cât valorile distanţelor genetice din tabel sunt mai mici, cu atât speciile sunt mai strâns înrudite.

Tabelul 16

Distanțele genetice calculate pentru cele zece soiuri de viță de vie

Genetic distances established for ten cultivars of Vitis vinifera

	Fa	Fr	M	R	Tr	Ce	Ca	Me	Na	TCj
Fa	0,0000									
Fr	**0,4421**	0,0000								
MO	0,6783	0,6667	0,0000							
Ri	0,5158	0,5248	0,6216	0,0000						
Tr	0,6364	0,6250	0,6132	0,6263	0,0000					
Ce	0,7217	0,7184	0,7048	0,7113	0,6629	0,0000				
Ca	0,6900	0,6887	0,6881	0,6531	0,6000	0,7222	0,0000			
Me	0,7113	0,7087	0,7431	0,7525	0,5882	0,7326	0,6024	0,0000		
Na	0,7059	0,7037	0,6909	0,6566	0,6771	0,7111	0,6774	0,7283	0,0000	
TCj	0,7158	0,6458	0,6990	0,6484	0,6395	0,6053	0,7303	0,6951	**0,7609**	0,0000

Datele din interiorul tabelului arată că cea mai mică valoare a distanței genetice (0,4421) s-a înregistrat între soiurile Fetească albă şi Fetească regală, ceea ce denotă o strânsă înrudire între ele, fapt confirmat şi în dendrograma din figura 22. Din puntul de vedere al distanței genetice considerăm că cele mai îndepărtate soiuri analizate sunt Napoca şi Timpuriu de Cluj, valoarea distanței genetice fiind de 0,7609. Acest fapt poate fi datorat originii hibride a acestor soiuri, pentru hibridări fiind folosite forme parentale diferite.

3.1.3. Analiza dendrogramei

Apropierea genetică între cele zece soiuri de viță de vie analizate, stabilită pe baza matricei distanțelor genetice şi a algoritmului Neighbor Joining Tree sunt prezentate în figura 22 sub forma unei dendrograme. Distanțele genetice calculate pe baza matricei distanțelor şi a algoritmului Neighbor Joining Tree au fost prezentate în tabelul 16, iar indicii de similaritate sunt notați direct în figura dendrogramei obținute.

In cadrul dendrogramei se evidențiază două grupuri principale, A şi B. Primul grup cuprinde soiurile Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Cetățuia,

Timpuriu de Cluj şi Muscat Ottonel, iar cel de al doilea grup soiurile Merlot, Cabernet Sauvignon, Traminer roz şi Napoca.

Grupul A este constituit, la rândul lui, din alte două subgrupuri, notate cu A1 şi A2. Subgrupul A1 cuprinde soiurile Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Cetăţuia şi Timpuriu de Cluj. Soiurile Fetească albă şi Fetească regală sunt în aceeaşi ramură, distanţa genetică dintre ele fiind de 0,4421. Din punct de vedere ampelografic cele două soiuri sunt considerate apropiate datorită particularităţilor lor morfologice. De asemenea, în literatura de specialitate se arată că soiul Fetească regală ar fi un hibrid natural între Fetească albă şi Grasă de Cotnari, ceea ce denotă apropierea genetică dintre cele două soiuri. Apropierea genetică dintre cele două soiuri rezultată prin analiza RAPD, confirmă deci rezultatele anterioare conform cărora soiurile respective au o origine comună.

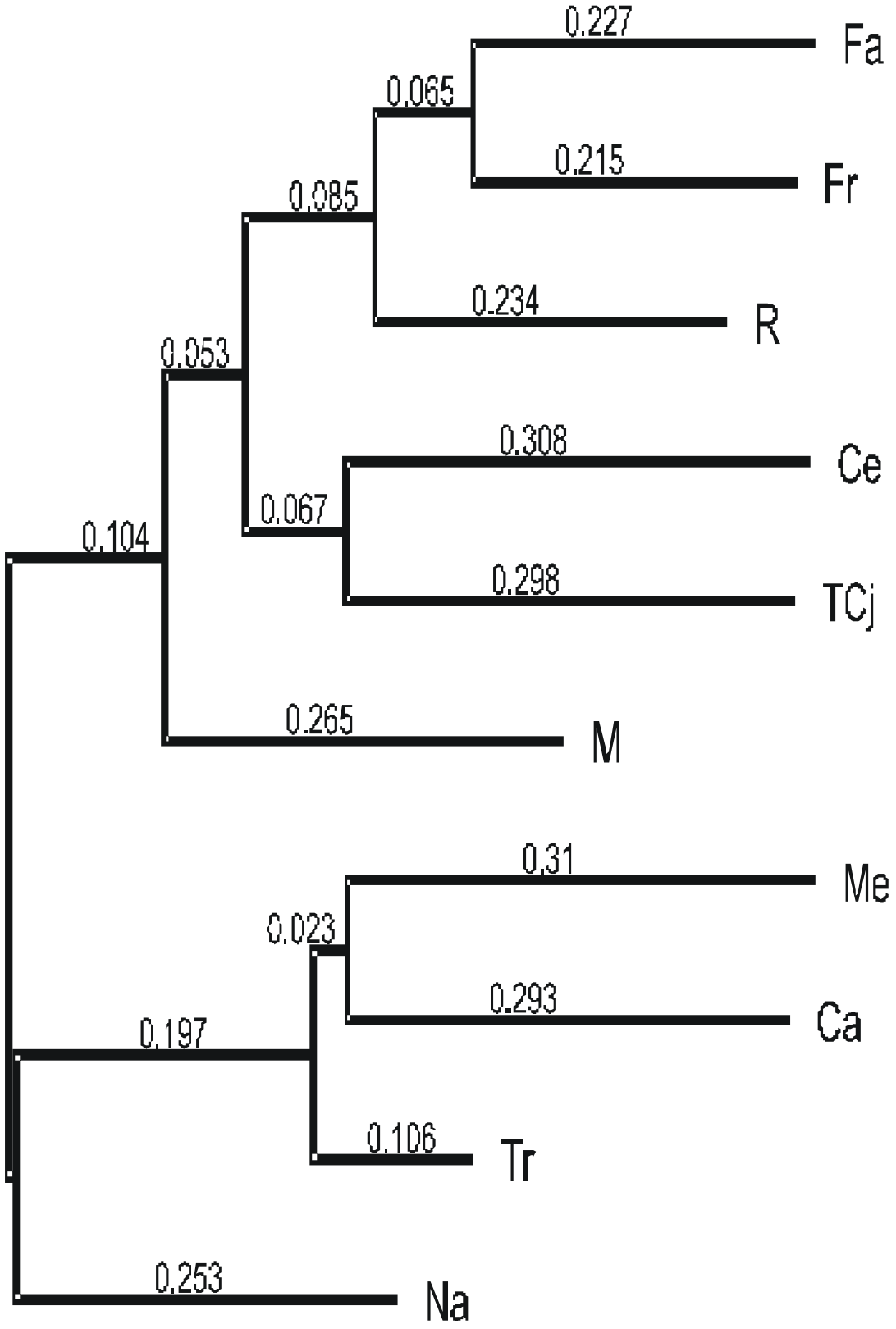


Fig. 22. Dendrograma obținută la cele zece soiuri de viță de vie analizate

Dendrogram of the ten cultivars of Vitis vinifera tested

Soiurile Cetățuia şi Timpuriu de Cluj au un părinte comun, în dendrogramă fiind situate în acelaşi subgrup. Şi în acest caz analiza RAPD a confirmat originea comună a acestor două soiuri.

Grupul B este împărțit şi el în două subgrupuri, respectiv B1 şi B2. Grupul B1 cuprinde soiurile Merlot, Cabernet Sauvignon şi Traminer roz.

Rezultatele experiențelor noastre confirmă faptul că soiul Cabernet Sauvignon şi Merlot sunt apropiate din punct de vedere genetic. Aşa după cum se arată în literatura de specialitate, soiul Merlot este considerat ca făcând parte din familia Cabernet (DEBUIGNE, 1992; BELLIN şi colab., 2001). Mai mult, cercetătorii de la Universitatea Davies din California consideră că soiul Merlot provine din soiul Cabernet Franc. De altfel, ambele soiuri din punct de vedere ecologo-geografic fac parte din *Proles occidentalis.*

Soiul Traminer roz, deşi este un soi de struguri pentru vinuri albe, se pare că este mult mai apropiat genetic de soiurile roşii. O explicație ar consta în faptul că acest soi, din punctul de vedere al clasificării pe grupe ecologo-geografice, face parte din *Proles occidentalis*, la fel ca şi soiurile Cabernet Sauvignon şi Merlot. De asemenea, bobul are o culoare roz-cenuşie.

In subgrupul B2 este prezent un singur soi şi anume Napoca, ceea ce sugerează un grad mai îndepărtat de înrudire cu celelalte soiuri analizate.

Din analiza matricei distanțelor genetice se poate observa că cele mai apropiate cultivare, din punct de vedere genetic. sunt Fetească albă şi Fetească regală, distanța genetică dintre acestea fiind de 0,4421.

Distanța genetică cea mai mare s-a constatat între soiul Napoca şi Timpuriu de Cluj, aceasta fiind de 0,7609. Această depărtare genetică sugerează existența unui grad îndepărtat de înrudire, la originea formării acestor soiuri existând părinți total diferiți.

3.2. REZULTATE OBȚINUTE ÎN EXPERIENȚELE DE MULTIPLICARE *IN VITRO*

3.2.1. Rezultate obținute în experiențele de multiplicare prin lăstărire axilară

Studierea variabilității somaclonale presupune existența unui număr mare de explante. Pentru a asigura o mai mare uniformitate genetică a descendenților s-a ales ca sistem de micropropagare multiplicarea prin lăstărire axilară. Pornind de la premisa că fiecare lăstar este o potențială plantă, rata de multiplicare mare poate fi menținută la un nivel constant pe parcursul unui număr mare de subculturi.

Inducerea caulogenezei, respectiv formarea de muguraşi şi tulpinițe, este stimulată de prezența în mediul de cultură a citochininelor. Adeseori este necesară asocierea citochininelor cu auxinele. Un rol important în neoformarea de muguraşi îl are natura şi concentrația regulatorilor de creştere utilizați

Pentru a obține un număr cât mai mare de clone, ne-am propus testarea a trei variante de mediu care au fost suplimentate atât cu auxine cât şi cu citochinine. De asemenea, având în vedere faptul că vița de vie are nevoie de un aport mai mare de azot organic, mediul a fost suplimentat, în fiecare din cele trei variante, cu hidrolizat de cazeină.

Variabilitatea reacției cultivarelor de *Vitis vinifera* micropropagate *in vitro* a fost raportată de numeroşi cercetători, ca de exemplu GALZY (1964), citat de AKBAS şi colab., 2004, HARRIS şi colab., (1982), CHEE şi colab. (1983), GALZY şi colab. (1990), (PEROS şi colab., 1998).

Datele obținute din cercetările noastre şi prezentate în tabelele 17-28 relevă o largă variabilitate a reacției la multiplicarea prin lăstărire axilară la cele zece cultivare de viță de vie pe cele trei variante de mediu de cultură şi cinci provenience testate.

Trebuie remarcat faptul că apariția lăstarilor *in vitro*, ca urmare a multiplicării prin lăstărire axilară, a fost notată la 20 de zile după inițierea culturii, dar numărarea lăstarilor şi măsurătorile privind lungimea acestora şi numărul de noduri/lăstar au fost executate la opt săptămâni de la inițierea culturii.

În figura 23 se observă formarea *in vitro* a neoplantulelor de viță de vie la circa

20 de zile de la inocularea explantelor provenite din segmente nodale detaşate de pe lăstarii recoltaţi din câmp.

Fig. 23. Neoplantule obţinute din segmente nodale la soiurile de viţă de vie Cabernet Sauvignon, Riesling italian şi Fetească regală micropropagate prin lăstărire axilară

In vitro plant regeneration from nodal segment in cultivars Cabernet Sauvignon, Riesling italian and Feteasca regala micropropagated from axillary shoot

3.2.1.1. Numărul de lăstari obținuți prin micromultiplicare prin lăstărire axilară

Datele privind influența soiului, a mediului de cultură şi a localității asupra numărului de lăstari obținuți prin multiplicarea din segmente nodale la vița de vie au fost prelucrate statistic, fiind prezentate sub forma tabelului varianțelor în tabelul 17.

Din proba F prezentată în tabelul 17 rezultă că toți factorii experimentali (soi, mediu de cultură, localitatea de proveniență), precum şi interacțiunile simple, duble şi cea triplă dintre aceştia au avut influențe semnificative asupra numărului de lăstari obținuți prin multiplicarea din segmente nodale. Datorită acestui fapt sintezele rezultatelor obținute sunt prezentate sub formă de tabele bilaterale.

Tabelul 17

Analiza varianței pentru experiența trifactorială de tipul 10 x 3 x 5 (soi x mediu de cultură x localitatea de proveniență)
(Influența soiului, mediului de cultură şi a localității asupra numărului de lăstari obținuți prin multiplicarea din segmente nodale la vița de vie)

Analysis of variant three way Anova experiement 10 x 3 x 5 (cultivars x culture medium x provenance)

Cauza variabilității *Cause of variability*	SP *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Totală	1855,76	449		
Parcele mari	171,74	29		
Repetiții	0,81	2		
Factorul A (soiul de viță de vie)	169,06	9	18,78	181,21**>1,92; 2,50
Eroare (a)	1,866	18	0,104	
Parcele mijlocii	1632,86	60		
Factorul B (mediul de cultură)	1435,78	2	717,89	11807,37**>3,04; 4,71
Interacțiunea A x B	194,65	18	10,81	177,86**>1,62; 2,09
Eroare (b)	2,432	40	0,0608	
Parcele mici	51,16	360		
Factorul C (localitatea de proveniență)	19,61	4	4,90	97,18** >2,41;3,41
Interacțiunea A x C	4,86	36	0,13	2,68** >1,45;1,69
Interacțiunea B x C	3,56	8	0,44	8,82**>1,98; 2,60
Interacțiunea A x B x C	11,03	72	0,15	3,04**>1,35; 1,53
Eroare (c)	12,105	240	0,0504	

Analizând influența soiului şi a mediului de cultură asupra numărului de lăstari obținuți prin micropropagare din lăstari axilari la vița de vie, datele prezentate în tabelul 18 relevă faptul că atât soiul cât şi mediul de cultură au avut efecte semnificative asupra acestui caracter.

Tabelul 18

Influența soiului (A), a mediului de cultură (B) şi a interacțiunii (A x B) asupra numărului de lăstari de viță de vie obținuți prin micropropagare

Effects of cultivars (A), culture medium (B) and interaction (A xB) upon the number shoots of Vitis vinifera micropropagated

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			***Media soi*** ***Mean of cultivar***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	1,18 t	2,76 lm	6,09 e	**3,34 DE**
Fetească regală	1,60 p	3,09 j	5,57 g	**3,42 D**
Muscat Ottonel	1,46 r	3,04 j	6,58 c	**3,69 B**
Riesling italian	1,46 r	2,74 m	7,12 b	**3,77 B**
Traminer roz	1,40 r	4,82 h	6,30 d	**4,17 A**
Cabernet Sauvignon	1,49 r	2,91 k	7,70 a	**4,03 A**
Napoca	1,42 r	2,52 n	5,65 g	**3,20 E**
Cetățuia	1,30 s	2,07 o	2,83 kl	**2,07 G**
Timpuriu de Cluj	1,46 r	2,49 n	3,78 i	**2,58 F**
Merlot	1,68 p	3,13 j	5,95 f	**3,59 C**
Media mediu de cultură ***Mean of culture medium***	**1,45 P***	**2,96 N**	**5,76 M**	

DS 5% pentru două medii soi *(SD 5% for two means of variety)* = 0,15-0,17
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,06-0,07
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,09-0,10

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Se observă, din ultima coloană a tabelului 18 că cel mai mare număr de lăstari s-a obținut la soiul de vin alb Traminer roz şi la soiul de vin roşu Cabernet Sauvignon. Celelalte soiurile de vin alb înregistrează un număr de lăstari semnificativ inferior, dintre soiurile albe cele mai bune rezultate înregistrându-se la Muscat Ottonel şi Riesling italian. Strugurii de masă s-au plasat la diferențe semnificative față de

strugurii de vin, în ceea ce priveşte numărul de lăstari obţinuţi prin micropropagare din segmente nodale. Exceptând soiul Napoca, care se apropie ca valoare a acestui caracter de soiurile de vin albe, celelalte soiuri de struguri de masă au o capacitate semnificativ mai mică de producere de neoplantule prin lăstărire axilară.

Se poate conchide, pe baza acestor date, că genotipurile de viţă de vie analizate prezintă capacităţi semnificativ diferite de formare a lăstarilor prin cultura *in vitro* de segmente nodale. Rezultatul nu constituie o noutate întrucât, la majoritatea plantelor lemnoase, influenţa genotipului asupra succesului culturii *in vitro* este întotdeauna notabilă (YOUMBI şi colab., 2006; DE SILVA, 2006).

Influenţa mediului de cultură asupra numărului de lăstari obţinuţi prin cultura *in vitro* de segmente nodale este, de asemenea, semnificativă, cel mai mare număr de lăstari obţinându-se pe mediul MS – 2,5 mg/l BAP, la diferenţe semnificative de celelalte două medii. Mediul MS – 1,0 mg/l BAP, deşi este semnificativ superior mediului MS cu doar 0,5 mg/l BAP, are capacitatea de a produce un număr de lăstari redus la jumătate faţă de cel mai productiv mediu de cultură din experienţă (MS – 2,5 mg/l BAP).

Analizând datele din interiorul tabelului 18 privind influenţa interacţiunii soi x mediu de cultură asupra numărului de lăstari obţinuţi prin cultura *in vitro* de segmente nodale se poate constata că cele mai ridicate valori ale acestui caracter se înregistrează la soiurile Cabernet Sauvignon, Riesling italian, Muscat Ottonel şi Traminer roz atunci când se utilizează mediul de cultură MS – 2,5 mg/l BAP. Toate celelalte combinaţii dintre soi şi mediu de cultură duc la scăderi foarte semnificative ale numărului de lăstari, aceste scăderi putând să ajungă la mai mult de 6,5 ori.

Influenţa localităţii de proveniență a materialului biologic (cultivarele de viţă de vie) şi a mediului de cultură asupra numărului de lăstari obţinuţi prin micropropagarea prin lăstari axilari este prezentată în datele cuprinse în tabelul 19.

Analiza mediei localităţilor de proveniență, relevă faptul că între acestea diferenţele nu sunt foarte mari, dar datorită omogenităţii datelor, ele sunt semnificative. Trecând peste această inadvertenţă aparentă, trebuie să admitem că diferenţele semnificative între localităţile de proveniență în ceea ce priveşte numărul de lăstari obţinuţi în cultura *in vitro* s-ar putea datora, foarte probabil, condiţiilor

diferite de recoltare şi transport a probelor de material biologic (lăstari de un an). Astfel de date sunt publicate şi de AKBAŞ, 2004, care evidenţiază faptul că, la soiul Perle de Csaba, succesul micropropagării a depins în mod semnificativ de luna în care au fost recoltaţi lăstarii care au furnizat explantele.

Tabelul 19

Influenţa localităţii de proveniență (C), a mediului de cultură (B) şi a interacţiunii (B x C) asupra numărului de lăstari obţinuţi prin micropropagare la vița de vie

Effect of provenance (C), culture medium (B) and interaction (B x C) upon the number of shoots of Vitis vinifera micropropagated

Localitatea de proveniență *Provenance*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media localităţii *Means of provenance***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Blaj	1,30 j	2,59 g	5,47 c	**3,12 C**
Recaş	1,36 j	2,60 g	5,51 c	**3,16 C**
Odobeşti	1,46 ij	3,06 f	5,86 b	**3,46 B**
Iaşi	1,55 h	3,20 e	5,95 a	**3,57 A**
Valea Călugărească	1,54 h	3,34 d	5,99 a	**3,62 A**
Media mediu de cultură *Means of culture medium*	**1,45 P***	**2,96 N**	**5,75 M**	

DS 5% pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 0,06-0,07
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,06-0,07
DS 5% pentru două medii localitate x mediu (*SD 5% for trwo means of interaction*) = 0,08-0,11

* Diferenţele dintre oricare două variante urmate de cel puţin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

În tabelul 20 sunt prezentate rezultatele experimentale privind influenţa soiului şi a localităţii de proveniență a acestora asupra numărului de lăstari obţinuţi în cultura *in vitro* de segmente nodale. Deoarece influenţa soiului a fost discutată anterior, iar influenţa localităţii, deşi semnificativă nu este ilustrată prin diferenţe marcante între provenienţe nu vom insista asupra datelor privind această interacţiune.

Concluzionând datele discutate în acest subcapitol se poate conchide că, în mod sigur, genotipul şi mediul de cultură influenţează hotărâtor numărul de lăstari obţinuţi

la micropropagarea prin lăstărire axilară la vița de vie. Soiurile cu cea mai ridicată capacitate de reacție la cultura *in vitro* din segmente nodale par a fi soiurile Cabernet Sauvignon, şi Traminer roz, iar mediul de cultură cel mai adecvat acestui scop s-a dovedit a fi MS – 2,5 mg/l BAP.

Tabelul 20

Influența soiului (A), a localității de proveniență (C) şi a interacțiunii (A x C) asupra numărului de lăstari obținuți prin micropropagare la vița de vie

Effect of cultivars (A), provenance (C) and interactions (A x C) on number shoots of Vitis vinifera micropropagated

Soiul *Cultivar*	Localitatea de proveniență *Provenance*					**Media soi *Mean of cultivar***
	Blaj	Recaş	Odobeşti	Iaşi	Valea Călugărească	
Fetească albă	2,98 p	3,09 op	3,32 lmno	3,62 hij	3,71 fgh	**3,34 DE**
Fetească regală	3,18 no	3,10 op	3,68 ghi	3,64 ghij	3,50 ijkl	**3,42 D**
Muscat Ottonel	3,43 klmn	3,37 lmno	3,87 def	3,87 def	3,93 cde	**3,69 BC**
Riesling italian	3,47 jklm	3,70 fgh	3,73 fgh	3,87 def	4,10 bc	**3,77 B**
Traminer roz	3,57 hij	4,07 cd	4,43 a	4,43 a	4,37 a	**4,17 A**
Cabernet Sauvignon	4,00 cd	3,92 cde	3,97 cde	4,04 cdef	4,23 b	**4,03 A**
Napoca	2,90 q	2,93 pq	3,27 no	3,40 klmn	3,48 jkl	**3,20 E**
Cetățuia	1,89 v	1,86 v	2,14 u	2,21 u	2,23 tu	**2,07 G**
Timpuriu de Cluj	2,40 st	2,27 tu	2,63 rs	2,78 qr	2,81 q	**2,58 F**
Merlot	3,39 klmn	3,29 mno	3,57 hij	3,81 efg	3,88 def	**3,59 C**
Media localității *Mean of provenance*	**3,12 P***	**3,16 P**	**3,46 N**	**3,57 M**	**3,62 M**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,15-0,17
DS 5% pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 0,06-0,07
DS 5% pentru doua medii soi x localitate (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,17-0,22

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Deoarece mediul de cultură are cea mai puternică influență asupra numărului de neoplantule obținut la micropropagarea prin lăstărire axilară, se întâlnesc şi cazuri de

interacțiuni între factori care duc la rezultate ce aparent contrazic cele spuse mai sus (exemplu, la soiul Riesling italian, soi pentru vinuri albe, micropropagat pe MS-2,5 mg/l BAP numărul de lăstari obținuți este imediat în apropierea celui realizat la soiul Cabernet Sauvignon). Aceasta este o dovadă în plus că interacțiunea soi x mediu de cultură influențează în mod decisiv caracterul analizat.

3.2.1.2. Lungimea lăstarilor obținuți prin multiplicarea din segmente nodale

Analiza varianței pentru experiența trifactorială privind influența soiului, a mediului de cultură şi a localității asupra lungimii lăstarilor obținuți prin multiplicarea din segmente nodale este prezentată în tabelul 21.

Tabelul 21

Analiza varianței pentru experiența trifactorială de tipul 10 x 3 x 5 (soi x mediu de cultură x localitatea de proveniență)
(Influența soiului, mediului de cultură şi a localității asupra lungimii lăstarilor (cm) obținuți prin multiplicarea din segmente nodale la vița de vie)

Analysis of variant of three way Anova experiment 10 x 3 x 5 (cultivars x culture medium x provenance)

Cauza variabilității *Cause of variability*	SP *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** *F test*
Totală	886,16	449		
Parcele mari	200,36	29		
Repetiții	0,55	2		
Factorul A (soiul de viță de vie)	197,44	9	21,94	166,6**8>1,92; 2,50
Eroare (a)	2,369	18	0,132	
Parcele mijlocii	626,28	60		
Factorul B (mediul de cultură)	485,68	2	242,84	7238,86**>3,04; 4,71
Interacțiunea A x B	139,26	18	7,74	230,62**>1,62;2,09
Eroare (b)	1,342	40	0,0335	
Parcele mici	59,52	360		
Factorul C (localitatea de proveniență)	9,79	4	2,45	54,26** >2,41;3,41
Interacțiunea A x C	16,37	36	0,45	10,08** >1,45;1,69
Interacțiunea B x C	3,05	8	0,38	8,46**>1,98; 2,60
Interacțiunea A x B x C	19,47	72	0,27	5,99** >1,35;1,53
Eroare (c)	10,830	240	0,0451	

Ca şi în cazul numărului de lăstari, şi pentru lungimea lăstarilor obţinuţi prin culturi *in vitro* de segmente nodale, la cele zece soiuri de viţă de vie, pe trei medii de cultură diferite, se observă din datele prezentate în tabelul 21, că toţi factorii experimentali şi toate interacţiunile dintre aceştia (duble şi triplă) au efecte semnificative asupra acestui caracter.

Asemănător cazului anterior, rezultatele de sinteză vor fi prezentate sub formă de tabele bilaterale în care influenţa factorilor şi a interacţiunii dintre aceştia asupra caracterului analizat ies mai bine în evidenţă.

Influenţa soiului şi a mediului de cultură asupra lungimii lăstarilor de viţă de vie obţinuţi prin micropropagare din segmente nodale este prezentată în tabelul 22. Ca şi în cazul caracterului studiat anterior, pe primele două locuri se situează două soiuri pentru vin alb (Traminer roz: 5,55 cm şi Riesling italian: 4,98) urmat de data aceasta, la diferenţe semnificative, de un soi pentru vinuri roşii (Cabernet Sauvignon: 4,84 cm). Celelalte soiuri înregistrează valori mult mai mici ale caracterului studiat, ce ajung până la 3,40 cm la soiul de struguri de masă Timpuriu de Cluj.

Este evident, din datele cuprinse în tabelul 22, că şi în cazul lungimii lăstarilor genotipurile de viţă de vie reacţionează diferit la cultura *in vitro* de segmente nodale. Rezultatul era previzibil, deoarece o serie de lucrări anterioare semnalau reacţia diferită a soiurilor de viţă de vie în condiţii de cultură *in vitro* (IONESCU şi colab., 1992; SIVRITEPE şi colab., 1999).

Cel mai adecvat mediu de cultură, din punctul de vedere al lungimii lăstarilor obţinuţi prin micropropagare din segmente nodale, este MS – 2,5 mg/l BAP. Celelalte medii de cultură cu conţinut de BAP de 0,5-1,0 mg/l, dau rezultate mult mai slabe în ceea ce priveşte lungimea neoplantulelor obţinute, diferenţele faţă de cel mai bun mediu fiind semnificative.

Dacă se analizează interacţiunea între cei doi factori, cele mai bune rezultate se obţin la soiurile Traminer roz şi Cabernet Sauvignon, micromultiplicate pe mediul MS – 2,5 mg/l BAP, cu lungimi ale lăstarilor de aproape 8 cm. Toate celelalte variante de interacţiune sunt inferioare acestor două soiuri la diferenţe semnificative şi foarte semnificative. Foarte interesant, că în ceea ce priveşte lungimea lăstarilor, soiurile de

struguri de masă Timpuriu de Cluj şi Cetăţuia dau cele mai slabe rezultate indiferent de mediul de cultură utilizat.

Tabelul 22

Influenţa soiului (A), a mediului de cultură (B) şi a interacţiunii (A x B) asupra lungimii lăstarilor (cm) de viţă de vie obţinuţi prin micropropagare

Effect of cultivars (A), culture medium (B) and interaction (A x B) upon the length (cm) of Vitis vinifera shoob obtained micropropagated

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi *Mean of cultivar***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	3,08 o	3,40 m	4,52 gh	**3,67 IJ**
Fetească regală	3,26 n	3,55 lm	4,57 gh	**3,79 I**
Muscat Ottonel	3,70 k	3,94 j	4,76 f	**4,13 H**
Riesling italian	3,54 lm	4,50 h	6,89 c	**4,98 E**
Traminer roz	3,22 n	5,22 e	8,22 a	**5,55 D**
Cabernet Sauvignon	3,58 l	3,79 k	7,14 b	**4,84 F**
Napoca	3,72 k	3,99 j	4,54 gh	**4,08 H**
Cetăţuia	2,58 q	3,48 m	4,60 g	**3,55 J**
Timpuriu de Cluj	2,13 r	2,93 p	5,14 e	**3,40 K**
Merlot	2,95 p	4,13 i	6,13 d	**4,40 G**
Media mediu de cultură *Mean of culture medium*	**3,18 C***	**3,89 B**	**5,65 A**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,15-0,17
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,03
DS 5% pentru două medii soi x mediu cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,09-0,10

* Diferenţele dintre oricare două variante urmate de cel puţin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Analiza influenţei soiului şi a localităţii de proveniență a acestuia (tabelul 23) asupra lungimii lăstarilor obţinuţi prin culturi *in vitro* de segmente nodale, relevă faptul că între localităţi, deşi există diferenţe semnificative, acestea sunt exprimate în zecimi sau sutimi de mm ceea ce în mod practic, are o relevanţă mult mai scăzută. Această afirmaţie este susţinută de faptul că pentru toate localităţile, lungimea neoplantulelor obţinute prin culturi *in vitro* de segmente nodale este cuprinsă între 4,1 şi 4,4 cm.

Luând, totuşi, în considerare faptul că, între localităţi există diferenţe semnificative în ceea ce priveşte lungimea lăstarilor obţinuţi, se poate presupune că interacţiunea dintre genotip şi condiţiile mediului specific fiecărei localităţi are consecinţe evidente din punct de vedere statistic nu numai asupra numărului de lăstari obţinuţi în cultura *in vitro* de segmente nodale ci şi asupra lungimii acestora. Natural că aceste consecinţe ştiinţifice sunt rezultatul unor diferenţe reale a reacţiei genotipurilor în strictă dependenţă de originea lor.

Tabelul 23

Influenţa soiului (A), a localităţii de proveniență (C) şi a interacţiunii (A X C) asupra lungimii (cm) lăstarilor de viţă de vie obţinuţi prin micromultiplicare

Effect of cultivars (A), provenance (C) and interaction (A x C) upon the length (cm) of shoots of Vitis vinifera by micropropagation

Soiul *Cultivar*	Localitatea de proveniență *Provenance*					**Media soi *Mean of cultivar***
	Blaj	Recaş	Odobeşti	Iaşi	Valea Călugărească	
Fetească albă	3,91rst	3,15 w	3,47 vz	3,97 prs	3,83 stu	**3,67 IJ**
Fetească regală	4,03 nopr	3,51 vz	3,86 rst	3,65 uv	3,91 rst	**3,79 I**
Muscat Ottonel	4,32 lm	3,94 rst	4,05 nopr	4,16 mnop	4,20 mno	**4,13 H**
Riesling italian	4,75 hij	4,89 gh	4,88 gh	5,10 ef	5,27 d	**4,98 E**
Traminer roz	4,99 fg	5,68 c	5,08 ef	6,09 a	5,92 b	**5,55 D**
Cabernet Sauvignon	4,59 jk	4,87 gh	4,64 ij	5,16 de	4,94 fgh	**4,84 F**
Napoca	3,97 prs	3,97 prs	4,20 mno	4,07 nopr	4,22 mn	**4,08 H**
Cetăţuia	3,57 vz	3,53 vz	3,57 vz	3,53 vz	3,57 vz	**3,55 J**
Timpuriu de Cluj	3,1 w	3,13 w	3,43 z	3,58 vz	3,77 tu	**3,40 K**
Merlot	4,01 oprs	4,16 klm	4,42 kl	4,66 gh	4,78 hi	**4,40 G**
Media localitate *Mean of provenance*	**4,12 C***	**4,08 C**	**4,16 B**	**4,40 A**	**4,44 A**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,15-0,17
DS 5% pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 0,06-0,07
DS 5% pentru două medii soi x localitate (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,17-0,23

* Diferenţele dintre oricare două variante urmate de cel puţin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Analiza influenței mediului de cultură şi a localității de proveniență a materialului biologic (cultivarelor) asupra lungimii lăstarilor obținuți prin micropropagarea din segmente nodale (tabelul nr. 24) este mult simplificată de faptul că, pe baza datelor din tabelele anterioare, atât efectele mediului de cultură cât şi cel al localității au fost analizate. Din aceste motive ne vom mărgini să relevăm doar efectul interacțiunii celor doi factori arătând că, pentru toate localitățile luate în studiu, cele mai ridicate valori ale lungimii lăstarilor s-au obținut pe mediul MS – 2,5 mg/l BAP, la diferențe asigurate statistic față de oricare altă combinație între cei doi factori.

Tabelul 24

Influența mediului de cultură (B), a localității de proveniență (C) şi a interacțiunii (B x C) asupra lungimii (cm) lăstarilor de viță de vie obținuți prin micromultiplicare

Effect of culture medium (B), provenance (C) and interaction (B x C) upon the length of shoots (cm) of Vitis vinifera obtained by micropropagation

Localitatea de proveniență *Provenance*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media localității *Mean of provenance***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Blaj	3,08 j	3,85 g	5,44 c	**4,12 C**
Recaş	3,00 k	3,86 f	5,39 c	**4,08 C**
Odobeşti	3,20 i	3,72 g	5,56 b	**4,16 B**
Iaşi	3,30 h	3,96 e	5,93 a	**4,40 A**
Valea Călugărească	3,30 h	4,08 d	5,95 a	**4,44 A**
Media mediu de cultură ***Mean of culture medium***	**3,18 P***	**3,89 N**	**5,65 M**	

DS 5% pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 0,06-0,07
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,03
DS 5% pentru două medii localitate x mediu cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,08-0,11

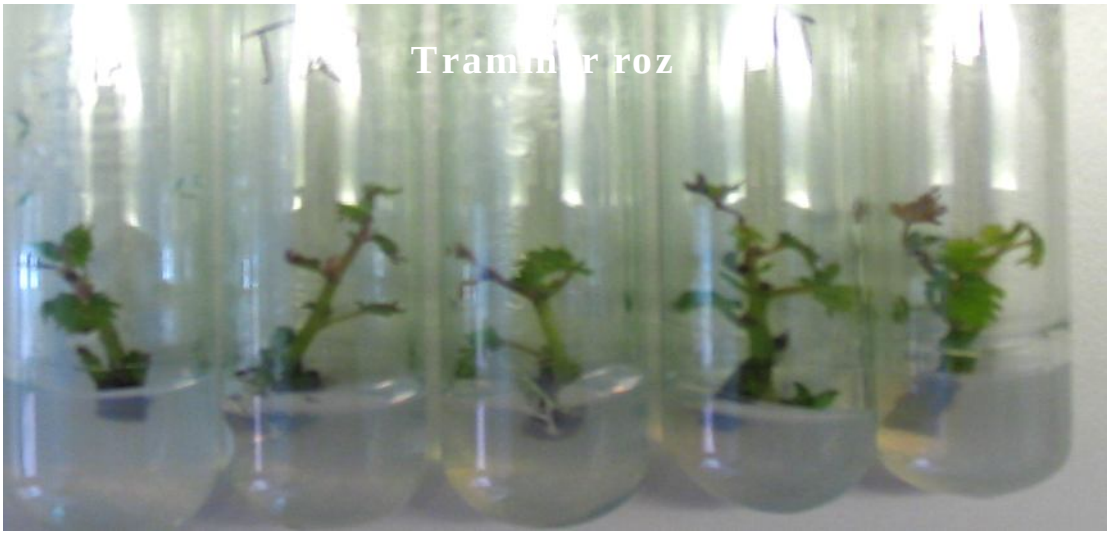
* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Concluzionând datele din acest subcapitol se poate afirma că:

Soiul, mediul de cultură şi localitatea de proveniență ale soiului au influențat în mod semnificativ lungimea lăstarilor obținuți prin cultura *in vitro* de segmente nodale, la vița de vie.

- Cea mai accentuată influență asupra caracterelor menționate o are mediul de cultură, de departe mediul MS – 2,5 mg/l BAP ducând la obținerea celor mai bine dezvoltate neoplantule obținute prin cultura *in vitro* de segmente nodale, la diferențe semnificative de oricare alte variante de mediu.

- Faptul că şi între localitățile de proveniență ale cultivarelor există diferențe semnificative în ceea ce priveşte lungimea lăstarilor obținuți prin micromultiplicarea din segmente nodale poate fi explicat prin nivelele diferite de interacțiune dintre genotip şi mediul său specific, diferențe ce se concretizează în probabilitatea de dezvoltare mai accentuată sau mai puțin accentuată a neoplantulelor în culturile *in vitro* (fig. 24).



Blaj	Iaşi	Odobeşti	Valea Călugărească	Recaş
4,99 cm	6,09 cm	5,08 cm	5,92 cm	5,68 cm

Fig. 24. Lungimea medie a lăstarilor la soiul de viță de vie Traminer roz obținuți prin multiplicarea din segmente nodale

Average shoot length (cm) of cultivar Traminer rose obtained from micropropagated nodal segements

3.2.1.3. Numărul de noduri/neoplantulă observat în urma micromultiplicării din segmente nodale la vița de vie

Ca şi în cazul celor două caractere analizate anterior, tabelul varianței pentru influența soiului, mediului de cultură şi a localității asupra numărului de noduri/neoplantulă obținute prin micromultiplicare din segmente nodale, la vița de vie, arată o probă F ce scoate în evidență acțiunea distinct semnificativă a tuturor factorilor şi interacțiunilor dintre factori (tabelul 25).

Prezentarea rezultatelor de sinteză se face, şi în cazul acestui caracter, prin tabele de contigență între doi factori.

Tabelul 25

Analiza varianței pentru experiența trifactorială de tipul 10 x 3 x 5 (soi x mediul de cultură x localitate de proveniență)
(Influența soiului, mediului de cultură şi a localității asupra numărului de noduri obținuți prin micromultiplicare din segmente nodale la vița de vie)

The three way Anova type experiment 10 x 3 x 5 (cultivars x culture medium x provenance)

Cauza variabilității *Cause of variability*	SP *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Parcele mari	531,47	29		
Repetiții	1,03	2		
Factorul A (soiul de viță de vie)	525,96	9	58,44	234,93**>1,92; 2,50
Eroare (a)	4,478	18	0,249	
Parcele mijlocii	1557,29	60		
Factorul B (mediul de cultură)	1091,20	2	545,60	2716,53**>3,04;4,71
Interacțiunea A x B	458,05	18	25,45	126,70**>1,62;2,09
Eroare (b)	8,034	40	0,2008	
Parcele mici	78,57	360		
Factorul C (localitatea de proveniență)	14,37	4	3,59	54,62**>2,41;3,41
Interacțiunea A x C	19,13	36	0,53	8,08**>1,45;1,69
Interacțiunea B x C	2,99	8	0,37	5,69**>1,98;2,60
Interacțiunea A x B x C	26,29	72	0,37	5,55**>1,35;1,53
Eroare (c)	15,789	240	0,0658	

In tabelul 26 se prezintă influența soiului şi a mediului de cultură asupra numărului de noduri prezentat de neoplantulele obținute prin cultura *in vitro* din segmente nodale. Rezultatele urmează îndeaproape modelul descris la lungimea lăstarilor, lucru absolut firesc dacă se ține cont de faptul că, în general, lăstarii de lungimi mai mari au şi noduri mai multe.

Tabelul 26

Influența soiului (A), a mediului de cultură (B) şi a interacțiunii (A x B) asupra numărului de noduri/neoplantule obținut prin micromultiplicare din segmente nodale la vița de vie

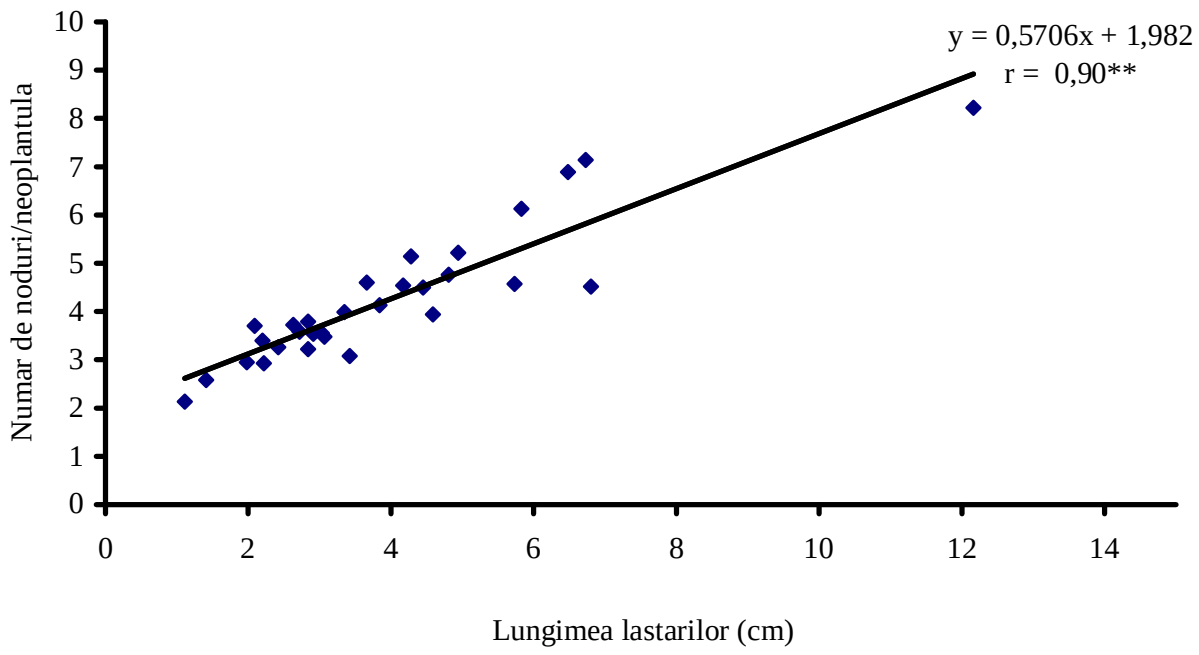
The effect of cultivar (A), culture medium (B) and interaction (A x B) upon the number of nodes/neoplants obtained in Vitis vinifera by micropropagation from nodal semgments

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi** ***Mean of cultivar***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	3,42 k	2,20 o	6,80 b	**4,14 C**
Fetească regală	2,42 n	3,03 lj	5,73 d	**3,72 D**
Muscat Ottonel	2,09 op	4,59 f	4,81 e	**3,83 D**
Riesling italian	2,91 jk	4,45 g	6,48 c	**4,61 B**
Traminer roz	2,84 kl	4,94 e	12,16 a	**6,65 A**
Cabernet Sauvignon	2,72 lm	2,84 kl	6,73 b	**4,10 C**
Napoca	2,63 m	3,35 k	4,17 h	**3,38 E**
Cetățuia	1,41 r	3,07 l	3,66 j	**2,71 F**
Timpuriu de Cluj	1,11 s	2,22 o	4,28 h	**2,54 F**
Merlot	1,98 p	3,84 i	5,83 d	**3,88 D**
Media mediu de cultură ***Mean of culture medium***	**2,35 P***	**3,45 N**	**6,07 M**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,21-0,24
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,11-0,14
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,14-0,17

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Analizând influența soiului asupra numărului de noduri/neoplantulă se observă că, între cele zece soiuri luate în studiu, există diferențe semnificative privind acest caracter. Cel mai mare număr de noduri/neoplantulă se înregistrează la soiul Traminer



roz (6,65 noduri/neoplantulă) urmat, la diferențe semnificative, de soiul Riesling italian (4,61 noduri/neoplanutulă). Ordinea variantelor celor mai bune pentru acest caracter este identică cu cea înregistrată la lungimea neoplantulelor fapt ce vine în sprijinul afirmației anterioare privind corelația directă şi pozitivă (r = 0,90**) între lungimea neoplantulei şi numărul de noduri pe care îl formează, aşa cum reiese din figura 25.

Fig. 25. Linia şi ecuația de regresie a numărului de noduri/neoplantulă în funcție de lungimea (cm) lăstarilor de viță de vie obținuți prin micropropagare

Regression line and equation for number of nodes/neoplants and length of shoots (cm) obtained by micropropagated

Numărul cel mai scăzut de noduri/neoplantulă se înregistrează la soiurile de struguri de masă Cetățuia şi Timpuriu de Cluj, inferior tuturor celorlalte soiuri testate la diferențe asigurate statistic.

Mediul de cultură a influențat în mod şi mai evident decât soiurile numărul de noduri/neoplantulă înregistrat în experiență. Mediul MS – 2,5 mg/l BAP duce la

formarea unor neoplantule cu cel mai mare număr de noduri (6,07) celelalte două medii plasându-se mult sub valoarea menționată mai sus (mediul MS – 0,5 mg/l BAP = 2,35 noduri/neoplantulă, iar mediul MS – 1,0 mg/l BAP = 3,45 noduri/neoplantulă).

Analiza datelor din interiorul tabelului 26 privind interacțiunea celor doi factori (soi x mediu de cultură) şi influența acesteia asupra numărului de noduri/neoplantulă, scoate în evidență un lucru foarte interesant: la soiul Traminer roz pe mediul MS - 2,5 mg/l BAP s-au obținut neoplantule cu 12,2 noduri/neoplantulă, valoare ce este practic dublă față de cele ale efectului soiului (6,65 noduri/neoplantulă) şi mediului (6,07 noduri/neoplantulă) asupra respectivului caracter. Aceste date sugerează clar că, prin alegerea atentă a soiurilor şi a mediului de cultură pot fi obținute, în procesul de micropropagare la vița de vie, variante de lucru în care numărul de noduri să fie foarte mare asigurându-se astfel o rată de multiplicare superioară.

Datele din tabelul 27 relevă faptul că, între provenienţele cultivarelor care au furnizat explantele, există diferenţe semnificative în ceea ce priveşte numărul de noduri/neoplantulă. Foarte probabil această diferenţiere semnificativă a reacţiei soiurilor în funcţie de provenienţa lor se datoreşte, în cazul numărului de noduri/neoplantulă, dimensiunilor diferite ale neoplantulelor, înregistrate în funcţie de originea cultivarelor. Fără a încerca să explicăm cauzele reale ale acestei variaţii, vom arăta că cel mai mare număr de noduri/neoplantulă s-a obţinut, la toate soiurile, atunci când acestea proveneau din staţiunile Iaşi şi Valea Călugărească. Provenienţele de Odobeşti, Recaş şi Blaj dau neoplantule cu număr semnificativ mai mic de noduri decât provenienţele de Iaşi şi Valea Călugărească, cu menţiunea că aceste diferenţe sunt de ordinul zecimilor.

Datele din interiorul tabelului 27 privind analiza interacţiunii soiului şi localităţii asupra numărului de noduri/neoplantulă evidenţiază, din nou, un soi pentru vinuri albe şi anume Traminer roz care, la neoplantulele formate prin micromultiplicare din segmente nodale, a realizat neoplantule cu mai mult de şapte noduri/neoplantulă valoare ce este aproape dublă sau chiar mai mult decât dublă faţă de majoritatea celorlalte valori din interiorul tabelului, aceste diferenţe fiind asigurate statistic.

Din tabelul 28 care prezintă influența interacțiunii dintre localitate şi mediu de cultură asupra numărului de noduri/neoplantulă, se vor analiza doar datele din interiorul tabelului, dat fiind faptul că influența factorului mediu de cultură şi influența factorului proveniență au fost discutate la tabelele anterioare.

Tabelul 27

Influența soiului (A), a localității de proveniență (C) şi a interacțiunii (A x C) asupra numărului de noduri/neoplantulă obținut prin micromultiplicare din segmente nodale la vița de vie

The effect of cultivar (A), provenance (C) and interaction (A x C) upon the number of nodes/neoplantlet in Vitis vinifera obtained by micropropagation from nodal segments

Soiul *Cultivar*	Localitatea de proveniență *Provenance*					**Media soi *Mean of cultivar***
	Blaj	Recaş	Odobeşti	Iaşi	Valea Călugărească	
Fetească albă	4,30 i	3,63 nop	3,97 jk	4,47 fghi	4,33 hi	**4,14 C**
Fetească regală	3,87 jklmn	3,50 op	3,92 jklm	3,63 nop	3,70 mno	**3,72 D**
Muscat Ottonel	4,02 j	3,67 mno	3,63 nop	3,87 jklmn	3,96 jkl	**3,83 D**
Riesling italian	4,34 hi	4,64 efg	4,56 fgh	4,69 ef	4,82 e	**4,61 B**
Traminer roz	5,83 d	6,70 b	6,23 c	7,30 a	7,17 a	**6,65 A**
Cabernet Sauvignon	3,74 klmno	4,02 j	3,98 jk	4,42 ghi	4,32 hi	**4,10 C**
Napoca	3,16 q	3,11 qr	3,57 op	3,40 p	3,68 mno	**3,38 E**
Cetățuia	2,71 lmno	2,61 t	2,72 st	2,77 st	2,74 st	**2,71 F**
Timpuriu de Cluj	2,26 u	2,29 u	2,53 t	2,71 st	2,90 rs	**2,54 F**
Merlot	3,49 op	3,71 lmno	3,70 mno	4,24 i	4,28 i	**3,88 D**
Media localității *Mean of provenance*	**3,77 P***	**3,79 P**	**3,88 N**	**4,15 M**	**4,19 M**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,21-0,24
DS 5% pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 0,08-0,09
DS 5% pentru două medii soi x localitate (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,22-0,29

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Tabelul 28

Influența localității de proveniență (C), a mediului de cultură (B) şi a interacțiunii (B x C) asupra numărului de noduri/neoplantulă obținut prin micromultiplicare din segmente nodale la vița de vie

The effect of provenance (C), culture medium (B) and interaction (B x C) upon the number of nodes/neoplantlet in Vitis vinifera obtained by micropropagation of nodal segments

Localitatea de proveniență *Provenance*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media localității *Mean of provenance***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Blaj	2,31 h	3,27 e	5,74 c	**3,77 C**
Recaş	2,09 i	3,41 e	5,87 bc	**3,79 C**
Odobeşti	2,34 gh	3,31 e	5,99 b	**3,88 B**
Iaşi	2,47 fg	3,59 d	6,38 a	**4,15 A**
Valea Călugărească	2,55 f	3,68 d	6,34 a	**4,19 A**
Media mediu de cultură *Mean of culture medium*	**2,35 P***	**3,45 N**	**6,07 M**	

DS 5% pentru două medii localitate (*SD 5% for two means of provenance*) = 0,08-0,09
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,11-0,14
DS 5% pentru două medii localitate x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,14-0,18

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Interacțiunea dintre mediul de cultură şi localitatea de proveniență a cultivarului care a furnizat explantul evidențiază valori mari şi foarte mari (6,34-6,38 noduri/plantă) obținute pentru numărul de noduri/neoplantulă la provenientele de Iaşi şi Valea Călugărească, atunci când acestea sunt micropropagate din segmente nodale pe mediul MS – 2,5 mg/l BAP. Deoarece pe acest mediu toate soiurile au reacționat extrem de pozitiv în ceea ce priveşte numărul de noduri/neoplantulă recomandăm utilizarea acestuia în micropropagarea viței de vie prin segmente nodale (fig. 26).

Fig. 26. Plante de viță de vie obținute din segmente nodale pe mediul de cultură MS – 2,5 mg/l BAP, la opt săptămâni de la inoculare

Plants regenerated from nodal segments of Vitis vinifera on MS – 2,5 mg/l BAP, 8 weeks after inoculation

Sintetizând rezultatele prezentate în acest subcapitol se pot conchide următoarele:

- Soiul de viță de vie, mediul de cultură utilizat şi locul de proveniență al cultivarului ce a furnizat explantul, precum şi interacțiunile dintre aceşti trei factori au influențat în mod semnificativ numărul de noduri/explant obținut în urma micromultiplicării prin segmente nodale.

- În toate cazurile analizate, atât pentru influențele factorilor cât şi pentru influențele interacțiunilor dintre aceştia, numărul de noduri/neoplantulă a reprodus fidel modelul de variație înregistrat pentru lungimea lăstarilor (neoplantulelor).

- Aceste rezultate confirmă observația generală că, la vița de vie, numărul de noduri/neoplantulă este corelat direct şi pozitiv cu dimensiunile (lungimea) neoplantulelor respective, lăstarii mai lungi având tendința de a forma un număr mai mare de noduri.

3.2.2. Rezultate obținute în experiențele de inducere a calusogenezei

Variabilitatea somaclonală este asociată adesea cu regenerarea directă din calus sau din suspensii de celule (KARP, 1989). Se apreciază că există o strânsă legătură între parcurgerea fazei de calus şi variabilitatea somaclonală, fapt ce a determinat ca, în micropropagare în scop de înmulțire fidelă a materialului inițial, să se evite formarea calusului. Cu toate acestea, în literatura de specialitate se menționează că apariția variabilității somaclonale nu este limitată la regenerarea din calus, ci ea poate să se producă şi la plantele regenerate prin embriogeneză directă (EVANS, 1988).

Având în vedere că unul din obiectivele tezei a fost acela al studierii variabilității somaclonale la vița de vie, în experiențele executate în acest sens a fost indusă etapa de formare a calusului.

Pentru inducerea calusogenezei s-au utilizat, ca şi sursă de explante, segmente nodale şi fragmente de frunze (fig. 27). Segmentele nodale au fost dimensionate la circa 0,5 cm şi au fost plasate orizontal pe suprafața mediului. Atât segmentele nodale, cât şi fragmentele de frunze au fost prelevate de la plantulele obținute *in vitro*.

În cazul culturilor de fragmente de organe pe medii corespunzătoare şi în anumite condiții de lumină, temperatură, umiditate, se induce dediferențierea celulelor diferențiate care vor intra în diviziune. Treptat, structura organului fragmentat se pierde şi se transformă în calus, respectiv într-o masă de celule de tip parenchimatic (BADEA şi colab., 2001).

Cantitatea de calus produsă şi natura calusului depind de specie, tipul de explant, de regulatorii de creştere utilizați în mediul de cultură şi, uneori, de condițiile de incubare (XU şi colab., 2005; DE SILVA şi colab., 2006). Nu se cunosc exact nutrienții necesari pentru formarea calusului, deci şi alți componenți mai pot fi adăugați în mediu: hidrolizatul de cazeină, extract de malț, extract de drojdii sau lapte de nucă de cocos (PIERIK, 1987). Mediul standard MS (1962) sau modificat este cel mai adesea utilizat. Zaharoza şi glucoza, în concentrație de 2-4%, sunt cel mai adesea folosite ca sursă de carbon.

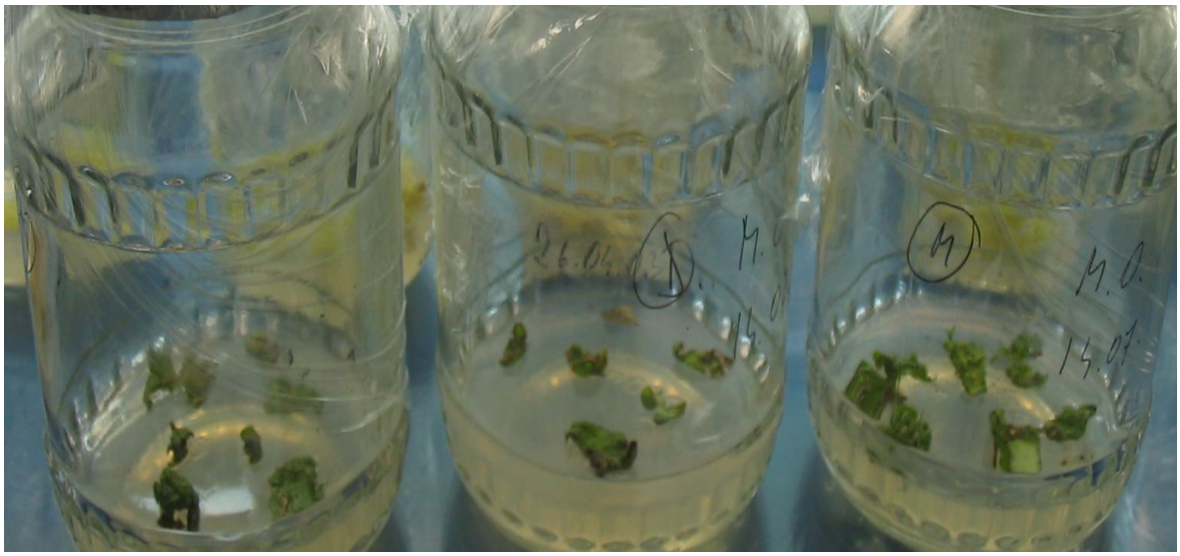


Fig. 27. Inițierea *in vitro* a calusului la vița de vie din fragmente de frunze

Initiation in vitro culture of Vitis vinifera from leaf explants

Un calus friabil, morfogenetic, a fost bine dezvoltat după 45 de zile de la inocularea *in vitro* a segmentelor nodale. Explantele dimensionate din porțiunea limbului foliar în care nervura principală a frunzei a fost bine reprezentată au generat o cantitate mai redusă de calus. De asemenea, multe explante s-au necrozat sau au dat naştere unui calus moale, nefriabil care nu a mai putut fi utilizat în continuare (tabelul 29).

În concluzie, putem menționa faptul că, pentru continuarea experiențelor de inducere a variabilității somaclonale, sursa de explant cea mai bună pentru producția de calus a fost reprezentată de segmentele nodale.

Rata de inducere a calusului a variat în funcție de concentrația de ANA utilizată. Similar, şi alți autori au observat o creştere a masei calusului prin adăugarea în mediul de cultură a unei concentrații mai mari de auxină, respectiv 21,5 µM ANA şi a citochininei izopentiladenina (2 iP) în concentrație de 0,25 µM (CACHIȚĂ, 1984). Concentrația de ANA 10 mg/l, utilizată de noi în mediile de cultură, a dat naştere unui calus friabil, în timp ce concentrația mai mică, respectiv de 5 mg/l ANA a dus la obținerea unui calus nefriabil şi în cantitate foarte mică.

Tabelul 29

Comportare segmentelor nodale şi a porțiunilor de frunză utilizate ca explante în experiențele de inducere a calusogenezei la zece soiuri de viță de vie

Behaviour of nodal and leaf segments used as explants in callus induction in ten vine cultivars

Specificare *Specification*	Tip explant *Type explant*	
	Segmente nodale *Nodal segments*	Porțiuni de frunză *Leaf segments*
Formarea de calus moale, friabil *Soft and friable callus*	foarte sporadic *verry sporadic*	în mod frecvent *frequent*
Necrozarea în masă a explantelor *Mass necrosis of explants*	-	generală pentru toate soiurile *general for all varieties*
Cantitatea de calus formată *Callus quantity obtained*	Variabilă *Variable*	mică şi foarte mică *small and verry small*

Țesutul calusal a crescut la suprafața mediului nutritiv formând o masă amorfă de celule parenchimatice cu pereți subțiri, fără o anumită structură anatomică. Masa de calus a avut diferite culori: albă, gălbuie, galbenă-verde, roşie, cenuşie. Adesea peste aceste culori s-au suprapus pigmentări de culoare roşie, violacee, roză (fig. 28).

De obicei, în cultura de repicare de lungă durată, pe mediile care includ auxina 2,4 –D, țesuturile de calus îşi pierd pigmentarea şi devin mai poroase (PALII, 2004).

Formarea, creşterea şi aspectul calusului sunt dependente de natura şi concentrația regulatorilor de creştere prezenți în mediul de cultură (CACHITA, 1984). Astfel, celulele țesutului calusal pot fi de consistențe diferite, dar în experiențele noastre acestea s-au încadrat în următoarele trei categorii:

- calusuri afânate (laxe), pline cu apă, nefriabile, grunjoase care se desfac uşor în celule independente;
- calusuri de constituție medie, cu zone meristematice bine evidențiate;
- calusuri compacte, cu zone de cambiu redus şi vase conducătoare.

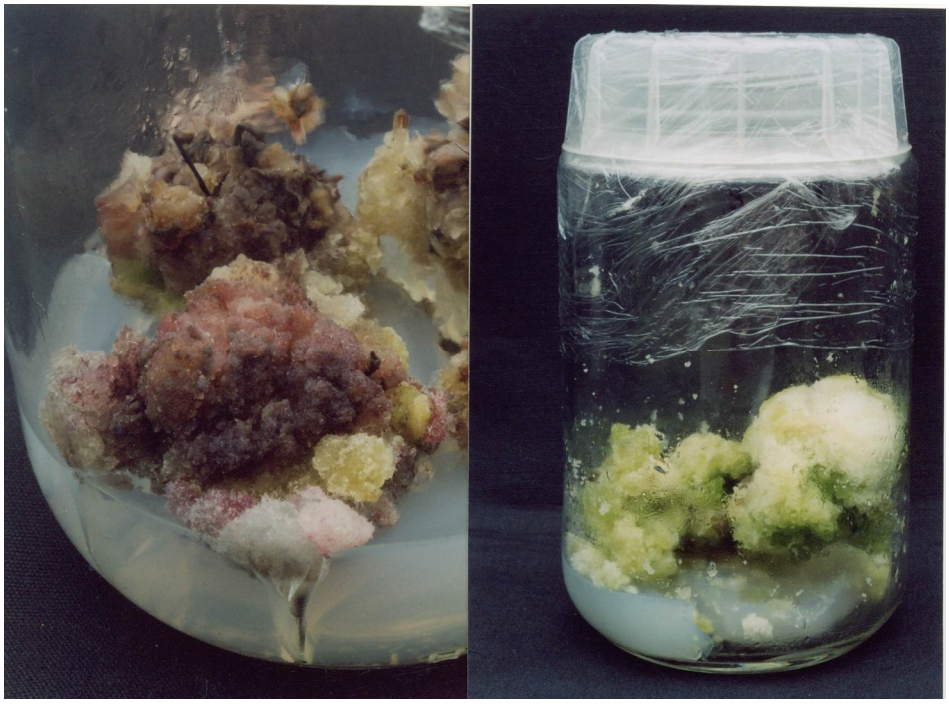


Fig. 28. Culoarea masei de calus obținută pe mediul de inducere a calusogenezei MS suplimentat cu ANA 10 mg/l

Callus color obtained on MS medium fortified with NAA 10 mg/l

Calusul embriogen are, de obicei, o culoare albă-gălbuie, aspect friabil, microglomerular, nisipos. Microsocopic, culoarea deschisă denotă absența cloroplastelor caracteristice calusului embriogen. Consistența friabilă, microglomerulară este dată de conglomeratele de celule izodiametrice cu caracter meristematic (meristemoizi) şi de embrioni glomerulari. Dimensiunile mici, aspectul de celule meristematice şi forma izodiametrică sunt însuşiri care permit recunoaşterea precoce a calusurilor embriogene (PALADA, 2004).

Pe mediul de cultură suplimentat cu 5,0 mg/l ANA, calusul a fost de culoare albă, alb-brunie, mai puțin friabil. Masa de calus a avut o creştere lentă (fig. 29).

Pe mediul de cultură suplimentat cu 10 mg/l ANA, calusul a avut o consistență compactă, cu mare densitate optică. Calusul a avut, de asemenea, mai multe culori: alb-lăptoasă, galbenă, galben-verde cu pigmentare roşie, violacee (fig. 30).

Fig. 29. Cultură de calus obținută pe mediul MS – 5,0 mg/l ANA

Callus culture on medium MS – 5,0 mg/l NAA

Fig. 30. Aspectul morfogenetic al calusului indus pe mediul de calusogeneză MS suplimentat cu ANA în concentrație de 10 mg/l ANA

Morphogenetic aspects of callus induction on MS medium fortified with NAA 10 mg/l

Literatura menționează că, de regulă, se generează mai mult calus din inoculi cultivați la întuneric decât din cei crescuți la lumină. Regiunile cu calus regenerativ sunt însă mai greu de depistat pe calusurile crescute la întuneric. Pe baza acestor considerente, în experiențele noastre de inducere a calusogenezei, formarea calusului s-a realizat la fotoperioda de 18 ore lumină/6 ore întuneric, la temperatura de 22-24^{0}C.

Prima subcultură de calus a fost obținută după patru săptămâni. În masa de calus obținută pe mediul de cultură cu 10 mg/l ANA s-a observat formarea unui calus mixt, conținând atât calus regenerativ cât şi neregenerativ. Din zona de calusul regenerativ s-au detaşat fragmente care au fost pasate pe medii proaspete. Din porțiunile de calus de tip regenerativ, pasate pe mediu adecvat s-au diferențiat apoi plante (fig. 31).

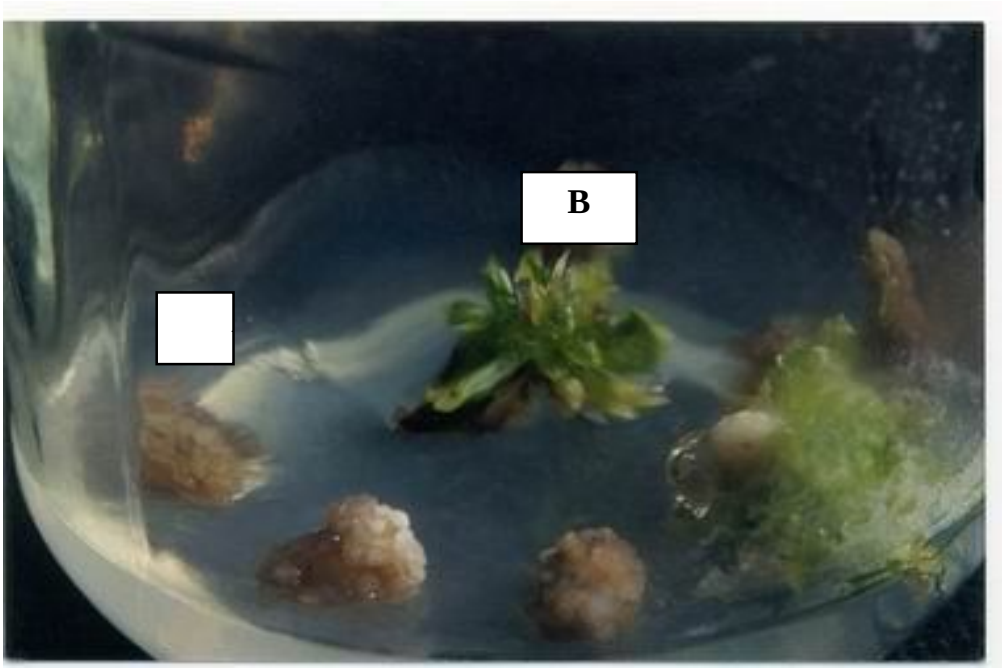


Fig. 31. Organogeneza la nivelul calusului. A- calus lipsit de organogeneză; B – calus cu caulogeneză

Organogenesis of callus A – non-organogenetic calli; B – organogenetic calli

Pentru a evita pierderea capacității de diviziune şi moartea celulelor, calusul, a fost transferat, periodic, pe medii proaspete. Transferul s-a realizat la intervalul de 5-6 săptămâni. În acest fel, rata de multiplicare şi numărul de plante regenerate din calus sunt practic menținute, la acelaşi nivel în primele şase subculturi. Începând cu cea de a şaptea subcultură, rata de regenerare exprimată prin numărul de plante regenerate/calus a manifestat o scădere evidentă.

La unele specii cum sunt gramineele (CACHIȚĂ, 1984), pierderea potențialului regenerativ al calusului survine mult mai devreme, adesea după 1-2 pasări ale acestuia.

3.2.2.1. Influenţa soiului şi a mediului de cultură asupra cantităţii de calus format în experienţele de inducere a calusogenezei

Din titlul acestui subcapitol reiese clar că, în acest tip de experienţe de calusogeneză, s-a folosit un model bifactorial în care factorul A = soiul (cu zece graduări reprezentate de cele zece soiuri) iar factorul B = mediul de cultură (cu trei graduări reprezentate de mediul MS fără adaos de citochinine şi MS cu două tipuri de citochinine).

Tabelul varianţei pentru greutatea calusului (tabelul 30) relevă, prin proba F, că soiurile au influenţat uniform şi semnificativ creşterea masei calusului după inducerea calusogenezei. În schimb mediul de cultură a avut un efect foarte semnificativ asupra creşterii masei calusului în experienţele de inducere a embriogenezei.

Tabelul 30

Tabelul varianţei. Greutatea calusului (g) în experienţa bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viţă de vie şi medii de cultură folosite în inducerea calusogenezei prin cultura *in vitro* de segmente nodale

Table of variance in two way type of experiment (10 x 3). Influence of cultivar and culture medium upon induced callusogenesis

Cauza *Cause*	SPA *SS*	GL *DL*	s^2	**Proba F** ***F test***
Totală	0,35	89		
Repetiţia	0,001696	2		
Varianţa	0,335985	29		
Factorul A (soiul)	0,006359	9	0,001	3,187* > 2,04; 2,72
Factorul B (mediul de cultură)	0,323421	2	0.162	729,341**>3,15; 4,98
Interacţiunea A x B	0,006205	18	0,018	1,555<1,81; 2,32
Eroare	0,013	58	0,0002	

Analiza rezultatelor propriu-zise privind greutatea calusului obţinut la cele zece soiuri de viţă de vie pe cele trei medii de cultură sunt prezentate în tabelul 31.

Datele din tabelul 31 pun în evidenţă faptul că, între cele zece soiuri testate există diferenţe semnificative în ceea ce priveşte greutatea calusului format în urma inducerii calusogenezei pe trei medii de cultură. Soiurile Cabernet Sauvignon şi

Riesling italian au cea mai mare cantitate de calus formată la patru săptămâni după prima pasare, la cealaltă extremă plasându-se soiurile Napoca şi Timpuriu de Cluj cu cele mai mici cantităţi de calus observate (0,152-0,153 grame). Celelalte soiuri ocupă poziţii intermediare din punctul de vedere al acestui caracter.

Tabelul 31

Greutatea calusului (g) în experienţa bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viţă de vie şi medii de cultură folosite în inducerea calusogenezei prin cultura *in vitro* de segmente nodale

Quantity of callus (g) in two way experiments (10 x 3) with cultivars of Vitis vinifera and culture medium used in inducted callusogenesis from in vitro culture of nodal segments

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi** ***Mean of cultivar***
	MS – fără citochinine	MS – 1,5 mg/l TDZ	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	0,230 bc	0,170 de	0,070 g	**0,157 CD**
Fetească regală	0,240 ab	0,168 de	0,090 fg	**0,166 B**
Riesling italian	0,250 a	0,175 de	0,080 fg	**0,168 B**
Muscat Ottonel	0,225 bc	0,179 de	0,090 fg	**0,165 BC**
Merlot	0,240 ab	0,178 de	0,080 fg	**0,166 B**
Cabernet Sauvignon	0,262 a	0,185 d	0,100 f	**0,182 A**
Traminer roz	0,210 c	0,173 de	0,103 f	**0,162 BC**
Timpuriu de Cluj	0,220 bc	0,159 e	0,080 c	**0,153 D**
Napoca	0,225 bc	0,162 de	0,070 g	**0,152 D**
Cetăţuia	0,212 c	0,170 de	0,090 fg	**0,157 CD**
Media mediu cultură ***Mean of culture medium***	**0,231 M***	**0,172 N**	**0,085 P**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,008-0,010
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,014-0,015
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,025-0,031

*Diferenţele dintre oricare două variante urmate de cel puţin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Mediului de cultură a avut cea mai mare influenţă asupra greutăţii calusului format.

La mediul trei, MS cu adaos de BAP, greutatea medie a calusului format este semnificativ mai mică decât la primele două medii. Rezultatele sunt normale dacă se are în vedere faptul că citochininele, în mod general, induc caulogeneza şi nu

favorizează creşterea calusului decât atunci când sunt folosite în concentraţii foarte mari.

Analiza datelor din interiorul tabelului 31 confirmă semnificaţia ridicată, din punct de vedere statistic, a efectului interacţiunii asupra greutăţii masei calusului la patru săptămâni după prima pasare. Se observă, din aceste date, că cele mai mari cantităţi de calus se obţin pe mediul de cultură MS – fără citochinine. Astfel, pe acest mediu de cultură soiul Cabernet Sauvignon formează un calus cu greutatea de 0,262 grame, urmat de soiul Riesling italian cu un calus cu greutate de 0,250 grame. Cele mai mici cantităţi de calus s-au obţinut la soiul Traminer roz, greutatea calusului fiind de 0,210 grame.

Se poate concluziona, din analiza datelor prezentate în acest capitol, că greutatea calusului format în urma primei pasări pe medii calusogene, la cele zece soiuri de viţă de vie studiate, depinde în mod decisiv de mediu de cultură şi într-o mică măsură de interacţiunea soi x mediu de cultură.

Adăugarea în mediu de cultură MS a 1,5 mg TDZ/l duce la diferenţe semnificative în greutatea calusului format, dar şi la deosebiri evidente de calitate a calusului. Pe mediul MS cu TDZ, calusul format este mai friabil şi are o capacitate calusogenă mai ridicată.

3.2.3. Rezultate experimentale privind regenerarea de neoplantule din calus menţinut timp îndelungat în cultură

Capacitatea organogenă sau embriogenă a ţesutului calusal este dependentă de factorii endogeni şi exogeni, de numărul pasărilor, de condiţiile de cultură şi de vârsta calusului. Literatura citează cazuri în care calusurile repicate periodic, chiar şi după o perioadă de cinci ani şi-au menţinut potenţialitatea ridicată de a regenera plante. În cazul calusului obţinut de noi la viţa de vie, capacitatea regenerativă s-a menţinut pentru o perioadă mult mai scurtă, de circa 7-8 luni.

NABORS (1982), citat de CACHIŢĂ (2000), distinge un calus de tip regenerativ, embriogen care dă naştere la noi plante şi un calus de tip neregenerativ, neembriogen care are o creştere luxuriantă, din el diferenţiindu-se rădăcini, uneori muguraşi, dar niciodată plante întregi.

Calusul embriogen, regenerativ este dens optic, translucid sau opac, de culoare albă-lăptoasă, spre galbenă sau galben-verde. Citologic, se remarcă zone compacte, cu celule nediferențiate, ce pot genera embrioni sau embrioizi, din care apoi se vor dezvolta plante complet conformate.

Calusul neembriogen este constituit dintr-o masă cristalină, transparentă, de culoare albă, brunie sau verde. Acest tip de calus are o consistență mai laxă, fiind mai friabil, desfăcându-se mai uşor în pachete de celule. Regiunile friabile prezintă celule mari, mult vacuolizate. Din aceste regiuni pot apare rădăcini, mai rar muguraşi, dar nu şi plante.

S-a constat că tipul de calus regenerativ – embriogen tinde să devină neregenerativ – neembriogen. După producerea acestei schimbării procesul este definitiv, întrucât cele două forme sau tipuri de calus, diferite funcțional, nu sunt interconvertibile. De asemenea, cele două tipuri de calus necesită hormoni diferiți, în doze variate, atât pentru impulsionarea şi susținerea creşterii cât şi pentru diferențiere.

In experiențele noastre, după circa 7 – 8 luni, de pasări repetate, calusul regenerativ a devenit neregenerativ. După acest moment calusul şi-a menținut creşterea abundentă la fiecare pasare pe mediu proaspăt. Creşterea acestui tip de calus a fost continuată pe o durată de circa patru ani în cultura *in vitro* (fig. 32). Deşi în literatura se citează cazuri cu totul izolate în care calusul neregenerativ poate forma regiuni regenerative în anumite condiții de mediu, acest lucru nu a fost semnalat de noi în experiențele de inducere a variabilității somaclonale la vița de vie prin regenerarea de neoplantule din calus menținut timp îndelungat în cultură.

3.2.3.1. Numărul de neoplantule regenerate

Experiențele de regenerare de neoplantule din calus menținut timp îndelungat în cultură (3-4 pasări) au fost şi ele de tip bifactorial cuprinzând cele zece soiuri de viță de vie menționate anterior şi trei medii de cultură MS la care s-au adăugat cantități diferite de TDZ: 0,5 mg/l, 1,0 mg/l şi 2,0 mg/l. Aceste variante de mediu au fost alese pe baza datelor din literatura de specialitate care menționează faptul că adaosul de cantități mici şi moderate de TDZ în mediul de cultură stimulează regenerarea de

neoplantule din calusul organogen, mai ales la speciile lenoase şi recalcitrante.

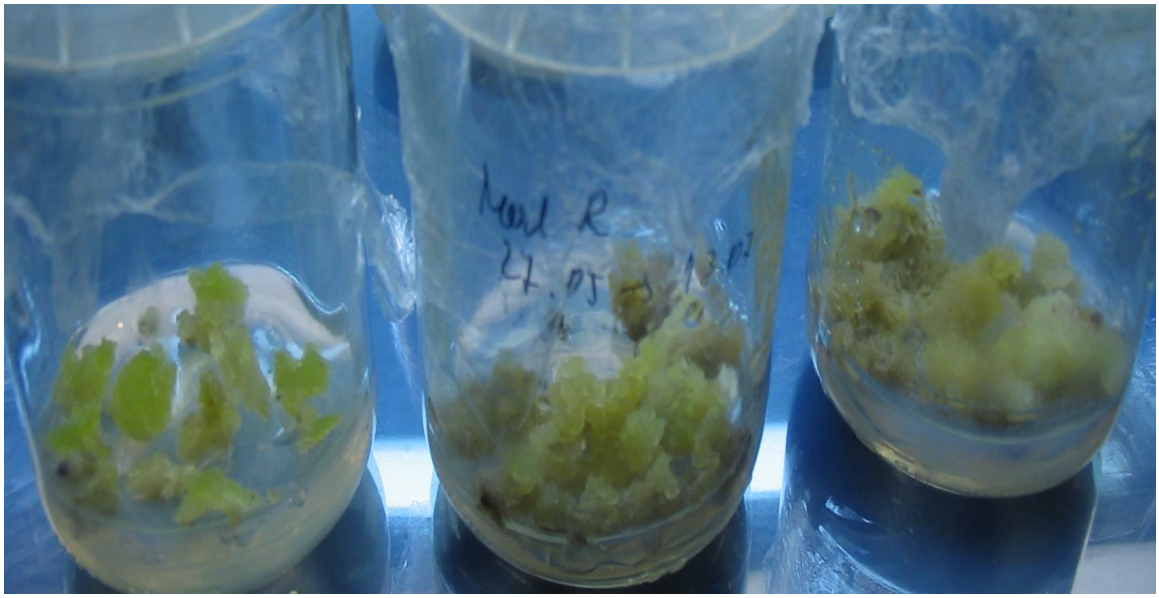


Fig. 32. Creşterea luxuriantă a calusului neregenerativ

Luxuriantly growing of non regenerative callus

Din tabelul 32 (tabelul variantelor) se observă că toţi factorii experimentali (soi, mediu de cultură), precum şi interacţiunea soi x mediu de cultură au avut influenţe semnificative asupra numărului de neoplantule regenerate.

Cel mai puternic efect asupra numărului de neoplantule regenerate l-a avut factorul B, respectiv mediul de cultură, cu F calculat = 21484,8, foarte semnificativ. Sinteza rezultatelor obţinute privind numărul de lăstari regeneraţi este prezentată în tabelul 33.

Analizând influenţa soiului asupra numărului de lăstari regeneraţi se observă, din datele tabelului 33, că aceasta este relativ omogenă, toate soiurile regenerând un număr de 8,13 până la 9,60 lăstari/calus regenerativ. Deşi la prima vedere acest număr pare mare, trebuie menţionat faptul că, în comparaţie cu numărul de regeneranţi din calus înregistrat la alte specii (de exemplu la *Kigelia pinnata* L, THOMAS şi colab., 2004; la *Saintpaulia ionantha* Wendl., MITHILA şi colab., 2003; la *Lisianthus russelianus* Hook, POP şi colab., 2007), aceste valori pot fi considerate ca mici sau moderate.

Tabelul 32

Tabelul varianței. Numărul de neoplantule regenerate în experiența bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viță de vie şi medii de cultură folosite în regenerarea de neoplantule din calus

Table of variance. Number of plant regenerated from callus in two way experiment (10 x 3) with cultivars of Vitis vinifera on culture media

Cauza *Cause*	SPA *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Totală	3233,42	89		
Repetiții	5,56	2		
Variante	3223,57	29		
Factorul A	16,90	9	1,9	25,4** > 2,04; 2,72
Factorul B	3177,12	2	1588,6	21484,8**> 3,15; 4,98
Interacțiunea A x B	29,55	18	1,6	22,2**> 1,81; 2,32
Eroare	4,29	58	0,1	

Deşi între soiuri există diferențe semnificative, acestea nu afectează omogenitatea datelor, ele bazându-se pe valori ale DS 5% foarte reduse pentru un caracter cum este numărul de regeneranți (0,14-0,17).

Situația este cu totul alta în ceea ce priveşte efectul mediului asupra numărului de regeneranți. De la început trebuie menționat faptul că adaosul de TDZ de 2,0 mg/l mediu de cultură are un efect negativ asupra numărului de regeneranți format datorită faptului că, la această concentrație de TDZ, mediul favorizează formarea de calus şi nu formarea de neoplantule (fig. 33).

Cel mai stimulativ efect asupra numărului de neoplantule regenerate l-a avut mediul cu adaos mic de TDZ (0,5 mg/l) la care se obțin cele mai mari valori ale numărului de regeneranți (fig. 34).

Tabelul 33

Numărul de neoplantule regenerate în experiența bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viță de vie şi medii de cultură folosite în regenerarea de neoplantule din calus

Number of plants regenerated in two way experiment (10 x 3) with Vitis vinifera cultivars and culture media

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi *Mean of cultivar***
	MS – 1,0 mg/l TDZ	MS – 2,0 mg/l TDZ	MS - 0,5 mg/l TDZ	
Fetească albă	4,50 g	4,20 gh	15,70 c	**8,13 F**
Fetească regală	6,50 d	3,70 h	18,60 a	**9,60 A**
Muscat Ottonel	5,30 f	4,50 g	18,70 a	**9,50 AB**
Riesling italian	5,40 f	3,80 h	18,60 a	**9,27 C**
Traminer roz	4,50 g	3,90 gh	17,50 b	**8,63 E**
Cabernet Sauvignon	6,30 d	4,30 gh	17,50 b	**9,37 BC**
Napoca	5,50 ef	4,50 g	15,80 c	**8,60 E**
Cetățuia	5,70 def	3,80 h	17,30 b	**8,93 C**
Timpuriu de Cluj	5,80 def	4,50 g	16,80 b	**9,03 CD**
Merlot	6,10 de	3,97 gh	17,30 b	**9,12 D**
Media mediu cultură *Mean of culture medium*	**5,56 N***	**4,12 P**	**17,38 M**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,14-0,17
DS 5% pentru două medii de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,28-0,30
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,57-0,69

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Mediul cu concentrație moderată de TDZ (1,0 mg/l) are valori ale numărului de regeneranți mai mari decât cele obținute pe mediul doi, dar nediferențiate statistic de acestea. Se poate afirma că, la vița de vie, concentrațiile moderate şi mari de TDZ ale mediului de cultură influențează negativ numărul de neoplantule regenerate din calus organogen.

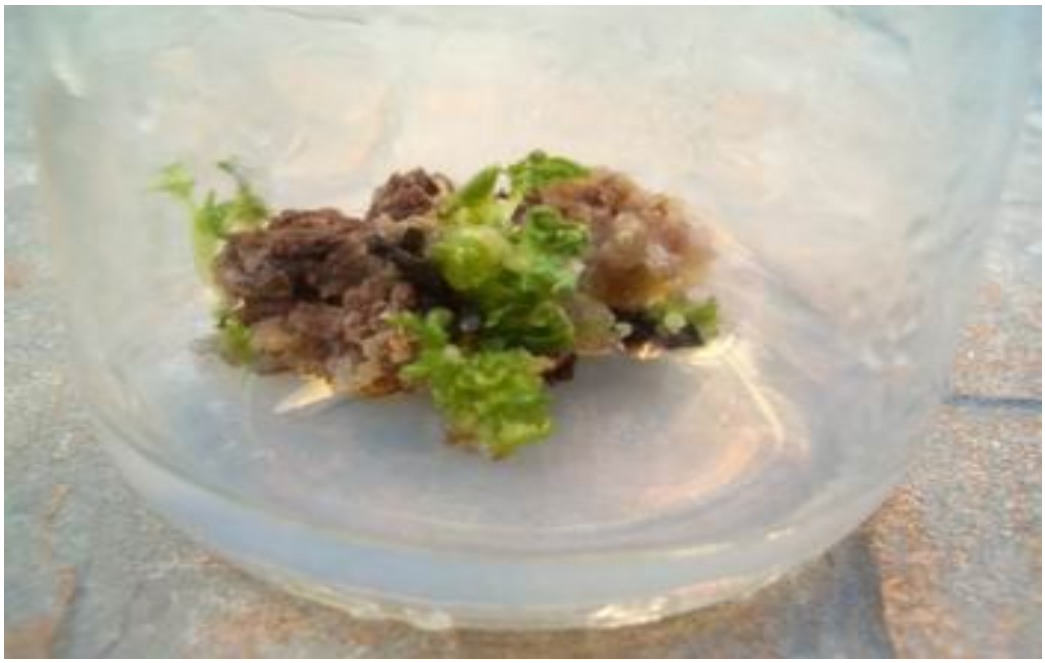


Fig. 33. Influența concentrației de TDZ (2,0 mg/l) asupra numărului de neoplantule regenerate *in vitro*

Influence of concentration TDZ (2,0 mg/l) upon number of plants regenerated in vitro

Fig. 34. Influența concentrației de TDZ (0,5 mg/l) asupra numărului de neoplantule regenerate *in vitro*

Influence of concentration TDZ (0,5 mg/l) upon the number of plants regenerated in vitro

3.2.3.2. Lungimea lăstarilor (neoplantulelor) regeneraţi

Datele tabelului 34 (tabelul varianţelor) prezintă semnificaţia acţiunii celor doi factori experimentali şi a interacţiunii dintre aceştia asupra lungimii regeneranţilor.

Se observă că, statistic, doar factorul B (mediul de cultură) a avut acţiune semnificativă asupra lungimii lăstarilor regeneraţi, soiul şi interacţiunea dintre soi şi mediu având F calculat mai mic decât F teoretic.

Tabelul 34

Tabelul varianţei. Lungimea regeneranţilor (cm) în experienţa bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viţă de vie şi medii de cultură folosite în regenerarea calusului

Table of variance. Length of regenerated plants (cm) in two way experiment (10 x 3) with cultivars of Vitis vinifera and culture media used in callus regeneration

Cauza *Cause*	SPA *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Totală	59,74	89		
Repetiţii	0,03467	2		
Variante	57,9773	29		
Factorul A (soiul)	0,27956	9	0,03	1,04 < 2,04; 2,72,
Factorul B (mediul de cultură)	57,0127	2	28,51	954,60**>3,15; 4,98
Interacţiunea A x B	0,68511	18	0,04	1,27<1,81, 2,32
Eroare	1,7	58	0,03	

Tabelul 35 prezintă sinteza rezultatelor experimentale privind lungimea lăstarilor regeneraţi din calus la cele zece soiuri de viţă de vie pe trei medii de cultură. Deşi conform probei F soiul şi interacţiunea soi x mediu de cultură nu ar fi trebuit analizate în acest tabel de sinteză, s-a preferat totuşi prezentarea lor, deoarece conform testului de semnificaţie folosit (Duncan), între mediile soiurilor precum şi între valorile individuale ale variantelor reieşite din combinarea graduărilor soiului cu graduările mediului există diferenţe semnificative. Acestea se datoresc, cu precădere tipului de test de semnificaţie folosit care a dus la calcularea unor valori DS 5% exprimate în sutimi de centimetru.

Tabelul 35

Lungimea (cm) a neoplantulelor regenerate în experiența bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viță de vie şi medii de cultură folosite în regenerarea de neoplantule din calus

Length (cm) of plants in the two way experiment (10 x 3) with cultivars of Vitis viniffera and culture media used in plant regeneration from callus

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi *Mean of cultivar***
	MS – 1 mg/l TDZ	MS – 2 mg/l TDZ	MS- 0,5 mg/l TDZ	
Fetească albă	1,47 bc	0,80 def	2,60 a	**1,62 B**
Fetească regală	1,37 c	0,70 ef	2,80 a	**1,62 B**
Muscat Ottonel	1,60 bc	0,80 def	2,73a	**1,71 A**
Riesling italian	1,60 bc	0,60 f	2,73 a	**1,64 B**
Traminer roz	1,57 bc	0,57 f	2,60 a	**1,58 C**
Cabernet Sauvignon	1,70 b	1,00 d	2,60 a	**1,77 A**
Napoca	1,63 bc	0,63 ef	2,53a	**1,60 B**
Cetățuia	1,60 bc	0,60 f	2,67 a	**1,62 B**
Timpuriu de Cluj	1,60 bc	0,70 ef	2,67 a	**1,66 B**
Merlot	1,50 bc	0,87 de	2,77 a	**1,71 A**
Media mediu cultură *Mean of culture medium*	**1,56 N***	**0,73 P**	**2,67 M**	

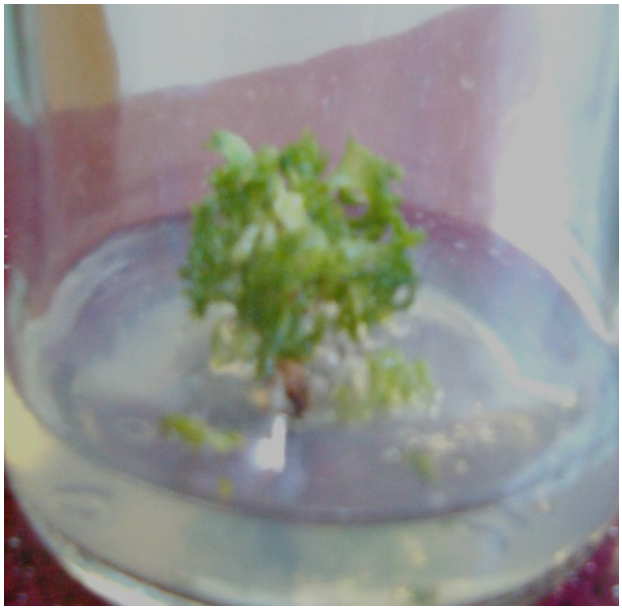
DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,08-0,110
DS 5% pentru două medii de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,17-0,18
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,28-0,35

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

Analiza influenței mediului asupra lungimii lăstarilor regenerați urmează aproape acelaşi model ca şi cel descris la numărul de lăstari regenerați. Concret, cea mai mare lungime a lăstarilor regenerați se înregistrează la mediul cu cea mai scăzută concentrație de TDZ (0,5 mg/l). Mediile cu concentrații moderate (1,0 mg/l) şi mari (2,0 mg/l) de TDZ duc la obținerea unor lăstari scurți şi foarte scurți comparativ cu varianta trei de mediu.

Pe baza acestor date se poate conchide că, la vița de vie, cel mai stimulativ mediu de cultură pentru obținerea din calus a unui număr mare de regeneranți şi de dimensiuni mari îl constituie mediul cu adaos redus de TDZ (0,5

mg/l). În figura 35 se observă diferențierea lăstarilor cu lungimi cuprinse între 2,53-2,80 cm pe mediul de cultură menționat anterior.



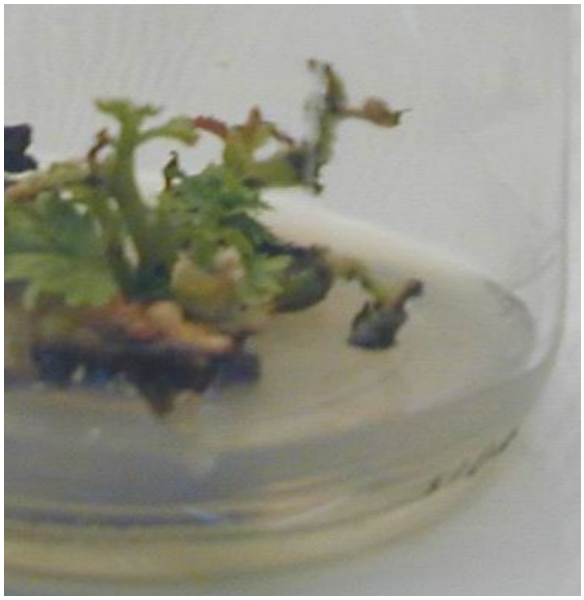


Fig. 35. Diferențierea lăstarilor de viță de vie pe mediul de cultură MS suplimentat cu TDZ - 0,5 mg/l

Shoot differentation on MS medium fortified with 0,5 mg/l TDZ

În finalul acestui subcapitol considerăm necesar să accentuăm următoarele aspecte:

- La vița de vie, concentrațiile moderate şi mari de TDZ ale mediului de cultură influențează negativ numărul de neoplantule regenerate din calusul organogen.
- Trebuie menționat faptul că efectul cel mai stimulativ asupra numărului de regeneranți şi a lungimii acestora îl are mediul cu adaos scăzut de TDZ (0,5 mg/l). Pe un astfel de mediu neoplantulele formate sunt în număr foarte mare, de lungimi apreciabile, dar total lipsite de rădăcini (fig. 36).
- Soiul de viță de vie nu a avut, practic, influențe semnificative asupra numărului regeneranților obținuți şi nici asupra lungimii acestora ceea ce ne permite să afirmăm că modul de comportare al calusului regenerativ, pe medul de cultură cu adaos de TDZ, este general valabil pentru toate soiurile de viță de vie încercate.

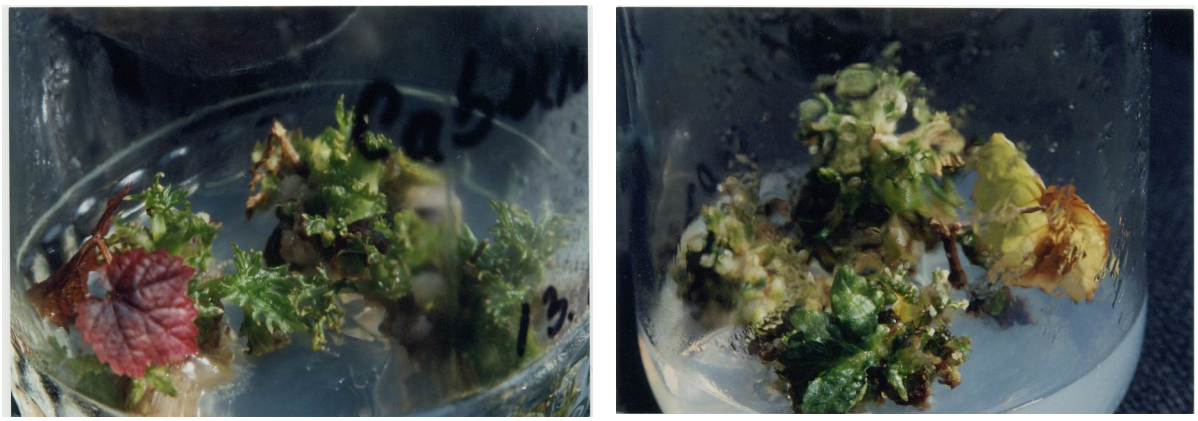


Fig. 36. Neoplantule de viță de vie formate pe mediul MS + 0,5 mg/l TDZ, după opt săptămâni de cultură *in vitro*

Neoplantlets formed in vitro in Vitis vinifera on MS + 0,5 mg/l TDZ medium, 8 weeks after initiation of culture

3.2.4. Rezultate privind identificarea, la nivel molecular, a variabilității somaclonale indusă prin regenerarea din calus menținut timp îndelungat în cultură

3.2.4.1. Rezultate privind extracția şi cuantificarea ADN-ului

Extracția de ADN s-a realizat pe baza protocolului elaborat de LODHI şi colab, modificat (POP şi colab., 2003).

Cantitatea de ADN obținută a fost corespunzătoare (220 ng/µl şi 1947 ng/µl), având în vedere că pentru amplificare s-au utilizat 50 ng. Puritatea ADN-ului a fost, de asemenea, corespunzătoare fiind cuprinsă între 1,7 şi 2,0.

Rezultatele numerice privind cantitatea de ADN şi puritatea acestuia la neoplantulele regenerate din calus care au prezentat variabilitate somaclonală, sunt prezentate în tabelul nr. 36.

Extracția de ADN s-a făcut, la neoplantulele regenerate, din calus din subcultura a 5-a, a 10-a şi a 15-a, în tabelul 36 fiind prezentate rezultatele privind cantitatea şi puritatea ADN-ului extras din neoplantulele regenerate din calus la a 15-a subcultură. ADN-ul extras la a 5-a şi a 10-a subcultură nu a prezentat nici un fel de polimorfism la nivel molecular, ceea ce denotă că, în fazele respective de regenerare,

nu se manifestase variabilitatea somaclonală.

Tabelul 36

Cantitatea şi puritatea ADN la somaclonele identificate la cinci soiuri de viţă de vie

The concentration and purity of DNA in somaclones identified in five Vitis vinifera cultivars

Soiul *Cultivar*	Somaclona *Somaclon variation*	Cantitatea de ADN ng/µl *Concentration of DNA ng/µl*	Puritate ADN (A_{260}/A_{280}) *Ratio of absorbance* (A_{260}/A_{280})
Cabernet Sauvignon	CR1	317	1,7
	CR2	245	1,8
	CR3	449	1,7
Fetească albă	F1	210	1,7
Merlot	Mr1	244	1,7
	Mr2	602	1,9
	Mr3	1091	1,9
	Mr4	1947	2,0
	Mr5	633	1,9
Traminer roz	T1	228	1,7
Riesling italian	Ri1	250	1,9
	Ri2	339	1,8
	Ri3	220	1,9

3.2.4.2. Rezultate privind amplificarea şi electroforeza produşilor de reacţie

Pentru amplificarea probelor s-au folosit cei 22 primeri care au dat benzi polimorfice în cazul extracţie de ADN pentru soiurile de viţă de vie recoltate din câmp (tabelul 6).

Amplificarea probelor s-a făcut în trei repetiţii pentru fiecare primer.

Aşa cum s-a mai menţionat, în subculturile cinci şi zece regeneranţii nu au prezentat variabilitate la nivel molecular. S-a constatat că neoplantule regenerate la subcultura a 15-a prezintă variabilitate la nivel molecular. Această variabilitatea a fost observată la un număr mic de soiuri (cinci), acestea prezentând un număr mic de somaclone. Cele mai multe somaclone au fost identificate la soiul Merlot (cinci).

În gelurile de agaroză mai întâi au fost pipetate probele de ADN aparţinând plantei mamă, urmate apoi de probele de ADN ale somaclonelor. Notaţiile din imagini fiind următoarele: Cabernet Sauvignon – CR (planta mamă), CR1, CR2, CR3; Fetească albă - F (planta mamă), F1; Merlot – Mr (planta mamă), Mr1, Mr2, Mr3, Mr4, Mr5; Traminer roz – T (planta mamă), T1 şi Riesling italian – Ri (planta mamă) Ri1, Ri2, Ri3.

Fragmentele rezultate prin amplificarea cu primerii polimorfici au avut lungimea cuprinsă între 200 şi 2000 pb, majoritatea având între 300 şi 1400 pb.

Numărul cel mai mare de benzi polimorfice au fost obţinute cu primerul OPX 03 (12 benzi) (fig. 37), cu primerul OPE 14 (11 benzi polimorfice), OPA 04 (10 benzi polimorfice), PB 6 (10 benzi polimorfice), (fig. 38), PB 1 (9 benzi polimorfice) (fig. 39), primerul PB 3 (7 benzi polimorfice) (fig. 40), primerul PB 5 (8 benzi polimorfice) (fig. 41), primerul 70.08 (6 benzi polimorfice) (fig. 42). Ceilalţi primeri utilizaţi au format de asemenea între şase şi nouă benzi polimorfice.

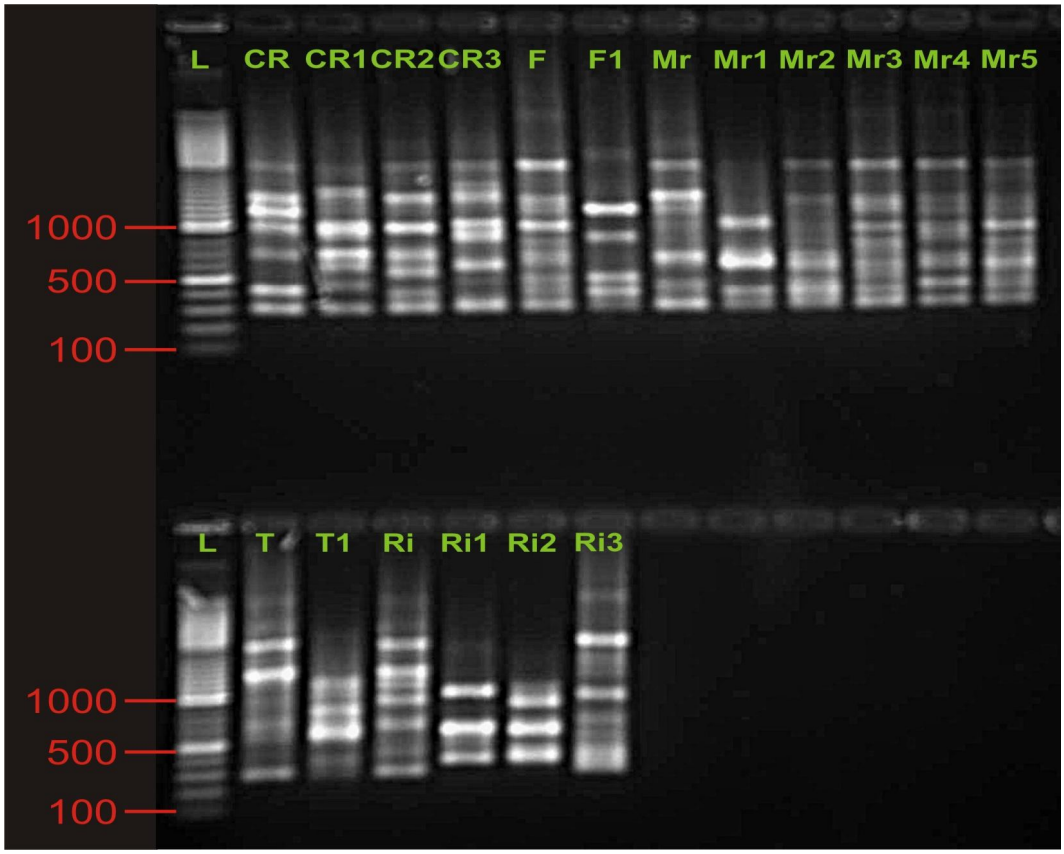


Fig. 37. Produşii de amplificare obţinuţi cu primerul OPX 03 la somaclonele de viţă de vie analizate

Amplification products obtained with primer OPX 03 in somaclones of Vitis vinifera analysed

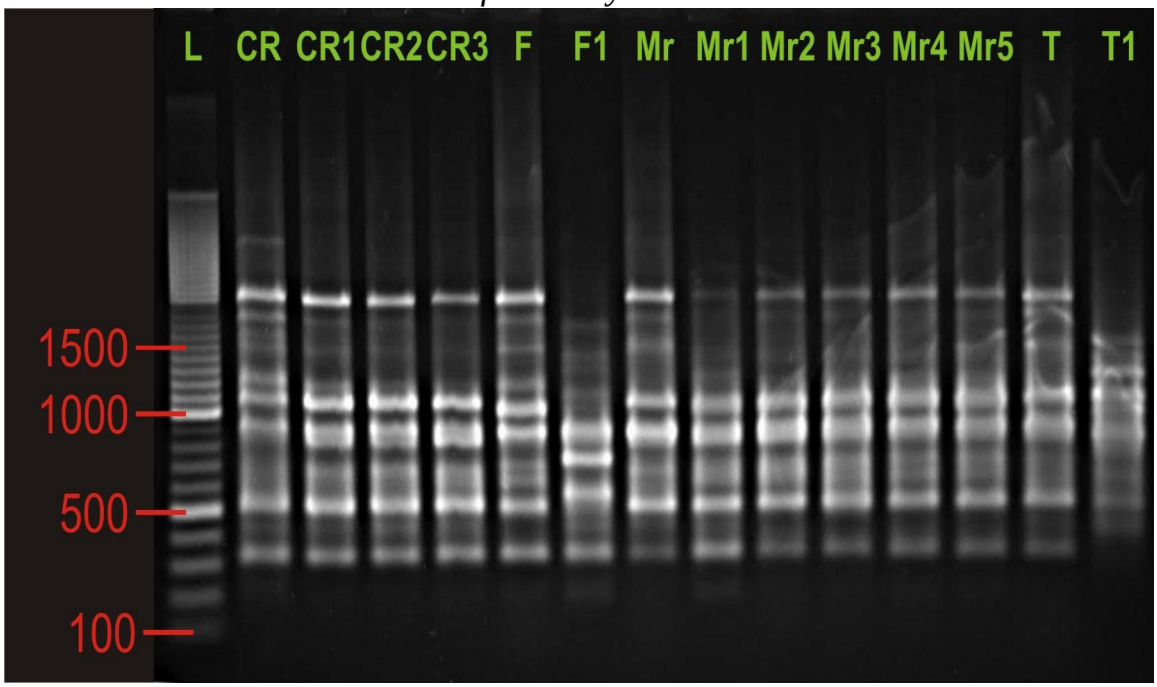


Fig. 38. Produşii de amplificare obținuți cu primerul PB 6 la somaclonele de viță analizate

Amplification products obtained with primer PB 6 im somaclones of Vitis vinifera analysed

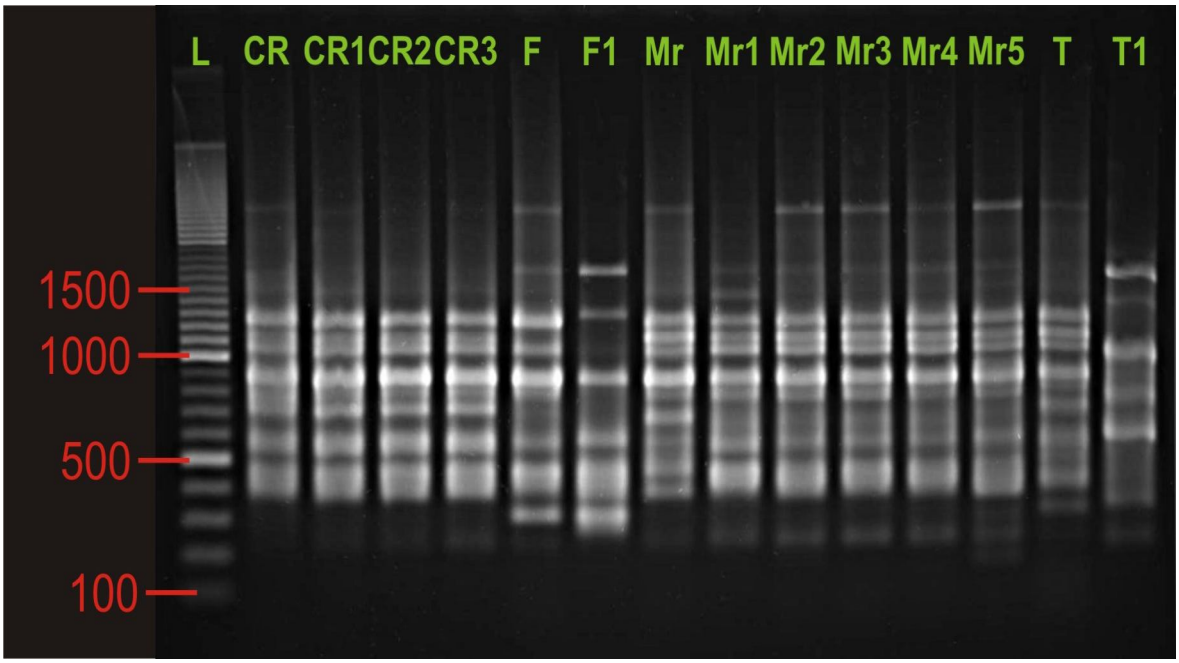


Fig. 39. Produşii de amplificare obținuți cu primerul PB 1 la somaclonele de viță de vie de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 1 in somaclones of Vitis vinifera analysed

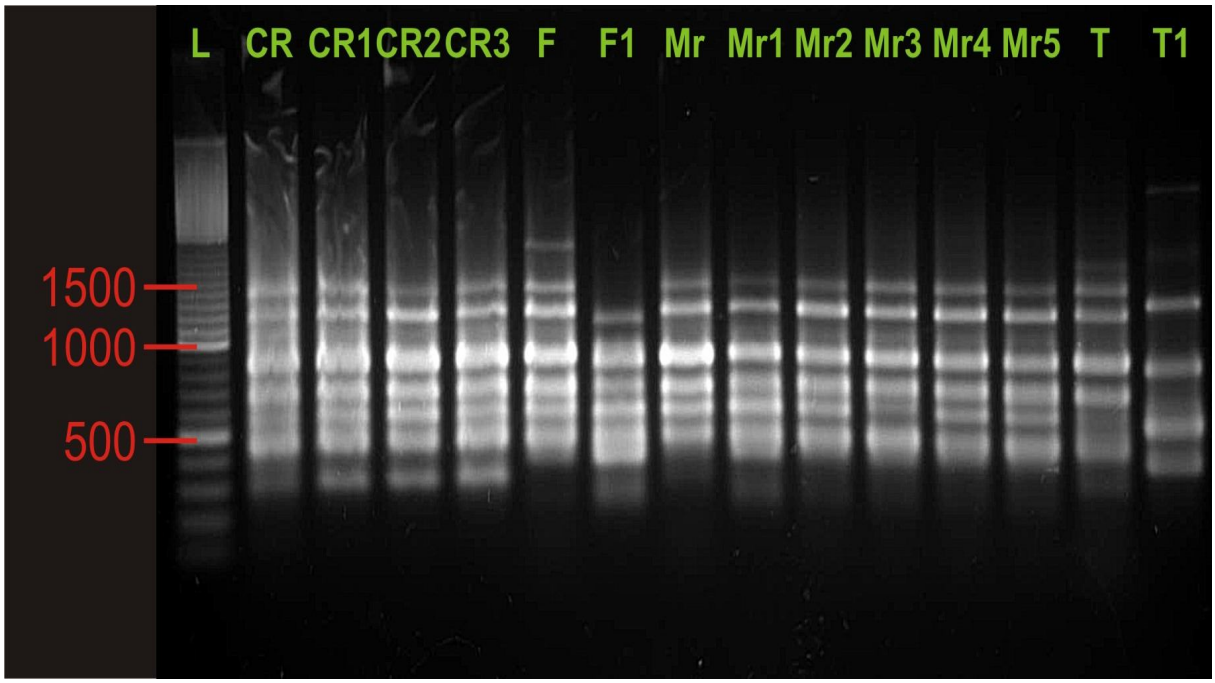


Fig. 40. Produşii de amplificare obţinuţi cu primerul PB 3 la somaclonele de viţă de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 3 in somaclones of Vitis vinifera analysed

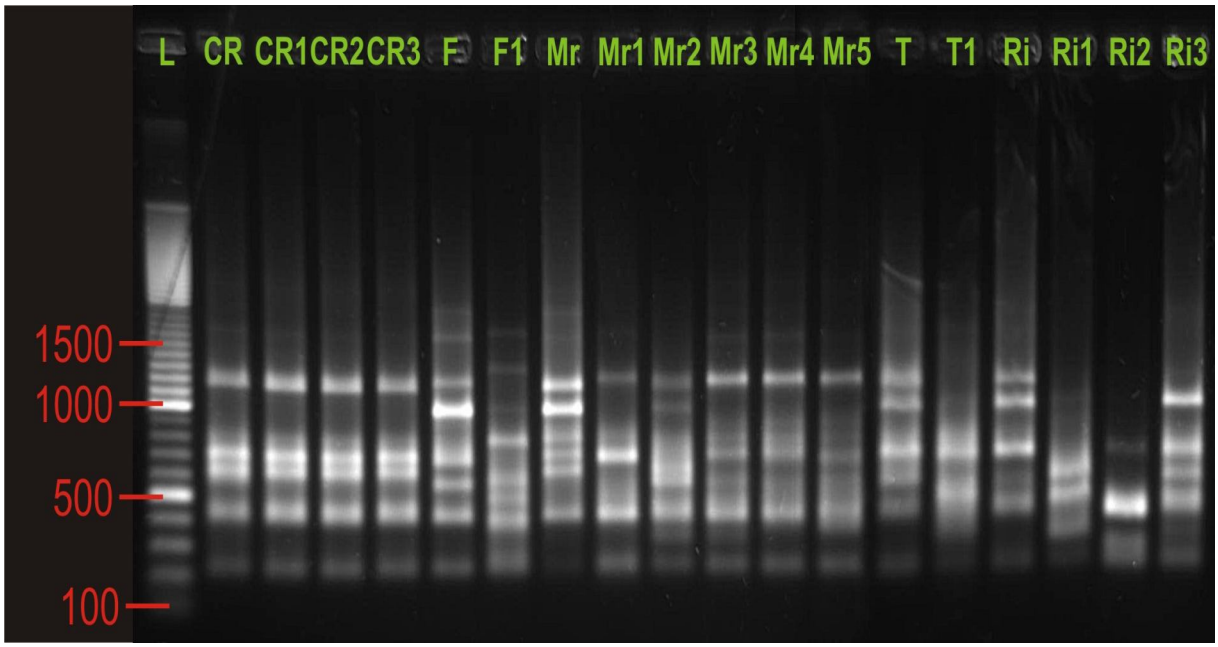


Fig. 41. Produşii de amplificare obţinuţi cu primerul PB 5 la somaclonele de viţă de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 5 in somaclones of Vitis vinifera analysed

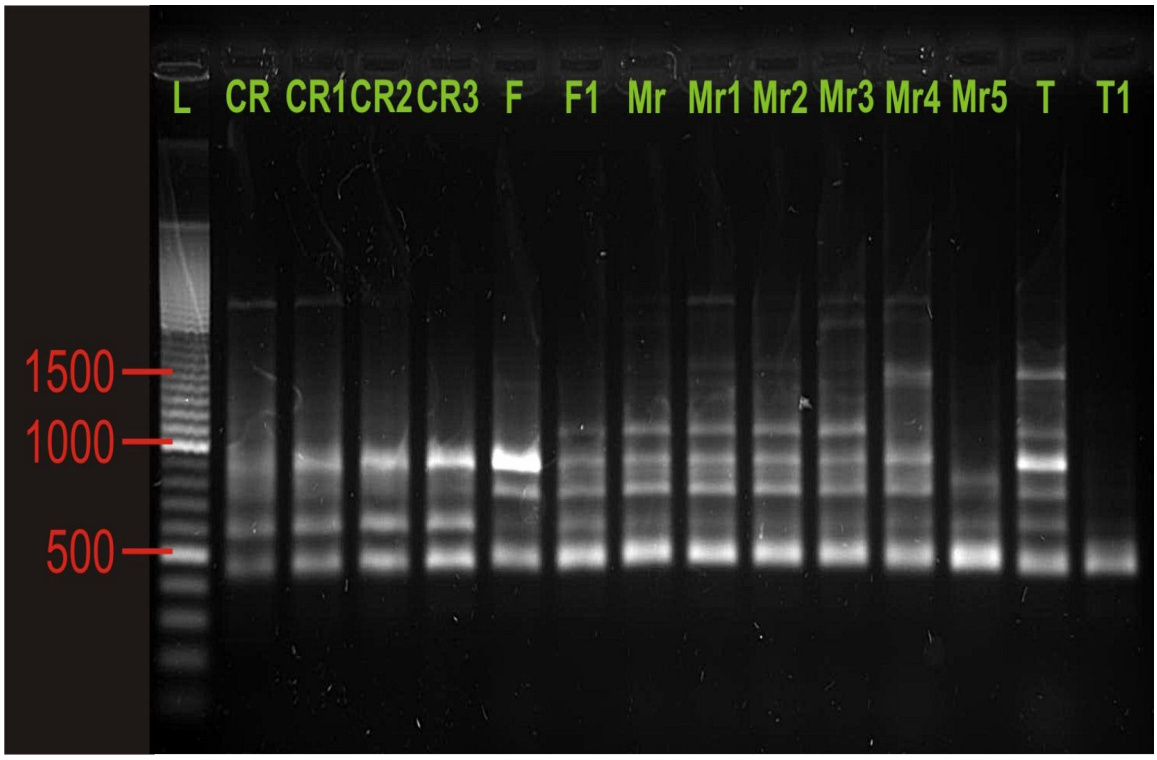


Fig. 42. Produşii de amplificare obținuți cu primerul 70.08 la somaclonele de viță de vie analizate

Amplification products obtained with primer 70.08 in somaclones of Vitis vinifera analysed

Din figurile prezentate reiese în mod clar că, la toate somaclonele analizate, există diferențe notabile de structură genetică, relevate de markeri RAPD. Dendrograma realizată pe baza distanțelor genetice dintre soi şi somaclonele sale ilustrează şi mai clar măsura în care, la nivel molecular, somaclonele se deosebesc de soiurile din care provin.

Datele primare, obținute cu ajutorul programului Total Lab 100 au fost prelucrate cu programul FreeTree (HAMPL şi colab., 2001), care a calculat distanțele genetice pe baza coeficientului Jaccard şi a generat dendrograma.

Distanțele genetice calculate sunt prezentate în tabelul 37. Cu cât valorile distanțelor genetice din tabel sunt mai mici, cu atât speciile şi somaclonele sunt mai strâns înrudite.

Apropierea genetică între soiurile de viță de vie şi somaclonele identificate în aceste soiuri, stabilită pe baza matricei distanțelor genetice şi a algoritmului Neighbor Joining Tree, sunt prezentate în figura 43 sub forma unei dendrograme.

În cadrul dendrogramei se evidențiază faptul că soiul de viță de vie şi somaclonele obținute din acel soi sunt apropiat grupate. De asemenea, se constată că soiurile Cabernet Sauvignon şi Merlot, împreună cu somaclonele lor sunt reprezentate în acelaşi subgrup, la fel ca şi în cazul dendrogramei obținute pentru cele zece soiuri de viță de vie analizate *in vivo* (vezi fig. 22). Un alt subgrup este format din soiurile şi somaclonele de Fetească albă şi Riesling italian, similar cu grupul reprezentat în dendrograma celor zece soiuri de viță de vie analizate.

Faptul că somaclonele fiecărui soi sunt strict reprezentate în acelaşi grup atestă acurateța rezultatelor experimentale obținute. Pe de altă parte, analiza dendrogramei în cadrul fiecărui grup relevă faptul că somaclonele sunt cu adevărat diferite din punctul de vedere al structurii genetice, atât în interiorul grupului cât şi între grupe.

Se poate afirma, pe baza rezultatelor discutate în acest subcapitol că analizele RAPD reprezintă un instrument sensibil de identificare, la nivel molecular, a variabilității somaclonale apărută la vița de vie în condițiile menținerii îndelungate a calusului prin subculturi *in vitro*. Este evident că somaclonele identificate cu ajutorul analizelor RAPD vor trebui, în mod obligatoriu, verificate în condiții *in vivo* pentru a vedea dacă variabilitatea observată la nivel molecular poate fi observată şi la nivel fenotipic. De asemenea, este important de văzut dacă variabilitatea fenotipică eventual observată se referă la caractere cantitative sau calitative de interes în ameliorarea viței de vie şi în ce măsură această variabilitate se transmite ereditar prin înmulțire sexuată sau, descendenților vegetativi, prin altoire.

Tabelul 37

Distanțele genetice calculate pentru cele cinci soiuri de viță de vie şi somaclonele lor

Genetic distances established for cultivars and theise somaclones of Vitis vinifera

	CR	CR1	CR2	CR3	F	F1	Mr	Mr1	Mr2	Mr3	Mr4	Mr5	T	T1	Ri	Ri1	Ri2	Ri3
CR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CR1	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CR2	0,804	0,782	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CR3	0,722	0,800	0,860	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F	0,600	0,619	0,655	0,672	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F1	0,381	0,409	0,450	0,443	0,492	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mr	0,684	0,645	0,655	0,644	0,639	0,422	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mr1	0,548	0,457	0,574	0,492	0,538	0,468	0,587	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mr2	0,571	0,641	0,623	0,639	0,689	0,516	0,717	0,609	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mr3	0,581	0,576	0,581	0,597	0,729	0,500	0,700	0,672	0,750	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mr4	0,565	0,609	0,565	0,581	0,712	0,484	0,772	0,603	0,891	0,807	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mr5	0,523	0,567	0,523	0,538	0,689	0,469	0,689	0,561	0,767	0,750	0,793	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T	0,638	0,656	0,638	0,655	0,650	0,452	0,650	0,500	0,619	0,683	0,667	0,594	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T1	0,338	0,368	0,318	0,294	0,338	0,344	0,379	0,379	0,343	0,388	0,394	0,403	0,324	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ri	0,500	0,548	0,579	0,542	0,541	0,417	0,541	0,469	0,590	0,574	0,583	0,540	0,576	0,250	0,00	0,00	0,00	0,00
Ri1	0,174	0,208	0,266	0,242	0,250	0,288	0,214	0,288	0,239	0,261	0,211	0,275	0,217	0,288	0,254	0,00	0,00	0,00
Ri2	0,250	0,303	0,290	0,328	0,355	0,316	0,313	0,400	0,381	0,365	0,393	0,359	0,317	0,250	0,322	0,353	0,00	0,00
Ri3	0,270	0,284	0,311	0,306	0,355	0,339	0,235	0,273	0,338	0,344	0,308	0,299	0,361	0,250	0,322	0,302	0,388	0,00

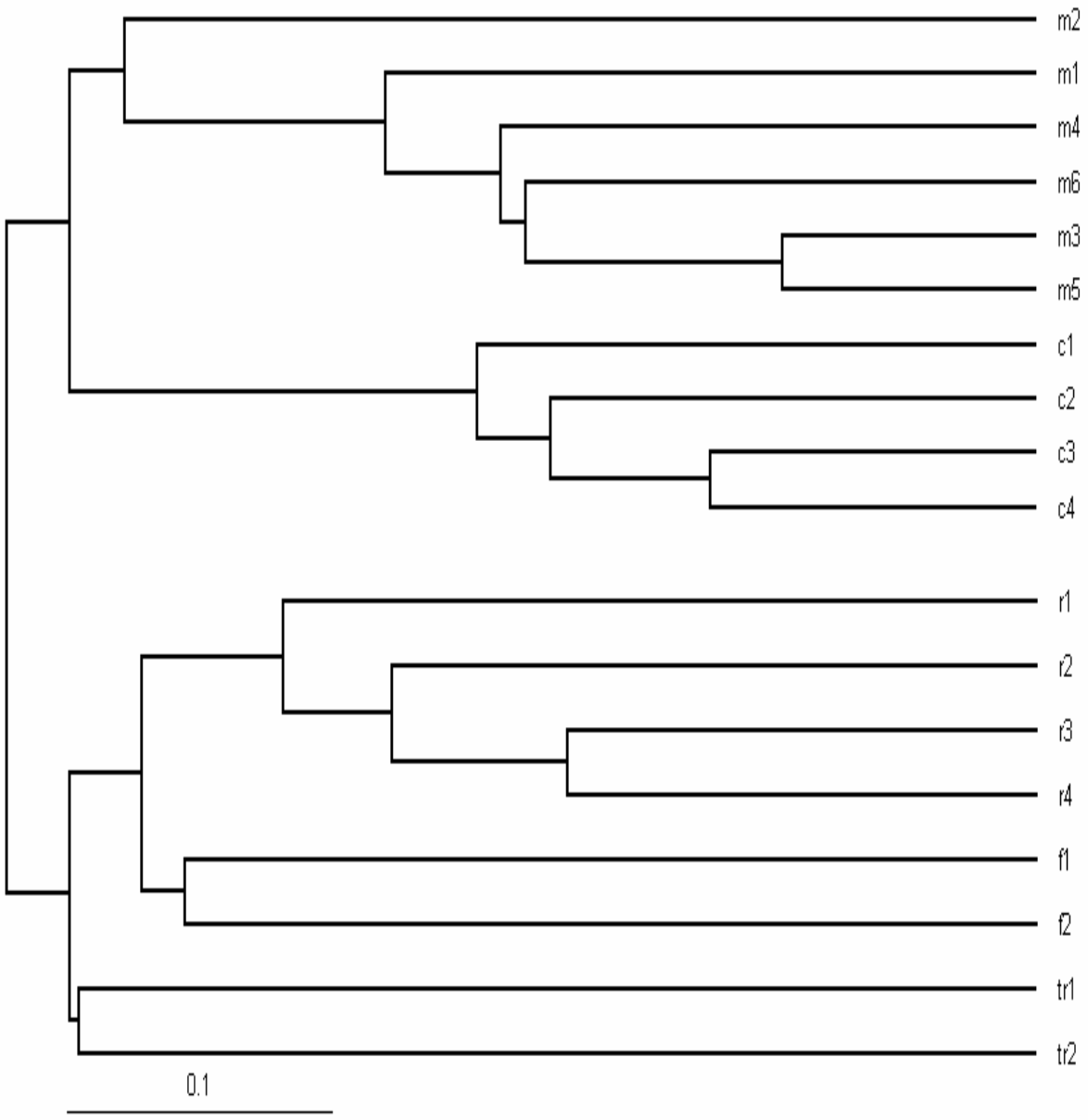


Fig. 43. Dendrograma obținută la soiurile şi somaclonele de viță de vie analizate

Dendrogram of cultivars and somaclones of Vitis vinifera analysed

CAPITOLUL IV

CONCLUZII

4.1. CONCLUZII REFERITOARE LA VARIABILITATEA, LA NIVEL MOLECULAR A MATERIALULUI BIOLOGIC PROVENIT *IN VIVO*

In urma cercetărilor noastre efectuate la nivel molecular la cele zece soiuri de viță de vie provenite din cinci localități, se desprind următoarele concluzii:

4.1.1. În analizele RAPD o condiție esențială o constituie obținerea unui ADN în cantități corespunzătoare şi de puritate mare. Dintre cele trei protocoale de extracție utilizate s-a dovedit că protocolul C a dat cele mai bune rezultate. Cu ajutorul acestui protocol, puritatea ADN-ului a avut valori cuprinse între 1,7 şi 2, puritate ce a permis utilizarea lui în manipulările ulterioare. Includerea în tamponul de extracție a inhibitorilor de fenoloxidază, cum ar fi acidul dietilenditiocarbamic (DIECA), a antioxidanților – acidul ascorbic sau a polivinil pirolidonei (PVP) au eliminat brunificarea extractului.

4.1.2. Din analiza varianței, aplicată rezultatelor de extracție a ADN, a reieşit că toți cei trei factori experimentali (soiul, metoda de extracție şi localitatea), au influențat distinct semnificativ cantitatea de ADN extrasă.

4.1.3. Între soiuri există diferențe asigurate statistic în ceea ce priveşte cantitatea de ADN obținută, indiferent de metoda de extracție aplicată, ceea ce sugerează că genotipul, la vița de vie, influențează în mod hotărâtor cantitatea de ADN ce poate fi extrasă prin metode curent folosite în acest scop. Metoda de extracție a avut, de asemenea, o influență semnificativă asupra cantității de ADN ce se poate obține, indiferent de localitatea de experimentare.

4.1.4. Datele rezultate din analiza varianței pentru experiența trifactorială arată că cei trei factori experimentali au influențat distinct semnificativ şi puritatea ADN-ului. Această semnificație se păstrează şi în cazul interacțiunilor duble soi x metodă de extracție, localitate x metodă de extracție, localitate x soi, ca şi pentru interacțiunea triplă soi x metodă de extracție x localitate.

4.1.5. Calcularea ecuației de regresie relevă faptul că relația dintre cantitate şi puritate este liniară, datele individuale grupându-se destul de strâns în jurul liniei de regresie, în ambele cazuri: "r" calculat pe baza criteriului soi x metodă de extracție şi pe baza criteriului localitate x metodă de extracție. Corelația dintre cele două variabile este directă şi pozitivă, creşterea cantității de ADN ducând la o creştere a purității acestuia (r = 0,89**).

4.1.6. Coeficientul de corelație r = 0,86** indică, de asemenea, o legătură directă între mediile localităților şi cantitatea de ADN extrasă, ceea ce duce în mod automat la sporirea semnificativă a purității acestuia.

4.1.7. Alegerea primerilor s-a dovedit destul de dificilă, deoarece din cei 39 de primeri utilizați numai 22 au dat benzi polimorfice distincte.

4.1.8. Adăugarea PVP-ului în concentrație de 2% în tamponul de amplificare a probelor s-a dovedit, de asemenea, benefică. PVP-ul a redus efectul inhibitor al polifenolilor şi a facilitat marcarea benzilor necesare analizei statistice.

4.1.9. Soiurile analizate se diferențiază la nivel molecular, respectându-se clasificarea sistematică a acestora pe baza caracteristicilor lor morfo-fiziologice (precocitate, culoarea boabelor, pubescență) şi a clasificării din punct de vedere ecologo-geografic, respectiv prolesuri.

4.1.10. Distanțele genetice cele mai mari au fost înregistrate între soiurile total neînrudite, în timp ce distanțele genetice mici arată o înrudire mai mult sau mai puțin

apropiată între soiurile respective, analiza RAPD fiind în general în concordanță cu datele din taxonomia clasică.

4.1.11. Dendrograma obținută relevă faptul că soiul Fetească regală este foarte apropiat din punct de vedere genetic de soiul Fetească albă, confirmând ipoteza că cele două soiuri au o origine comună. Soiul Cabernet Sauvignon şi Merlot sunt, de asemenea, foarte apropiate din punct de vedere genetic, lucru confirmat şi de alți autori.

4.1.12. Analizând acelaşi soi dar care a provenit din stațiuni diferite s-a constat că nu există diferențe între ele, acestea fiind omogene, ceea ce sugerează că producerea materialului săditor s-a făcut în mod corespunzător.

4.1.13. Analizele RAPD s-au dovedit un instrument valoros de determinare a polimorfismului genetic intraspecific la *Vitis vinifera.*

4.2. CONCLUZII REFERITOARE LA MATERIALUL BIOLOGIC OBȚINUT *IN VITRO*

4.2.1. Numărul de lăstari obținuți la micropropagarea prin lăstărire axilară la vița de vie este influențat hotărâtor de genotip şi mediul de cultură.

4.2.2. Soiurile cu cea mai ridicată capacitate de reacție la cultura *in vitro* din segmente nodale par a fi Cabernet Sauvignon şi Traminer roz, iar mediul de cultură cel mai adecvat acestui scop s-a dovedit a fi MS – 2,5 mg/l BAP.

4.2.3. Deoarece mediul de cultură are cea mai puternică influență asupra numărului de neoplantule obținut la micropropagarea prin lăstărire axilară, se întâlnesc şi cazuri de interacțiuni între factori care duc la rezultate ce aparent contrazic cele spuse mai sus (exemplu, la soiul Riesling italian, soi pentru vinuri albe, micropropagat pe MS-2,5 mg/l BAP numărul de lăstari obținuți este imediat în apropierea celui

realizat la soiul Cabernet Sauvignon). Aceasta este o dovadă în plus că interacțiunea soi x mediu de cultură influențează în mod decisiv caracterul analizat

4.2.4. Soiul, mediul de cultură şi localitatea de proveniență a soiului au influențat în mod semnificativ lungimea lăstarilor obținuți prin cultura *in vitro* de segmente nodale la vița de vie.

4.2.5. Cea mai accentuată influență asupra caracterului menționat mai sus o are mediul de cultură, de departe mediul MS – 2,5 mg/l BAP ducând la obținerea celor mai bine dezvoltate neoplantule obținute prin cultura *in vitro* de segmente nodale, la diferențe semnificative de oricare alte variante.

4.2.6. Faptul că şi între localități există diferențe semnificative în ceea ce priveşte lungimea lăstarilor obținuți prin micromultiplicarea din segmente nodale poate fi explicat prin nivelele diferite de interacțiune dintre genotip şi mediul său specific, diferențe ce se concretizează în probabilitatea mai accentuată sau mai puțin accentuată la culturile *in vitro*.

4.2.7. Soiul de viță de vie, mediul de cultură utilizat şi locul de proveniență al cultivarului ce a furnizat explantul, precum şi interacțiunile dintre aceşti trei factori au influențat în mod semnificativ numărul de noduri/explant obținut în urma micromultiplicării prin segmente nodale.

4.2.8. În toate cazurile analizate, atât pentru influențele factorilor, cât şi pentru influențele interacțiunilor dintre aceştia, numărul de noduri/neoplantulă a reprodus fidel modelul de variație înregistrat pentru lungimea lăstarilor (neoplantulelor).

4.2.9. Rezultatele noastre confirmă observația generală că, la vița de vie, numărul de noduri/neoplantulă este corelat direct şi pozitiv cu dimensiunile (lungimea) neoplantulelor respective, lăstarii mai lungi având tendința de a forma un număr mai mare de noduri.

4.2.10. Din analiza datelor privind influența soiului şi a mediului de cultură asupra cantității de calus format în experiențele de inducere a calusogenezei, se poate concluziona că greutatea calusului format în urma primei pasări pe medii calusogene, la cele zece soiuri de viță de vie studiate, depinde în mod decisiv de mediu de cultură şi într-o mică măsură de interacțiunea soi x mediu de cultură.

4.2.11. Adăugarea în mediu de cultură MS a 1,5 mg TDZ/l nu duce la diferențe semnificative în greutatea calusului format, dar duce la deosebiri evidente de calitate a calusului. Pe mediul MS cu TDZ, la aceeaşi greutate a calusului ca şi în cazul mediului fără TDZ, calusul format pe mediul cu TDZ este mai puțin friabil şi are o capacitate calusogenă mai ridicată.

4.2.12. La vița de vie concentrațiile moderate şi mari de TDZ ale mediului de cultură influențează negativ numărul de neoplantule regenerate din calusul organogen. Dimpotrivă, un efect stimulativ asupra numărului de regeneranți şi a lungimii acestora îl are mediul cu adaos scăzut de TDZ (0,5 mg/l). Pe un astfel de mediu neoplantulele formate sunt în număr foarte mare, de lungimi apreciabile, dar total lipsite de rădăcini.

4.2.13. Soiul de viță de vie nu a avut, practic, influențe semnificative asupra numărului regeneranților obținuți şi a lungimii acestora ceea ce ne permite să afirmăm că modul de comportare al calusului regenerativ pe medul de cultură cu adaos de TDZ este general valabil pentru toate soiurile de viță de vie încercate.

4.2.14. Analiza benzilor formate prin migrarea în gel a ADN-ului amplificat cu primeri RAPD, arată clar că, la toate somaclonele analizate, există diferențe notabile de structură genetică față de soiurile din care provin.

4.2.15. În cadrul dendrogramei se evidențiază faptul că soiul de viță de vie şi somaclonele obținute din acel soi sunt strâns grupate. De asemenea, se constată că soiurile Cabernet Sauvignon şi Merlot, împreună cu somaclonele lor sunt reprezentate în acelaşi subgrup, la fel ca şi în cazul dendrogramei obținute pentru cele zece soiuri de viță de vie analizate *in vivo*. Soiurile şi somaclonele de Fetească albă şi Riesling

italian formează un subgrup similar cu cel reprezentat în dendrograma celor zece soiuri de viță de vie analizate.

4.2.16. Se poate afirma, pe baza rezultatelor prezentate că analizele RAPD reprezintă un instrument sensibil de identificare la nivel molecular a variabilității somaclonale apărută la vița de vie în condițiile menținerii îndelungate a calusului şi subculturilor *in vitro*.

4.2.17. Este evident că somaclonele identificate cu ajutorul analizelor RAPD vor trebui, în mod obligatoriu verificate în condiții *in vivo* pentru a vedea dacă variabilitatea observată la nivel molecular poate fi observată şi la nivel fenotipic. De asemenea, este important de văzut dacă variabilitatea fenotipică eventual observată se referă la caractere cantitative sau calitative de interes în ameliorarea viței de vie şi în ce măsură această variabilitate se transmite ereditar prin înmulțire sexuată sau descendenților vegetativi prin altoire.

BIBLIOGRAFIE

1. ABO El-Nil, M.N, A.C. HILDEBRANDT, 1971, Differentiation of virus-symptomless granium plants from anther callus. Plant Dis. Rptr. 55 pag. 1017-1020.
2. AHLOOWALIA B.S., 1983, Spectrum of variation somaclones of triploid reygrass. Crop Sci, 23, pag. 1141-1147.
3. AKBAS F.A., C. ISIKALAN, Y. KARA, D. BASARAN, 2004, The Comparison on the Proliferation of Lateral Buds of *Vitis vinifera* L. cv. Perle de Csaba during Different Periods of the Year in *In vitro* Conditions, International Journal of Agriculture and Biology, 1560-8530, pag. 328-330.
4. AKKAK A., P. BOCCACCI, T. LACOMBE, R. BOTTA, 2005, Relationships and genetic diversity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown in Algeria and in Mediterranean Basin. FAO: Biotechnology in Food an agriculture Conference 13.
5. ANGHEL I., TOMA N., 1980, Poliploidia şi aneuploidia, Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti.
6. ARDELEAN M., 1986, Ameliorarea plantelor horticole, Tipo Agronomia, Cluj-Napoca.
7. ARDELEAN M., R. SESTRAŞ, MIRELA CORDEA, 2006, Ameliorarea plantelor horticole, Editura AcademicPres, Cluj-Napoca.
8. ARMSTRONG, C.L., R.L. PHILLIPS, 1988, Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable embriyogenic tissue culture of maize. Crop Sci. 28, pag. 363-369.
9. BADEA ELENA MARCELA, DANIELA SĂNDULESCU, 2001, Biotehnologii vegetale, Fundaţia Biotech, Bucureşti.
10. BLAICH R. H. KONRADI, E. RUHL, A. FORNECK, 2007, Assessing Genetic Variation among Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Clones with AFLP Markers. Am. J. Enol. Vitis, 58:4, pag. 526-529.
11. BAHATIA, C.R., JOSHUA, D.C., MATHEWS, H, 1985, Somaclonal variation: a

genetic interpretation based on the rates of spontaneous chromosomal aberrations and mutations. Trends in Plant Research, pag. 317-326.

12. BEBELI, P., ANGELA KARP, P.J. KALTSIKES, 1990 – Somaclonal variation from cultured immature embryos of rye differing in heterochromatin content. Genome. 22, pag. 173-183.
13. BELLIN D.R., VELASCO, M.S. GRANDO, 2001, Intravarietal DNA Polymorphisms in grapevine (*Vitis vinifera* L.), Acta Hort. 546, ISHS, pag. 343-349.
14. BERTSCH, C., F. KIEFFER, P. MAILLOT, S. FARINE, GISELE BUTTERLIN, D. MERDINOUGLU, B. WALTER., 2005, Genetic chimerism of *Vitis vinifera* cv. Chardonay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis, BMC Plant Biol., pag. 5-20.
15. BHASKARAN, S., R.H. SMITH, S. PALIWAL, K.F. SCHERTY, 1987, Somaclonal variation from *Sorghum bicolor* (L). Moench cell culture. Plant Cell Tissue Organ Culture, pag. 189-195.
16. BHATIA, C.R., D.C. JOSHUA, H. MATHEWS, 1985, Somaclonal variation: a genetic interpretation based on the rates of spontaneous chromosomal aberrations and mutations. Trends in Plant Research, pag. 317-326.
17. BOHM A., E. ZYPRIAN, 1998, RAPD marker in grapevine (*Vitis* spp.) similar to plant retrotransposoms, Plant Cell Reports.
18. BOUQUET A., 1989, Intérêt des techniques de culture *in vitro* pour l'amelioration génétique de la vigne. Bull. O.I.V., 697-698, pag. 179-192.
19. BLAICH R., J. KONRADI, E. RŰHL, A. FORNECK, 2007, Assessing Genetic Variation among Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Clones with AFLP Markers, Am. J. Enol. Vitic, 58:4, pag. 526-529.
20. BRATTSTEN L.B., 2000, Vintage, Supplemental Notes for lecture, 5, Rutgers Wine Course.
21. BREIMAN, A., D. ROTEM, ANGLEA KARP, H. SHASKIN, 1987, Heritable somaclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*), Theor. Appl. Genet., 77, pag. 809-814.

22. BRIGHT S.V., R.J. NELSON, G. CREISSEN, A. KARP, J. FRANKON, P. NORBURY, J. KUEH, S. ROGNES, B. MIFLIN, 1983, Modification of agronomic traits using *in vitro* technology, pag. 251-265. In: S.H. Mantell şi H. Smith Plant biotechnology. Cambridge University Press, New York.
23. BOHM A., E. ZYPRIAN, 1996, RAPD marker in grapevine (*Vitis* spp.) similar to plant retrotransposoms, Plant Cell Reports, 17, pag. 415-421.
24. BORNHOFF B.A., M. HARST, E. ZYPRIAN, R. TŐPFER, C. IANNINI, 2000, Transformation studies on *Vitis vinifera* L., via *Agrobacterium tumefaciens*, Acta Horticulturae, 528, VII International Symposium on Grape Genetics and Breeding.
25. BOTTA R., N.S. SCOTT, I. EYNARD, M.R. THOMAS, 1995, Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. *Vitis* 2, pag. 99-102.
26. BOWERS J., E.B. BANDMAN, C.P. MEREDITH, 1993, DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. Am. J. Enol. Viticult., 44, pag. 266-274.
27. BOWERS J., C. MEREDITH, 1997, The parentage of a classic wine grape. Cabernet Sauvignon. Nature Genetics 16, pag. 84-87.
28. BUTNIUC, A. L., ZĂPÂRȚAN, M., DELIU, C., 1995-1996, Influența unor citochinine în procesele de regenerare, morfogeneză şi organogeneză *in vitro* la *Sequoia sempervirens* (D.Don.) şi *Chrysanthemum morifolium* Ramat., Contrib. Bot., pag. 161-164.
29. CACHIȚĂ – COSMA, DORINA, 1984, Culturi de celule şi țesuturi vegetale, aplicații în agricultură, Editura Ceres, Bucureşti.
30. CACHIȚĂ C. DORINA, 2000, Biotehnologie vegetală. Vol. I Baze teoretice şi practice, Editura Mira Design, Sibiu.
31. CAETANO-ANOLLÉS G., B.J. BASSAN P.M.. GRESSHOFF, 1991, DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology, 9, pag. 553-557.
32. CALDERINI D.F., G.A. SLAFER, 1999, Has yield stability changed with genetic improvement of wheat yield?, Euphytica 107, pag. 51-59.
33. CHEE R., R.M. POOL, 1983, *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application

of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis*, 22, pag. 363-374.

34. CHENG, F.S. S.K. BROWN, N.F. WEEDEN, 1997, A DNA Extraction Protocol from Various Tissues in Woody Species, HortScience 32(5); pag. 921-922.
35. CONSTANTIN G., 1959, 1960, Ampelografia Republicii Socialiste România, vol. II, III.
36. CORLEY, R.H.V., C.H. LEE, I.H. LAW, C.Y. WONG, 1986, Abnormal flower development in oil palm clones. Plantet. 62, pag. 233-240.
37. CORNEANU G., 1989, Elemente de radiobiologie vegetală, Ed. Ceres, Bucureşti.
38. COUCH, J.A., P.J. FRITZ, 1990, Isolation of DNA from plants high in polyphenolics, Plant Mol. Biol. Rptr, 8, pag. 8-12.
39. CRĂCIUN, T. şi colab., 1979, Haploidia în genetică şi ameliorarea plantelor. Editura Ceres, Bucureşti.
40. D'AMATO, F., 1989, Polyploidy in cell differentiation. Caryologia, 42, pag. 183-211.
41. DAUB, M.E., A.E. JENNS, 1989, Field and greenhouse analysis of variation for disease resistance in tabacco somaclones. Phytopathology, 70, pag. 600-605.
42. DEBUIGNE, 1992, Les vins, Larousse.
43. DELOIRE A., M.C. MAURO, 1991, Amelioration de la vigne par la voie des biotechnologies: realites et perspectives. Rev. Cytol. Biol., Veget. – Bot., 14, pag. 265-269.
44. DE SILVA M., W. SENERATH, K. SUGATHADASA, 2006, *In vitro* callus production of *Pterocarpus santalinus* L. (*Red Sandal*) through nodal cuttings shoot tips and leaf discs, Forestry and Environment Symposium, Sri Lanka: *In vitro* callus production.
45. DHEKNEY S.A., Z.T. LI, M. VAN AMAN, M. DUTT, J. TATTERSALL, K.T. KELLEY, D.J. GRAY, 2007, Genetic transformation of embryogenic cultures and recovery of transgenic plants in *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia* and *Vitis hybrids*, ASHS Acta Horticulturae, 738, International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species.
46. DENTON, I.R., WESTCOTT, R.J., FORD-LLOYD, B.V., 1977, Phenotypic

variation of *Solanum tuberosum* L., cv. Dr. McIntosh regenerated directly from shoot –tip culture, Potato Res., 20, pag. 131-136.

47. DORDEA MANUELA, N. COMAN, CORNELIA CRĂCIUNAŞ, C. ANDRAŞ, 2000, Genetică generală şi moleculară, Presa Universitară Clujeană.
48. EVANS, D.A., SHARP, W.R., 1986, Applications of somaclonal variation. Biotechnology, 4, pag. 528-534.
49. EVANS D.A., 1988, Applications of somaclonal variation, pag. 203-223. In: *A* Mizrahi. Biotechnology in agriculture. Allan R. Liss, New York.
50. EMERSHAD R.L., D.W. RAMMING, 1994, Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.), Plant Cell. Rep. 14, pag. 6-12.
51. FALLOT J., P. TEY-RULH, P. COUTOULY, M. PETITPREZ, J.P. ROUSTAN, I. PHILIPPE, 1990, Cultures in vitro, etude de l'eutypiose et strategies des creation de somaclones de vigne tolerants. Les calliques d'INRA, 51, pag. 151-159.
52. FANIZZA G., G. COLONNA, P. RESTA, G. FERRARA, 1999, The effect of the number of RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in *Vitis vinifera*, Euphytica 107, pag. 45-50.
53. GABOREANU IOANA, N.W. BLACKHALL, C. ANDRAŞ, M.R. DAVEY, D. PAMFIL, C. PANFIL, 2001, Genetic relationships of *Mentha* species evaluated by RAPD analysis, Bull. USAMV-CN 55-56, pag. 149-153.
54. GABOREANU IOANA, 2002, Identificarea şi caracterizarea unor specii de *Mentha* cu ajutorul markerilor genetici RAPD, teză de doctorat.
55. GABOREANU IOANA, D. PAMFIL, C. ANDRAŞ, 2003, An improved method for RAPD amplification of DNA from mints (*Mentha* sp.), Bul. USAMV-CN, nr. 59, pag. 251-255.
56. GALZY R. V. HAFFNER, D. COMPAN, 1990, Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. Journal of Experimental Botany 41, pag. 295-301.
57. GENGENBACH B.G., P. UMBECK, 1982, Characteristics of T-cytoplasm revertants from tissue culture. *Maize* Genet. Coop. Nwsl. 56, pag. 140-142.

58. GOULD, A.R., 1986, Factors controlling generation of variability *in vitro*. In: Vasil, I.K. (ed). Cell Culture and Somatic Cell Genetics in Plants. 3. Plant Regeneration and Genetic Variability. Academic Press. Orlando, pag. 549-567.
59. GRAY D.J., 1992, Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. Amer. J. Bot., 79, pag. 542-546.
60. GREIESBACH, R.J., P. SEMENIUK, 1987, Use of somaclonal variation in the improvement of *Eustoma –grandiflorum*. J. Heredity, 78, pag. 114-116.
61. GRIESBACH R.J., P. SEMENIUK, M. ROTH, R.H. LAWSON, 1988, Tissue cuture in the improvement of *Eustoma*. HortScience 23, pag. 791.
62. HAMMERSCHLAG F.A., 1990, Somaclonal variation in peach, pag. 170-183. In: *Y.P.S.* Bajaj (ed). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 1. Trees I. Springer-Verlag, Berlin.
63. HAMMERSCHLAG F.A.D. RITCHIE, D. WEAVER, 1991, Phenotypic stability of bacterial leaf spot resistance in peach regenerants under greenhouse and field conditions. HortScience 26, pag. 725.
64. HAMPL V., PAVLÍCEK A., FLEGR J., 2001, Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, pag. 731-735.
65. HANNA, W.W., C. LU, I.K. VASIL, 1984, Uniformity of plants regenerated from somatic embryos of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass) Theor. Appl. Genet. 67, pag. 155-159.
66. HANSEN M., C. HALLDÉN, T. SÄLL, 1998, Error Rates and Polymorphism Frequencies for Three RAPD Protocols, Plant Molecular Biology Reporter, nr. 16, pag. 139-146.
67. HARRIS R.E. J.H. STEVERNSON, 1982, *In vitro* propagation of *Vitis*, *Vitis*, 21, pag. 22-23.
68. HARTMAN H. T., D.E. KKESTER, 1983, Plant propagation. Prenticee-Hall, Englewood Cliffs N.J.
69. HÉBERT-SOULÉ D., J.R. KIKKERT, B.I. REISCH, 1995, Phosphinotricin

stimulates somatic embryogenesis in grape (*Vitis* sp.L.). Plant Cell. Rep. 14, pag. 380-384.

70. HELOIR M.C., J.C. FOURNIOUX, M. BARBIER, P. HEANDET, R. BESSIS, 1998, Endogenous polyamine concentration in juvenile, adult and micropropagated grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir), *Vitis* 37 (1), pag. 61-62.
71. HERRERA R., V. CARES, M.J. WILKINSON, P.D.S. CALIGARI, 2002, Characterization of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers, Euphytica 124: pag. 139-145.
72. HOEPFNER A.S., H. NYBOM, U. CARLSSON, R. FRANZEN, 1993, DNA fingerprinting useful for monitoring cell-line identity in micropropagated raspberries. Acta Agric. Scandinavica, B. 43, pag. 53-57.
73. HOSSAIN M.B., S. HAQUE, H. KHAN, 2002, DNA Fingerprinting of Jute Germplasm by RAPD, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 35, nr. 4, pag. 414-419.
74. HOWLAND G.P., R.W. HART, 1977, Radiation biology of cultured plant cells. In: Reinert J and Bajaj YPS (eds) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, pag. 731-756.
75. HUSSEY, G., 1977 – *In vitro* propagation of *Gladiolus* by precocious axillary shoot formation, Scientia Hort., 6, pag. 287-296.
76. IANDOLINO A.B., F. G. SILVA, H. LIM, H. CHOI, L.E. VILLIAMS, D.R. COOK, 2004, High-Quality RNA, cDNA, and Derived EST Libraries from Grapevine (*Vitis vinifera* L.), Plant Molecular Biology Reporter 22, pag. 269-278.
77. IBANEZ A., M. VALERO, A. MORTE, 2005, Establishment and *in vitro* clonal propagation of the Spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon: an improved system where proliferating cultures alternate with rooting ones. Annales de Biologia 27, pag. 211-220.
78. IMAZIO S., M. LABRA, F. GRASSI, M. WINFIELD, M. BARDINI, A. SCIENZA, 2002, Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar “Traminer”, Plant Breeding, 121, pag. 531-535.

79. INNIS A.M., H.D. GELFAND, J.J. SNINSKY, J.T. WHITE, 1990, PCR – Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. San Diego, CA, pag. 3-12.
80. IONESCU MARIANA, ELENA BRÎNDUŞE, 1992, Posibilități de utilizare a micromultiplicării *in vitro* la vița de vie, *Cercetări de Genetică Vegetală şi Animală*, vol. II, S.C. Agris – Redacția Revistelor Agricole S.A., pag. 193-205.
81. KARP, ANGELA., BRIGHT, S.W.J., 1985, On the causes and origins of somaclonal variation. Ox. Surv. Pl. Mol. And Cell Biol. 2, pag. 199-234.
82. KARP ANGELA, 1989, Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? Nwsl. Intl. Assn., Plant Tissue Culture 58, pag. 2-11.
83. KARP ANGELA, 1999, On the current understanding of somaclonal variation. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology Volume 7, pag 1-58.
84. KHAWAR K.M., C. SANCAK, S. URBANBEY, S. ŐZCAN, 2004, Effect of Thidiazuron on Shoot Regeneration from Different Explants of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) via Organogenesis, Turk J. Bot. 28, pag. 421-426.
85. KIM C.S., C.H. LEE, J.S. SHIN, Y.S. CHUNG, N.I. HYUNG, 1997, A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP, Nucleic Acids Research, Vol. 25, No. 5, pag. 1085-1086.
86. KIM H. S., J.H JEONG, S.K. KIM, 2002, Parentage Identification of “Deabong” Grape (*Vitis* spp.). Using RAPD Analysis, Journal of Plant Biotechnology, vol. 4(2), pag. 67-70.
87. KIM S.H., S. K. KIM, 2002, Effects of Auxins and Cytokinins on Callus Induction from Leaf Blade, Petiole, and Stem Segments of In *Vitro*-grown “Sheridan” Grape Shoots, J. Plant Biotechnology, vol. 4 (1), pag. 17-21.
88. KOONJUL P.K.,W.F., BRANDT, J.M. FARRANT, G.G. LINDSEY, 1999, Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA, Nucleic Acids Research, vol. 27, Nr. 3.
89. KUKSOVA, B.VALERIA, M.N. PIVEN, Z.Z. GLEBA, 1997, Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 49, pag. 17-27.

90. KURTZ S.M., R.D. LINEBERGER, 1983, Genotypic differences in morphogenetic capacity of cultured leaf explants of tomato. J. Amer. Soc.Hort.Sci. 108, pag. 710-714.
91. LAPITAN, N.L.V., R.G. SEARS, B.S. GILL, 1988, Amplification of repeated sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. Theor. Appl. Genet, 75, pag. 381-388.
92. LARKIN, P.J., W.R. SCOWCROFT, 1981, Somaclonal variation – A Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. Theor. Appl. Genet, 60, pag. 197-214.
93. LARKIN, P.J., SCOWCROFT, W.R., 1983, Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. Plant Cell Tissue Organ Culture. 2, pag. 111-122.
94. LARKIN, P.J., 1987, Somaclonal variation, history, method and meaning. Iowa State Genet, 75, pag. 381-388.
95. LAZAR, M.D., T.H.H. CHEN, L.V.GUSTA, K.K. KARTHA, 1988, Somaclonal variation for freezing tolerance in a population derived from norstar winter wheat. Theor. Appl. Genet. 75, pag. 480-484.
96. LEE, M., R.L. PHILLIPS, 1987, Genetic variants in progeny of regenerated maize plants. Genome. 29, pag. 834-838.
97. LETHAM, S.D., 1978, Phytohormones and Related Compounds – A Comprehensive Treatise (ed. Letham, Goodwin şi Higgins), Elsevier-North Holland Biomedical Press, vol. I.
98. LIN H., M.A. WALKER, 1997, Extracting DNA from Cambium Tissue for Analysis of Grape Rootstocks, HortScience 32(7), pag.1264-1266.
99. Ling M.M., 2001, DNA methods for preparation, Encyclopedia of life sciences, pag. 1-3.
100. LODHI M.A., N.F. WEEDEN, B.I. REISCH, 1997, Characterization of RAPD markers in *Vitis*, *Vitis* 36, pag. 133-140.
101. LODHI M. A., GUANG-NING Z., F. N. F. WEEDEN, B.I. REISCH, 1994, A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and Ampelopsis, Plant Molecular Biology Reporter 12(1), pag. 6-13.

102. LOUREIRO M.D., M.C. MARTINEZ, J.M. BOURSIQUOT, P. THIS, 1998, Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* "Albariňo" and some similar grapevine cultivars. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 123, pag. 842-848.

103. LOURENS, A.G., F.A. MARTIN, 1987, Evaluation of *in vitro* propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. Crop. Sci. 27, pag. 93-796.

104. LOYD, D., ROBERTS, A. v., SHORT, K. C., 1988 – The induction *in vitro* of adventitious shoots in *Rosa*, Euphytica, 37, pag. 31-36.

105. MARTINELLI L., P. BRAGAGNA, V. POLLETTI, A. SCIENZA, 1993, Somatic embryogenesis from leaf-and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. Plant Cell. Rep., 12, pag. 207-210.

106. MATHUR, A.K., P.S. AHUJA, S. MANDAL, 1988, Screening and evaluation of somaclonal variation for quantitative and qualitative traits in an aromatic grass, *Cymbopogon winterianus* Jowitt. Plant Breeding. 101, pag. 321-334.

107. MCCLELAND M., J. WELSH, 1994, RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. PCR Methods Appl. 4(1), pag. 66-81.

108. METZKER, M.L, T.C. CASKEY, 2001, Polymerase Chain Reaction (PCR), Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group/www.els.net.

109. MEZZETTI B., TIZIANA PANDOLFINI, O. NAVACCHI, LUCIA LANDI, 2002, Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis, BMC Biotechnology, pag. 2-18.

110. MINGFU, M., L., 2001, DNA: Methods for Preparation, Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing.

111. MITHILA J., J.C. HALL., J.M.R. VICTOR, P.K. SAXENA, 2003, Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentration and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.), Plant Cell. Resp., 21, pag. 408-414.

112. MITRA, G.C., 1985, Somaclonal variation a strategy for plant improvement. Cell Chromosome Res. 8, pag. 59-68.

113. MOLDOVEANU D., C. MILITARU, IULIA MOLDOVEANU, 2001, Microbiologie şi inginerie genetică, Fiat Lux, pag. 205-206.

114. MULCAHY D.L., M. CRESTI, H.F. LINSKENS, C. INTRIERI, O.

SILVESTRONI, R. VIGNANI, M. PANCALDI, 1995, DNA fingerprinting of italian grape varieties: a test of reliability in RAPDs, Adv. Hort. Sci., 9, pag. 185-187.

115. MURATA, M., 1989, Effects of auxin and cytokinin on induction of sister chromatid exchanges in cultured cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Apl. Genet. 78, pag. 521-524.
116. NAKANO M. T. SAKAKIBARA, Y. WATANABE, M. MII, 1997, Establishment of embryogenic cultures in several cultivars of *Vitis vinifera* and V. x *labruscana*, *Vitis*, vol. 36, nr. 3, pag. 141-145.
117. NAZHAD, N.R., M. SOLOKI, R. VIGNANI, B. SIAHSAR, H. KAMALDINI, 2005, Study of Genetic variation native varieties of sistan grape using molecular marker RAPD, 9th International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years After.
118. NESTICY, M., A.HERICHOVA, G.J. NOVAK, M. DOLEZELOVA, 1987, Somaclonal variation in plants derived from somatic embryos of maize *Zea mays* L. Sci. Agric. Bohemoslov. 19, pag. 253-260.
119. Newton C.R., 1995, PCR Essential data, John Wiley and Sons LTD, Baffins Lane Chichester, West Sussex.
120. NICOLAE I., 1978, Mutageneza experimentală, Editura Ceres, Bucureşti.
121. NOVAK, F.J., S. DASKALOV, 1988, Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. Plant Breeding. 101, pag. 66-79.
122. NYBOM H., S.H. ROGSTAD, B.A. SCHAAL, 1990, Genetic variation detected by use of the M13 “DNA fingerprint” probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus* (Rosaceae). Theoretical and Applied Genetics, 79, pag. 153-156.
123. OGIHARA, V., 1981, Tissue culture in Haworthia. Part 4: Genetic characterization of plants regenerated from callus. Theor. Appl. Genet. 60, pag. 353-363.
124. OLAH R. E. SZEGEDI, S. RUTHNER, J. KORBULY, 2003, Thidiazuron-induced regeneration and genetic transformation of grapevine rootstock varieties, *Vitis*, vol. 42, nr. 3, pag. 133-136.

125. OONO, K, 1985, Putative homozygous mutations in regenerated plants of rice. Mol. Gen. Genet. 198, pag. 377-385.

126. OPREA Şt., S.D. MOLDOVAN, 2007, Ameliorarea viței de vie în România, Editura Poliam Cluj-Napoca.

127. ORTON, T.J., 1980, Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of Hordeum. Theor. Appl. Genet. 56, pag. 101-112.

128. PALADA-NICOLAU, MAGDALENA, 2004, Curs de variabilitate somaclonală, USAMV Cluj-Napoca.

129. PALII A., GALINA COMAROV, ANGELA LOYAN, V. SCORPAN, 2004, Biotehnologii moderne în fitotehnie şi biosecuritate, Ed. Tipografia Centrală, Chişinău.

130. PAMFIL D., 1983, Producerea prin cultură meristematică a materialului săditor cu valoare biologică ridicată la garoafele de seră, Horticultura, 5, pag. 12-15.

131. PAMFIL D., 1996b**,** Utilizarea markerilor RAPD pentru detectarea variabilității somaclonale la vița de vie. Simpozionul național "10 ani de biotehnologie", 23 octombrie, Timişoara, pag. 246-254.

132. PAMFIL D.C., 1999, The use of RAPD markers for the identification of somaclonal variation of the micro propagated grapevine, Proc Symp. Present and Prospects in Horticulture, pag. 247-254

133. PARK, C.H., P.D. WALTON, 1989, Embryo callus regenerated hybrids and their cochicine-induced amphiploids between *Elymus canadensis* and *Secale cereale*. Theor. Appl. Genet. 78, pag. 721-727.

134. PIVEN N.M., V.B. KUDSOVA, L.U. YUZEPHOVICH, O.K. MAKHORINA, 1991, Utilization of some cell technologies in grape breeding process. Biopolimers & Cell. 7, pag. 66-72.

135. PEROS J. P., L. TORREGROSA, G. BERGER, 1998, Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity, Journal Experimental Botany, Vol. 49, Nr. 319, pag. 171-179.

136. PICKERING, R.A., 1989, Plant regeneration and variants from calli derived from imature embryos of diploid barley (*Hordeum vulgare*) and *H. vulgare* x *H. bulbosum* L. crosses. Theor. Appl. Genet. 78, pag. 105-112.

137. POENARU I., 1970, Ampelografia Republicii Socialiste România, vol. I.

138. POGANY F. MARY, R. D. LINEBERGER, 2006, Plant chimeras in tissue culture. E-magazine Cultivar – ISSUE 3 (36).

139. POP RODICA, M. ARDELEAN, D. PAMFIL, IOANA MARINA GABOREANU, 2003, The Efficiency of Different DNA Isolation and Purification in Ten Cultivars of *Vitis vinifera*, Bul. Nr. 59 USAMV, seria ZB, pag. 259-261.

140. POP RODICA, M. ARDELAN, IOANA MARINA GABOREANU, D. PAMFIL, MIRELA CORDEA, P. RAICA, MONICA BODEA, MARIA CANTOR, 2005, RAPD analyses used in revealing molecular polymorphism of several grape varieties from vineyards of Romania, XL Croatian Symposium on Agriculture, pag. 229.

141. POP RODICA, M. ARDELEAN, IOANA GABOREANU, P. RAICA, D. PAMFIL, MIRELA CORDEA, 2006, Analiza RAPD utilizată în determinarea polimorfismului la nivel molecular a cultivarelor de viță de vie de la S.D.E. Iaşi, Lucrări ştiințifice, anul XLVII, vol. 1 (49), Seria Horticultură, Universitatea de Ştiințe Agricole şi Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iaşi, ISSN 1454-7376, pag. 389-394.

142. POP RODICA, MARIA CANTOR, DOINA CLAPA, MONICA BODEA, 2007, Effect of thidiazuron on shoot organogenesis induction in *Lisianthus russelianus* Hook, Lucrările simpozionului internațional Conservarea germoplasmei horticole – Realizări şi perspective, Ed. Todesco, Cluj-Napoca.

143. POPESCU CARMEN FLORENTINA, AL. TEODORESCU, 2004, Biotehnologii, Regenerarea *in vitro* la vița de vie cu aplicații în ameliorarea sortimentului. Editura Ceres, Bucureşti.

144. REGNER F., A. STADLBAUER, C. EISENHELD, 2001, Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties, Acta Hort. 546, ISHS, pag. 331-336.

145. ROGER S.O., A.J. BENEDICH, 1988, Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues, Plant Mol. Biol., 5, pag. 69-76.

146. ROUT G.R., S. SAMAL, S. NAYAK, RASHMI.M. NANDA, P.C. LENIKA, P. DAS, 2002, An Alternative Method of Plant DNA Extraction of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) for Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis, Gartenbauwissenschaft, 67 (3). S., pag. 114-118, ISWSN 0016-478X.

147. RYAN, S.A., W.R. SCHWCROFT, 1987, A somaclonal variant of wheat with additional β-amylase isozymes. Theor. Appl. Genet. 73, pag. 459-464.

148. RYAN F.J., C.A. LEDBETTER, D.W. RAMMING, D.E. PALMQUIST, D.E. BEL, S.J. PETERSON, 2001, Challenges in developing molecular markers for almond (*Prunus amygdalus*) and Grape (*Vitis* species), Acta Hort. 546, ISHS, pag. 629-638.

149. SAIKI R.K., S. SCHARF, F. FALOONA, K.B. MULLIS, G.T. HORN, H.A. ERLICH, N. ARNHEIM, 1985, Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, 230, pag. 1350-1354.

150. SALA, F, M.G., BIASINI, 1987, Heritable variability induced by the *in vitro* culture and genetic improvement of cultivated plants. G. Bot. Italia 120, pag. 43-45.

151. SALUNKHE CK. P.S RAO, 1997, Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Reports. 17 (1), pag. 65-67.

152. SALUNKHE CK. P.S, RAO, 1999, Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. Plant Cell. Raports. 18 (7-8), pag. 670-673.

153. SAVATTI M., 1983, Ameliorarea plantelor şi producerea de sămânță, curs, Tipo Agronomia Cluj-Napoca.

154. SESTRAŞ R., 2004, Ameliorarea speciilor horticole, Editura AcademicPres Cluj-Napoca

155. SEFC K.M. F. REGNER, J. GLOSSL, H. STEINKELLNER, 1998, Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 37, pag. 15-20.

156. SENSI E., R. VIGNANI, W. ROHDE, S. BIRICOLTI, 1996, Characterisation of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35, pag. 183-188.

157. SHARMA, H.C., B.S. GILL, R.G. SEARS, 1984, Inflorescence culture of wheat *Triticum aestivum – Agropyron hybrds*. Callus induction, plant regeneration and potential in overcoming sterility barriers. Plant Cell Tissue Organ Culture. 3, pag. 247-256.

158. SHEPARD, J.F., D. BIDNEY, E. HAHIN, 1980, Potato protoplasts in crop improvement, Science, 208, pag. 17-24.

159. SILVESTRONI, O.P., D. PIETRO, C. INTRIERI, R. VIGNANI, I. FILIPPETTI, C. DEL CASIO, M. SCALI, M. CRESTI, 1997, Detection of genetic diversity among clones of cultivar Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatelites DNA polymorphism analysis. *Vitis*, 35, pag. 147-150.

160. SIVRITEPE N., A. ERIS, 1999, Determination of Salt Tolerance in Some Grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.) under *in vitro* conditions, Turk. J. of Biology 23, pag. 473-485.

161. SKIRVIN M.R., K.D. MCPHEETERS, MARGARET NORTON, 1994, Sources and Frequency of Somaclona Variation, HortScience, vol. 29(11), pag. 1231-1237.

162. SOLOKI M., N. R. NAHZAD, R. VIGNANI, B. SIAHSAR, H. KAMALADINI, 2005, Study of polymorphism some native varieties of sistan grape using molecular marker RAPD, Interantional Consortium on Agricultural Biotechnology Research (ICABR), Italia.

163. STANGE CLAUDIA, DORIS PREHN, PATRICIO A. JOHNSON., 1998, Isolation of *Pinus radiata* Genomic DNA Suitable for RAPD Analysis, Plant Molecular Biology Reporter 16, pag. 1-8.

164. STAUB J., J. BACHER, K. POETTER, 1996, Sources of Potential Errors in the Application of Random Amplified Polymorphic DNAs in Cucumber, HortScience 31 (2), pag. 262-266.

165. STĂNESCU Z, 1969, Poliploidia la plantele de cultură, Editura Agrosilvică Bucureşti.

166. STAVRAKAKIS M.N., K. BINIARI, P. HATZOPOULOS, 1997, Identification of eight Greek grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Vitis*, 36, pag. 175-178.

167. TĂMAŞ ELENA, 1998, Cercetări privind influența mutagenă a unor agenți fizici şi chimice în vederea obținerii de mutații utile pentru procesul de ameliorare a bobului (*Vicia faba* L.), Teză de doctorat.

168. TANG F.A., M.G. MULLINS, 1990, Adventitious bud formation in leaf explants of some grapevine rootstock and scion cultivars. *Vitis* 29, pag. 151-158.

169. TESSIER C., J. DAVID, P. THIS, J.M. BOURSIQUOT, A. CHARRIER, 1999, Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theor Appl Genet, 98: pag. 171-177.

170. THIS, P. A-F. ADAM-BLONDON, G. BUTTERLIN, V. CHIQUET, D. CLAUX, S. DECROOCQ, A. DOLIGNEZ, V. DUMAS, D. MERDINOGLU, F. PELSY, C. ROUX, S. WIEDEMANN-MERDINOGLU, 2002, Développment d'une carte génétique de référence de *Vitis vinifera* á l'aide de marqueurs microsatellites, 12éme Colloque sur les Rechercehes Fruitières, Les apports de la biologie moléculaire en arboriculture fruitière, Bordeaux.

171. THOMAS M.R., N.S. SCOTT, R. BOTTA, J.M.H. KIJAS, 1998, Sequence-Tagged site markers in grapevine and citrus, Journal of the Japanese Society for Horticulural Science, vol. 67, nr. 6, pag. 1189-1192.

172. THOMAS T. D., J.T. PUTHUR, 2004, Thidiazuron induced high frequency shoot organogenesis in callus from *Kigelia pinnata* L., *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 45, pag. 307-313.

173. TORREGROSA L, A. BOUQUET, 1996, Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 45, pag. 245-252.

174. TORREGROSA L., P. IOCCO, M.R. THOMAS, 2002, Influence of *Agrobacterium* Strain, Culture Medium and Cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. Am. J. Enol. Vitic., 53, pag. 183-190.

175. ȚÂRDEA C., L. DEJEU, 1995, Viticultură, Editura Didactică şi Pedagogică R.A., Bucureşti.

176. ULANOWSKY S., Y.GOGORCENA, F. MARTINEZ-DE-TODA, J. BORREGO, J. IBÁÑEZ, J.M. ORTIZ, 2001, Characterization of grapevine

accessions at germplasm banks with RAPD and microsatellite markers, Acta Horticulturae 546, pag. 271-279. Franța.

177. VASIL, I.K. 1988, Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. Biotechnology 6, pag. 397-402.
178. VIGNANI R. J.E. BOWERS, C.P. MEREDITH, 1996, Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* "Sangiovese". Sci. Hort, 65, pag. 163-169.
179. VIDAL J.R., M. COARER, A. DEFONTAINE, 1999, Genetic relationships among grapevine varieties grown in different French and Spanish regions based on RAPD markers, Euphytica 109: 161-172, pag. 161-172.
180. VOS P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. LEE, MIRANDA HORNES, A. FRIJTERS, JERINA POT, J. PELEMAN, M. KUIPER, M. ZABEAU, 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Research, vol. 23, nr. 21, pag. 4407-4414.
181. WAKASA, K. J.M. WIDHOLM, 1987, A 5-methyltryptophan resistant rice mutant, MTR1, selected in tissue culture. Theor. Appl. Genet. 74, pag. 49-54.
182. WEISING K., H. NYBOM, K. WOLFF, W. MEYER, 1995, DNA Fingerprinting in Plants and Fungi, CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, pag. 54.
183. WELSH J., M. MCCLELLAND, 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids. Res. 18, pag. 7213-7218.
184. WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFLASKI J.A., TINGEY S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, pag. 6531-6535.
185. WOLF T., C. ORTLIEB.,K. EIMERT, R. RIES, 2001, Routine Extraction of DNA from Grapevine (*Vitis* ssp.) Canes and Roots for Variety Identification by RAPD-PCR, Acta Hort. 547, pag. 527-533.
186. www.cgr.wageninger-ur.nl/pgr/research/molgen/rapds.htm
187. www.en.wikipedia.org/wiki/Merlot
188. www.ro.wikipedia.org/wiki/Fetească_Albă

189. XU H., A.T. BAKALINSKY, 1996, Identification of Grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA Markers, HortScience 31(2) pag. 267-268.

190. XU X., J. LU, Z. REN, H. WANG, S. LEONG, 2005, Callus induction and somatic embryogenesis in muscadine and seedless bunch grapes (*Vitis*) from immature ovule culture, Proc. Fla. State Hort, Soc. 118, pag. 260-262.

191. YAMADA M., H. YAMANE, H. YOSHINAGA, K. HIRAKAWA, N. KURIHARA, A. IWANAMI, H. NAGATA, K. SATO, A. OZAWA, T. SUMI, 2003, New grape cultivar Honey Venus, Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science, Japan, (2), pag. 53-63.

192. YE G.N., M. HEMMAT, M, A. LODHI, N.F. WEEDEN, B.I. REISCH, 1996, Long primers for RAPD mapping and fingerprinting of grape and pear, BioTechniques 20, pag. 368-371

193. YE G.N., G. SOYLEMEEZOGLU, N.F. WEEDEN, W.F. LAMBOY, R.M. POOL, B.I., REISCH 1998, Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting, *Vitis*. 37, pag. 33-38.

194. YE G.N., G. SOYLEMEEZOGLU, N.F. WEEDEN, W.F. LAMBOY, R.M. POOL, B.I., REISCH, 1998, Analysis of the relationship between grapevine cultivars and clones via DNA fingerprinting, Plant Molecular Biology Reporter, cap.3.1., pag. 135-143.

195. YOUMBI E., B. ELLA, K. TOMEKPE, 2006, Effect of thidiazuron on *in vitro* proliferation capacities of some banana (*Musa* spp.) cultivars with weak multiplication potential, Akdeniz Universitesi Ziraat Facultesi Dergisi, 19 (2) pag. 255-259.

196. ZHENG, K.L., Z.M. ZHOU, G.L. WANG, Z.M. XIONG, 1989, Somatic cell cultures of rice cultivars with different grain types: Somaclonal variation in some grain and quality characters. Plant Cell Tissue Organ Culture. 18, pag. 201-208.

ANEXA 1

Preparare soluții stoc

Soluție stoc 1 M Tris HCl – 100 ml

M Tris HCl = 157,6 g

- se dizolvă la cald 15,76 g în 80 ml apă distilată
- se răceşte la temperatura camerei
- se ajustează pH-ul la 8,00 cu HCl concentrat
- se ajustează volumul soluție pentru 100 ml cu apă distilată
- se autocleavează

Dacă soluția are culoarea galbenă, se reface, deoarece Tris nu este de calitate.

Soluție stoc acid etilendiamină tetraacetat disodic (EDTA) 0,5 M – 100 ml

M EDTA = 372,24 g

- se dizolvă 18,61 g EDTA în 80 ml apă distilată
- se agită puternic pe plita cu agitator magnetic
- se ajustează pH-ul la 8,0 cu hidroxid de sodiu (aproximativ 0,2 g NaOH granule)
- se ajustează volumul soluție la 100 ml cu apă distilată
- se autoclavează

EDTA nu se dizolvă dacă pH-ul nu ajunge la 8,0

Soluție stoc clorură de sodiu (NaCl) 1,4 M - 100 ml

M NaCl = 58,44

- se dizolvă 8,19 g NaCl în 80 ml de apă distilată
- se ajustează volumul la 100 ml
- se sterilizează prin autoclavare

Soluție stoc clorură de sodiu (NaCl) 5 M – 100 ml

- se dizolvă 29,22 g NaCl în 80 ml apă distilată
- se ajustează volumul la 100 ml cu apă distilată
- se sterilizează prin autoclavare

Soluție stoc cloroform : alcool izoamilic 24 : 1 100 ml

- la 96 ml cloroform se adaugă 4 ml alcool izoamilic

Soluție stoc 2 x CTAB 2% (bromură de cetiltrimetilamoniu) - 100 ml

- în 80 ml apă distilată se dizolvă 2 g CTAB
- se adaugă 10 ml 1 M Tris, 4 ml 0,5 M EDTA şi 8,2 g NaCl
- se ajustează volumul soluție la 100 ml cu apă distilată

Soluție de lucru 2 x CTAB 2% pentru protocolul B (*se prepară în momentul utilizării)*

- într-un vas Berzelius se pun 15 ml soluție 2 x CTAB 2%
- se încălzeşte la circa 65^0C
- se adaugă treptat 0,400 g PVP şi 400 µl mercaptoetanol
- se ajustează volumul soluție la 20 ml cu apă distilată
- se sterilizează prin autoclavare

Soluție de lucru 2 x CTAB 2% - 10 ml *(se prepară în momentul utilizării)*

- într-o eprubetă gradată se pun 8 ml 2 x CTAB 2% din soluția stoc
- se adaugă la cald (65^0C) - 0,022 g PVP
- după completa dizolvare se adaugă 200 µl acid ascorbic din sol stoc 0,5 M şi 0,08 ml DIECA din sol stoc 0,5 M
- se ajustează volumul soluție la 10 ml cu apă distilată

Soluție salină CTAB 5% 100 ml

- se dizolvă în 80 ml apă distilată 4,1 g NaCl
- se adaugă apoi treptat 5 g CTAB
- se ajustează volumul soluție la 100 ml cu apă distilată
- se sterilizează prin autoclavare

Soluție stoc tampon TE salin 100 ml

- în circa 80 ml de apă distilată se adaugă 1 ml 1 M Tris, 2 ml 0,5 M EDTA şi 5,85 g NaCl
- se ajustează volumul soluție la 100 ml cu apă distilată
- se sterilizează prin autoclavare

Soluție stoc tampon 0,1 x TE 100 ml

- în circa 80 ml apă distilată se dizolvă 0,1 ml 1 M Tris şi 0,2 ml 0,5 M EDTA
- se ajustează volumul soluție la 100 ml cu apă distilată
- se sterilizează prin autoclavare

Soluție stoc acid ascorbic 0,5 M – 10 ml

M acid ascorbic = 176,1 g

- se dizolvă 0,88 g acid ascorbic în 10 ml de apă distilată
- în tamponul de extracție acidul ascorbic are concentrația de 10 mM

Soluție stoc DIECA 0,5M – 10 ml

M DIECA = 255,3 g/l

- se dizolvă 1,12 g DIECA în apă distilată
- se adaugă în tamponul de extracție înainte de utilizare

Soluție stoc alcool etilic 80% - 100 ml

- la 84,21 ml alcool etilic 96% se adaugă 15,79 ml apă distilată

Soluție tampon Tris-acetat (TAE)

Soluție stoc concentrată 50 x – 1000 ml

242 g Tris HCl

57,1 ml acid acetic glacial

100 ml EDTA 0,5M (pH 8.0)

Soluție de lucru 1 x:

Tris-acetat 0,04M

EDTA 0,001 M

Soluție tampon Tris-fosfat (TPE)

Soluție stoc concentrată ***– 1000 ml* 10 x**

108 g Tris

15,5 ml acid fosforic 85% (1,679 g/ml)

40 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)

Soluție de lucru 1 x:

Tris-fosfat 0,09 M

EDTA 0,002 M

Soluție tampon Tris-borat (TBE)

Soluție stoc concentrată 5 x TBE – 1000 ml

54 g Tris

27,5 g acid boric

20 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)

se dizolvă în 1000 ml apă bidistilată

Soluție de lucru 0,5 x Tris-borat

Intr-un balon cotat de 1000 ml se pun 100 ml 5xTBE şi se aduce la semn cu apă distilată sterilă.

Soluție tampon alcalin (folosit numai preparat proaspăt)

Soluție stoc concentrată

1 x: 5 ml NaOH 10 N

2 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)

Soluție de lucru

1 x: NaOH - 50 mM

EDTA - 1mM

Compoziția mediului Murashige-Skoog (1962) utilizat în cultura *in vitro* de segmente nodale la vița de vie

Compoziția minerală şi ionică în macroelemente (mg/l)

Nr crt	Compoziția minerală în macroelemente (mg/l)			Compoziția ionică a macroelementelor m echivalenți/l)			
	Specificare	Masa moleculară	mg/l	Anioni	mE/l	Cationi	mE/l
1.	NH_4NO_3	80,04	1650	NO_3^-	39,41	K^+	20,06
2.	KNO_3	101,04	1900	$H_2PO_4^-$	1,25	Mg^{++}	3,00
3.	$CaCl_2.2H_2O$	147,02	400	SO_4^-	3,00	Ca^{++}	6,00
4.	$MgSO_4.7H_2O$	264,50	370	Cl^-	6,00	NH_4^{++}	20,01
5.	KH_2PO_4	136,09	170				
	Total (mg/l)		4490,0		49,6		49,6

Compoziția minerală şi ionică în microelemente (mg/l)

Nr. crt.	Compoziția minerală în microelemente (mg/l)			Compoziția ionică a microelementelor (m echivalenți/l)			
	Specificare	Masa moleculară	mg/l	Anioni	mE/l	Cationi	mE/l
1.	$MnSO_4.4H_2O$	223,01	22,3	SO_4^{2-}	324,03	Mn^{++}	263,90
2.	$ZnSO_4.7H_2O$	287,54	8,6	Cl^-	0,21	Zn^{++}	59,82
	$CuSO_4.5H_2O$	249,68	0,025			Cu^{++}	0,20
3.	$CoCl_2.6H_2O$	237,93	0,025			Co^{++}	0,21
4.	KI	166,01	0,83			K^+	5,00
5.	$Na_2MoO_4 . 2 H_2O$	241,95	0,25			Na^+	2,07
6.	H_3BO_3	61,83	6,2				
7.	$FeSO_4 . 7 H_2O$	278,03	27,8				
8.	Na_2 EDTA. 2 H_2O	372,25	37,3				
	Total (mg/l)		103,33		324,24		331,2

Vitamine şi aminoacizi componenți ai mediului de cultură Murashige – Skoog (1962)

Denumire	Concentrația în soluția normală mg/l
Acid nicotinic Piridoxină HCl Tiamină HCl	0,5 0,5 0,1
Mezo-inozitol	100
Glicină	2

Listă abrevieri

ADN – acid dezoxiribonucleic

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

AIA - acid beta indolil- acetcic

AIB - acid 3- indolil – butiric

ANA - acid alfa naftil acetic

AP-PCR -Arbitrary Primed PCR

BAP- benzil aminopurină

CTAB - Cetyltrimethyl ammonium bromide

DIECA - acid dietilditiocarbamic

2,4-D - 2,4 acid diclorfenoxiacetic

DMSO - dimetil sulf oxid

DNTP - dezoxiribonucleozid trifosfat

EtBr – bromură de etidiu

FeEDTA – Fier chelatizat (fier etilen diamină tetracetic acid)

ISSR-PCR - Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction)MAAP - Multiple Arbitrary Amplicon Profiling

MSAP - Methyl-Sensitive Amplified Length Polymorphsim

NaCl – clorură de sodiu

NaOCl - hipoclorit de sodiu

NaOH - hidroxid de sodiu

PCR – Polymerase Chain Reaction

PVP - polivinilpirolidonă

RADP - Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

SSR - Simple Sequence Repeats

TDZ - thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3,-thidiazol-5-yl urea)

REZUMAT

Cercetările paleontologice au dovedit că vița de vie a existat înainte de apariția omului pe pământ. Protostrămoşii viței de vie cultivați astăzi se pare că ar fi apărut în perioada cretacică a planetei. Fosilele vitaceaelor din perioada cretacică a planetei au fost însă contestate de majoritatea cercetătorilor, deoarece existau confuzii între presupusele frunze pietrificate de viță de vie şi cele ale arborilor forestieri. Dovezi certe provin din era neozoică sau terțiară - perioada paleogenă. Din această perioadă au fost scoase la iveală cele mai multe fosile ale vitaceaelor, raportate la patru genuri actuale – *Vitis, Ampelopsis, Cayratia, Tetrastigma*.

Procesul esențial, care a generat trecerea de la vița sălbatică la vița cultivată, este variabilitatea naturală, care a permis omului să aleagă vițele cele mai valoroase din flora spontană şi să le cultive în mod conştient (ȚÂRDEA şi colab., 1995).

Studiile ampelografice ajută la aprecierea valorii soiurilor după criterii unice, la compararea caracterelor şi însuşirilor sortimentului cultivat, la evitarea confuziilor dintre unele soiuri apropiate şi eliminarea numeroaselor sinonimii.

În stadiul actual, ampelografia consideră că descrierea botanică este incompletă, fiind necesară şi studierea influenței condițiilor ecologice şi de cultură asupra variabilității caracterelor morfologice şi a însuşirilor agrobiologice şi tehnologice.

Cercetările efectuate la vița de vie au stabilit centrele genetice de formare a genului *Vitis* şi apartenența soiurilor la anumite grupe ecologo-geografice.

La soiurile cu origine certă se cunosc părerile diferiților ampelografi privind momentul când acestea au fost introduse în producție sau semnalate în literatura de specialitate. De asemenea se fac aprecieri asupra provenienței şi modului de apariție la soiurile apărute şi fixate pe cale vegetativă.

În cazul soiurilor cu origine necunoscută sau incertă se menționează date referitoare la vechimea în cultură a soiului, ipoteze cu privire la proveniență, răspândire (POENARU, 1970).

În ameliorare, identificarea soiurilor în primele stadii de dezvoltare este extrem

de dificilă, elementele caracteristice soiului apărând în mod treptat, în anii următori. La prima apariție, unele organe cum ar fi cârceii şi inflorescențele sunt slab dezvoltate devenind, apoi, tot mai tipice pe măsura trecerii anilor (ARDELEAN, 1986).

De asemenea, în cazul portaltoilor, metodele ampelografice de identificare nu pot fi folosite decât în plantațiile de portaltoi, nu şi după altoire.

În ultimii ani, odată cu apariția markerilor moleculari, identificarea cultivarelor s-a realizat la nivel de proteine cu ajutorul izoenzimelor şi la nivel de ADN prin metode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) şi SSR (Simple Sequence Repeats).

Datorită simplității metodei RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA – (WILLIAMS şi colab., 1999), a faptului că necesită cantități extrem de mici de ADN şi a capacității de a releva un grad înalt de polimorfism, aceasta a fost aplicată cu succes la diferite specii de plante, inclusiv la *Vitis vinifera* (WOLF şi colab., 2001; RYAN şi colab., 2001; TESSIER şi colab., 1999; FANIZZA şi colab., 1999; BOHM şi colab., 1998; PAMFIL, 1999).

Cercetările de genetică moleculară la vița de vie sunt orientate, în general, spre identificarea polimorfismului existent în cadrul speciilor de *Vitis* şi spre stabilirea originii filogenetice a unor specii sau soiuri.

Originea şi autenticitatea multor cultivare de viță de vie (*Vitis vinifera*), folosite pentru producția de vin în lume, este neclară şi constituie subiectul multor controverse. În acest sens, într-un studiu, amprentele ADN generate cu ajutorul tehnicilor RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) şi ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction) au fost folosite pentru a compara patru cultivare de *Vitis vinifera* folosite pe scară largă în Chile (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot şi Carmenere). Ca şi referință externă a fost folosit material vegetal provenit din Franța.

Ambele tehnici au fost capabile să evidențieze diferențe între cultivarele studiate, chiar dacă puterea de diferențiere a metodei ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) a fost mai bună decât cea a metodei RAPD.

1. OBIECTIVELE CERCETĂRII, MATERIALUL ŞI METODA

1.1. SCOPUL CERCETĂRILOR

Variabilitatea somaclonală este considerată o sursă de obținere de noi genotipuri în scop de ameliorare deschizând noi posibilități pentru aplicații în viticultură. Cu toate acestea, informații despre variabilitatea la plantele regenerate sunt destul de puține, până în prezent fiind raportate numai câteva exemple de variabilitate somaclonală la vița de vie.

Având în vedere aceste deziderate, s-a considerat utilă abordarea unor cercetări în domeniul biotehnologiilor şi al micropropagării la specia *Vitis vinifera*.

Scopul principal al cercetărilor noastre a constat în caracterizarea şi stabilirea relațiilor filogenetice între zece soiuri de viță de vie, cu ajutorul metodologiei RAPD, precum şi inducerea variabilității somaclonale şi testarea heteromorfismului molecular a somaclonelor obținute din cinci soiuri de viță de vie larg cultivate în Transilvania şi chiar în România.

Cercetările inițiate de noi, constituie, probabil, primele încercări de identificare a variabilității somaclonale la vița de vie prin metoda RAPD.

1.2. OBIECTIVELE URMĂRITE ÎN CERCETĂRILE AFERENTE TEZEI DE DOCTORAT

Obiectivele principale s-au concretizat în următoarele aspecte:

♦ Stabilirea procolului de extracții de ADN şi utilizarea tehnicii RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) în vederea identificării polimorfismului genetic *in vivo* la zece soiuri de viță de vie provenite din cinci stațiuni horticole amplasate în areale geografice diferite.

♦ Identificarea primerilor capabili să determine polimorfismul la nivel molecular între soiurile analizate.

♦ Stabilirea compoziției mediilor de cultură, a tipului de hormoni şi a concentrațiilor acestora care să favorizeze obținerea de neoplantule, creşterea şi proliferarea lăstarilor *in vitro* în urma multiplicării prin lăstărire axilară.

♦ Alegerea tipului de explant şi a mediilor de cultură adecvate pentru inducerea variabilităţii somaclonale, respectiv obţinerea de calus.

♦ Subcultivarea calusului pe un mediu de creştere.

♦ Stabilirea mediilor de cultură pentru regenerarea plantelor prin transferul calusului pe medii de inducere a organogenezei.

♦ Punerea în evidenţă a eventualelor diferenţe genetice apărute între regeneranţi, respectiv între somaclone şi plantele mamă din care au provenit prin analiza RAPD.

2. MATERIALE ŞI METODE DE LUCRU

2.1. MATERIALUL BIOLOGIC

2.1.1. Materialul biologic utilizat în experienţele de diferenţiere a soiurilor cu ajutorul markerilor moleculari

Materialul biologic studiat a fost constituit din zece soiuri de viţă de vie, provenite din cinci staţiuni viticole din ţara noastră amplasate în condiţii pedoclimatice total diferite. Au fost analizate cinci soiuri de viţă de vie pentru vin alb, două soiuri pentru vin roşu şi trei soiuri pentru struguri de masă.

Soiurile pentru vin alb au fost: Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Muscat Ottonel, Traminer roz.

Soiurile pentru vin roşu au fost: Cabernet Sauvignon, Merlot.

Soiurile pentru struguri de masă au fost: Napoca, Timpuriu de Cluj, Cetăţuia.

Staţiunile viticole din care s-a recoltat materialul biologic au fost: Recaş, Blaj, Valea Călugărească, Odobeşti şi Iaşi.

2.1.1.1. Primerii utilizaţi în amplificarea ADN-ului

Pentru amplificarea probelor de ADN s-au utilizat un număr de 39 de primeri decanucleotidici, unul dintre primeri având 21 de nucleotide.

Proveniența primerilor a fost diferită, astfel: 15 primeri decanucleotidici sunt produşi de University of British Columbia (UBC), 6 primeri de Pharmacia Biotech (PB), 18 de Mycroshinth (OPAB, OPA, OPE, OPAL, OPX, AB, GY169) (tabelul 1).

Tabelul 1

Primerii utilizați în amplificarea ADN

Primers used in DNA amplification

Nr. *No.*	Primer *Primer*	Secvența (5' – 3') *Sequence* (5' – 3')	Nr. *No.*	Primer *Primer*	Secvența (5' – 3') *Sequence (5' – 3')*
21.	UBC 228	GCT GGG CCG A	40.	PB 6	CCC GTC AGC A
22.	UBC 241	GCC CGA CGC G	41.	OPAB 11	GTG CGC AAT G
23.	UBC 245	CGC GTG CCA G	42.	OPAB 18	CTG GCG TGT C
24.	UBC 285	GGG CGC CTA G	43.	OPE 14	TGC GGC TGA G
25.	UBC 286	CGG AGC CGG C	44.	AB 11	GTG CGC AAT G
26.	UBC 421	ACG GCC CAC C	45.	OPA 04	AAT CGG GCT G
27.	UBC 436	GAG GGG GCC A	46.	OPA 03	AGT CAG CCA C
28.	UBC 537	CGA AAG GAC T	47.	OPAL 20	AGG AGT CGG A
29.	UBC 538	TGA TCT CTC C	48.	OPX O3	TGG CGC AGT C
30.	UBC 563	CGC CGC TCC T	49.	OPA 01	CAG GCC CTT C
31.	UBC 564	CGG CGT TAC G	50.	GY 169	CTA AGC TGC TTT TGT TTG AGC
32.	UBC 570	GGC CGC TAA T	51.	OPC-14	TGC GTG CTT G
33.	UBC 571	GCG CGG CAC T	52.	OPC 15	GAC GGA TCA G
34.	UBC 584	GCG GGC AGG A	53.	OPA 11	CAA TCG CCG T
35.	UBC 599	CAA GAA CCG C	54.	OPA 17	GAC CGC TTG T
36.	PB 1	GGT GCG GGA A	55.	70.08	CTG TAC CCC C
37.	PB 2	GTT TCG CTC C	56.	OPA 20	GTT GCG ATC C
38.	PB 3	GTA GAC CCG T	57.	70.03	ACG GTG CCT G
39.	PB 4	AAG AGC CCG T	58.	MIC – 07	TGT CTG GGT G
40.	PB 5	AAC GCG CAA C			

2.1.2. Materialul biologic utilizat în experiențele de producere a variabilității somaclonale în condiții de laborator

Materialul biologic utilizat pentru inițierea culturilor *in vitro* a fost constituit din lăstarii aparținând celor zece cultivare de viță de vie din cele cinci stațiuni viticole menționate mai sus.

În studiile privind inducerea calusogenezei s-au utilizat plantulele micropropagate *in vitro*.

Materialul biologic folosit pentru studierea variabilității somaclonale a fost reprezentat de regeneranții obținuți din cultura de calus, respectiv câte zece somaclone din fiecare soi.

2.1.2.1. Medii de cultură folosite

In toate experiențele noastre, mediul de bază utilizat a fost Murashige – Skoog (1962), suplimentat cu diferiți hormoni, în funcție de scopul propus. Substanțele biostimulatoare utilizate în cultura *in vitro* la vița de vie au fost reprezentate de: auxină, acidul alfa naftil acetic (ANA) şi citochinine, respectiv benzil aminopurina (BAP) şi tidiazuronul (TDZ). În funcție de etapa parcursă în procesul de multiplicare *in vitro* s-a utilizat o anumită gamă de concentrații pentru fiecare tip de hormon.

2.2. METODE DE LUCRU

2.2.1. Metode de lucru aplicate în experiențele cu material biologic produs *in vivo*

2.2.1.1. Extracția de ADN în vederea executării analizelor RAPD

Extracția ADN-ului la vița de vie este dificilă datorită prezenței polifenolilor şi a poliglucidelor în cantitate mare. De aceea, în experiențele noastre s-a încercat optimizarea unui protocol de extracție a ADN-ului prin care să se obțină o puritate cât mai mare.

In acest sens, a fost adăugat în tamponul de extracție polivinilpirolidona (PVP), mercaptoetanol, acid ascorbic şi acidul dietilditiocarbamic (DIECA).

Pentru a obține un ADN de calitate care să poate fi utilizat în tehnica RAPD- lui au fost testate trei metode de izolare:

Protocolul A descris de ROGER şi colab. 1988

Protocolul B – descris de ROGER şi colab., 1988 modificat

Protocolul C – descris de LODHI şi colab., 1994, modificat (POP şi colab., 2003).

2.2.1.2. Cuantificarea ADN-ului

După extracția ADN-ului, probele au fost cuantificate spectofotometric cu ajutorul aparatului BioPhotometer Eppendorf.

2.2.1.3. Protocol de amplificare RAPD

Amplificarea probelor s-a realizat în aparatul Eppendorf Mastercycler gradient programat astfel:

- 3 minute la 95^0C – predenaturare, urmată de 45 de cicluri cu următorul profil de temperatură :
    5. 1 minut la 93^0C – denaturare
    6. 1 minut la 34^0C – fixarea primerilor
    7. 1 minut la 72^0C – extensie
    8. extensia finală 10 minute la 72^0C.

2.2.1.4. Analiza imaginilor

Analiza gelurilor s-a făcut cu ajutorul programului Total Lab TL 100, obținându-se matricea binară.

Matricea binară s-a utilizat apoi pentru calcularea distanțelor genetice. Pentru calcularea distanțelor genetice şi realizarea dendrogramei s-a utilizat programul RAPDistance 1.04, utilizând coeficientul Jaccarrd pentru distanțele genetice, respectiv metoda Neighbor Joining Tree pentru dendrogramă.

2.2.2. Metode de lucru aplicate în experiențele cu material biologic produs *in vitro*

2.2.2.1. Multiplicarea prin lăstărire axilară

Pentru studierea capacității regenerative la viță de vie, au fost utilizate ca sursă de explante segmentele nodale provenite de pe lăstarii recoltați din câmp.

Mediul pentru inițierea culturii *in vitro* a fost Murashige –Skoog (1962) suplimentat cu concentrații diferite de hormoni, realizând trei variante de medii de cultură:

V_1 = Mediul MS – 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l ANA, 100 mg/l hidrolizat de cazeină

V_2 = Mediul MS - 1,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l ANA, 100 mg/l hidrolizat de cazeină

V_3 = Mediul MS – 2,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l ANA, 100 mg/l hidrolizat de cazeină.

2.2.2.2. Cultura de calus

Cultura de calus a fost inițiată atât din segmente nodale cât şi din frunze, de la plantulele obținute *in vitro* pe mediul de cultură MS (1962). În vederea inițierii culturii de calus, mediul bazal MS (Murashige –Skoog, 1962) a fost suplimentat cu acid naftil acetic (ANA) în două concentrații:

- MS_1 - cu 10 mg/l ANA şi 1,0 mg/l BAP
- MS_2 – cu 5,0 mg/l ANA şi 1,0 mg/l BAP

2.2.2.3. Inducerea şi dezvoltarea lăstarilor multipli

Pentru inducerea formării lăstarilor multipli, calusul morfogenetic obținut din segmentele nodale a fost transferat pe mediul MS suplimentat cu concentrații variate de TDZ - thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3,-thidiazol-5-yl urea) în combinație cu acidul alfa naftil acetic, în concentrație de 0,5 mg/l.

2.2.2.4. Extracția, cuantificarea, amplificare ADN-ului şi electroforeza în gel de agaroză

Extracția de ADN s-a făcut din frunzele neoplantulelor obținute după a 6-a, a 10-a şi a 15-a pasare pe medii noi de cultură. De la fiecare cultivar s-au analizat câte zece somaclone. Metodele de cuantificare, amplificare şi electroforeză în gel de agaroză au fost similare cu cele aplicate în experiențele cu material biologic produs *in vivo*.

3. REZULTATE ŞI DISCUŢII

3.1. REZULTATE PRIVIND EXTRACŢIA PROBELE DE ADN PROVENITE DIN MATERIALUL BIOLOGIC *IN VIVO*

Din datele obţinute s-a constatat că toţi cei trei factori experimentali (soiul, metoda de extracţie şi localitatea de proveniență), au influenţat distinct semnificativ cantitatea de ADN extrasă. Cantitatea de ADN obţinută prin cele trei variante de extracţie a fost corespunzătoare (77,5-4518,6 ng/µl), având în vedere că pentru amplificare s-au utilizat 50 ng. Cea mai mică cantitate de ADN s-a obţinut la soiul Cetăţuia provenit de la Valea Călugărească, atunci când pentru extracţie s-a aplicat protocolul A (77 ng/µl). Cea mai mare cantitate de ADN respectiv de 4518,6 ng/µl, s-a obţinut tot la soiul Cetăţuia, provenit de această dată de la Blaj, prin utilizarea protocolului C.

In ceea ce priveşte puritatea de AND obţinută, din analiza datelor se constată că cei trei factori experimentali au influenţat distinct semnificativ puritatea ADN-ului. Această semnificaţie se păstrează şi în cazul interacţiunilor duble soi x metodă de extracţie (F = 7,78**>1,62; 2,09), localitate x metodă de extracţie (F = 20,34**>1,98; 2,60), localitate x soi (F = 7,18**>1,45; 1,69), ca şi pentru interacţiunea triplă soi x metodă de extracţie x localitate (F = 5,08**>1,35; 1,53). Diferenţele între media purităţii ADN-ului obţinut prin cele trei protocoale se menţin semnificative, cel mai eficient protocolul fiind C, protocolul A situându-se pe ultimul loc.

3.1.1. Rezultate privind amplificarea şi electroforeza produşilor de reacţie

Din totalul de 39 de primeri utilizaţi iniţial, s-au obţinut polimorfisme cu un număr de 22 primeri, primeri care au fost utilizaţi şi pentru amplificarea somaclonelor obţinute în experienţele *in vivo*.

3.1.2. Rezultate privind analiza imaginilor şi interpretarea datelor

Notarea benzilor s-a realizat direct pe fotografiile gelurilor, prin raportarea la markerul ADN. Benzile polimorfice au fost notate cu 1, iar cele monomorfice cu 0. Prezenţa

benzilor (notate cu 1) şi absenţa benzilor (notate cu 0) au fost înscrise într-un tabel sub formă de matrice binară. Numărul total de benzi generate a fost de 192, dintre care 165 de benzi au fost polimorfice, benzile monomorfice fiind excluse din interpretarea statistică a datelor.

Din datele obţinute de noi a rezultat faptul că toţi primeri utilizaţi au generat un număr de minim două benzi polimorfice. Procentul de polimorfism a avut valori cuprinse între 100% (în cazul primerul UBC 228) şi 50% (pentru primerii OPAB 18 şi OPA 01), valori care conform metodei de analiză a datelor pot fi considerate asigurate statistic (CALDERINI şi colab., 1999).

Analiza gelurilor din experienţele organizate de noi relevă faptul că numărul cel mai mare de benzi polimorfice au fost obţinute cu primerul 6 PB, respectiv 15 benzi (fig. 1), urmat de primerul 5 PB (13 benzi polimorfice). Numărul cel mai mic de benzi au fost generate de primerul OPA 01 – 3 benzi. Datele primare, obţinute cu ajutorul programul Total Lab 100 au fost prelucrate cu programul RAPDistance 1.04, care a calculat distanţele genetice pe baza coeficientului Jaccard.

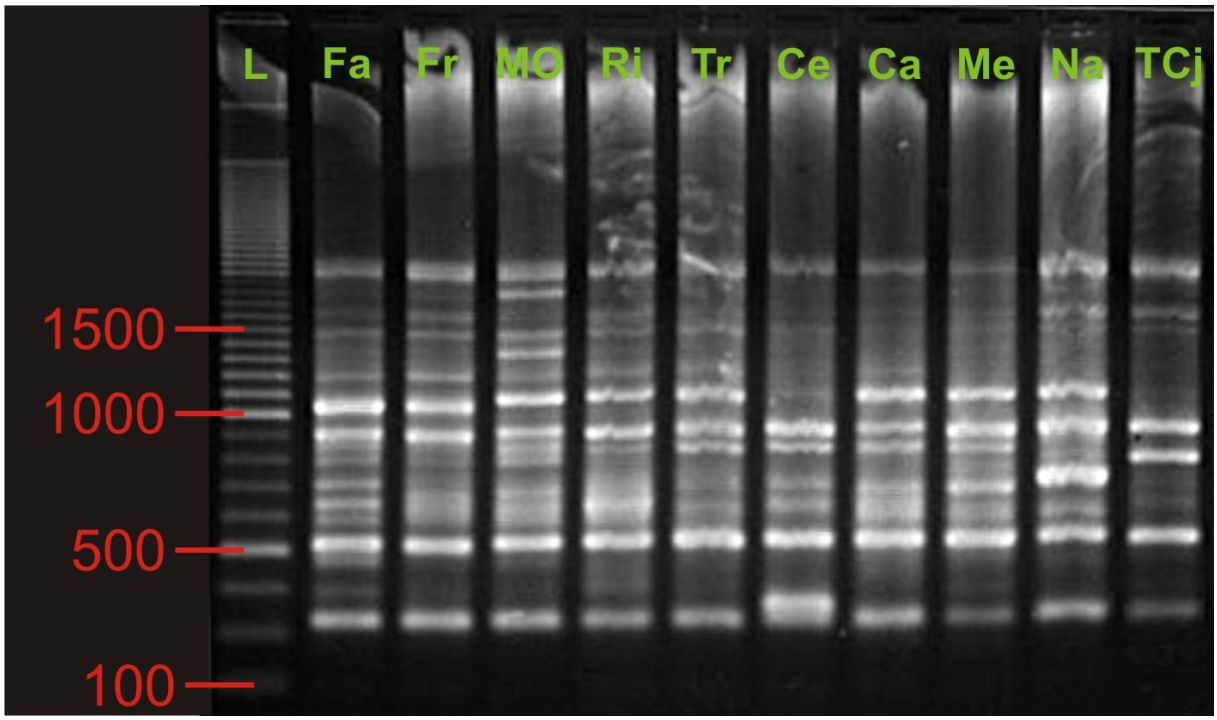


Fig. 1. Produşii de amplificare obţinuţi cu primerul PB 6 la cele zece soiuri de viţă de vie analizate

Amplification products obtained with primer PB 6 in ten cultivars of Vitis vinifera tested

3.1.3. Analiza dendrogramei

Apropierea genetică între cele zece soiuri de viță de vie analizate, stabilită pe baza matricei distanțelor genetice şi a algoritmului Neighbor Joining Tree sunt prezentate în figura 2 sub forma unei dendrograme.

In cadrul dendrogramei se evidențiază două grupuri principale, A şi B. Primul grup cuprinde soiurile Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Cetățuia, Timpuriu de Cluj şi Muscat Ottonel, iar cel de al doilea grup soiurile Merlot, Cabernet Sauvignon, Traminer roz şi Napoca.

Grupul A este constituit, la rândul lui, din alte două subgrupuri, notate cu A1 şi A2. Subgrupul A1 cuprinde soiurile Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Cetățuia şi Timpuriu de Cluj. Soiurile Fetească albă şi Fetească regală sunt în aceeaşi ramură, distanța genetică dintre ele fiind de 0,4421. Din punct de vedere ampelografic cele două soiuri sunt considerate apropiate datorită particularităților lor morfologice. Apropierea genetică dintre cele două soiuri rezultată prin analiza RAPD, confirmă deci rezultatele anterioare conform cărora soiurile respective au o origine comună.

Soiurile Cetățuia şi Timpuriu de Cluj au un părinte comun, în dendrogramă fiind situate în acelaşi subgrup. Şi în acest caz analiza RAPD a confirmat originea comună a acestor două soiuri.

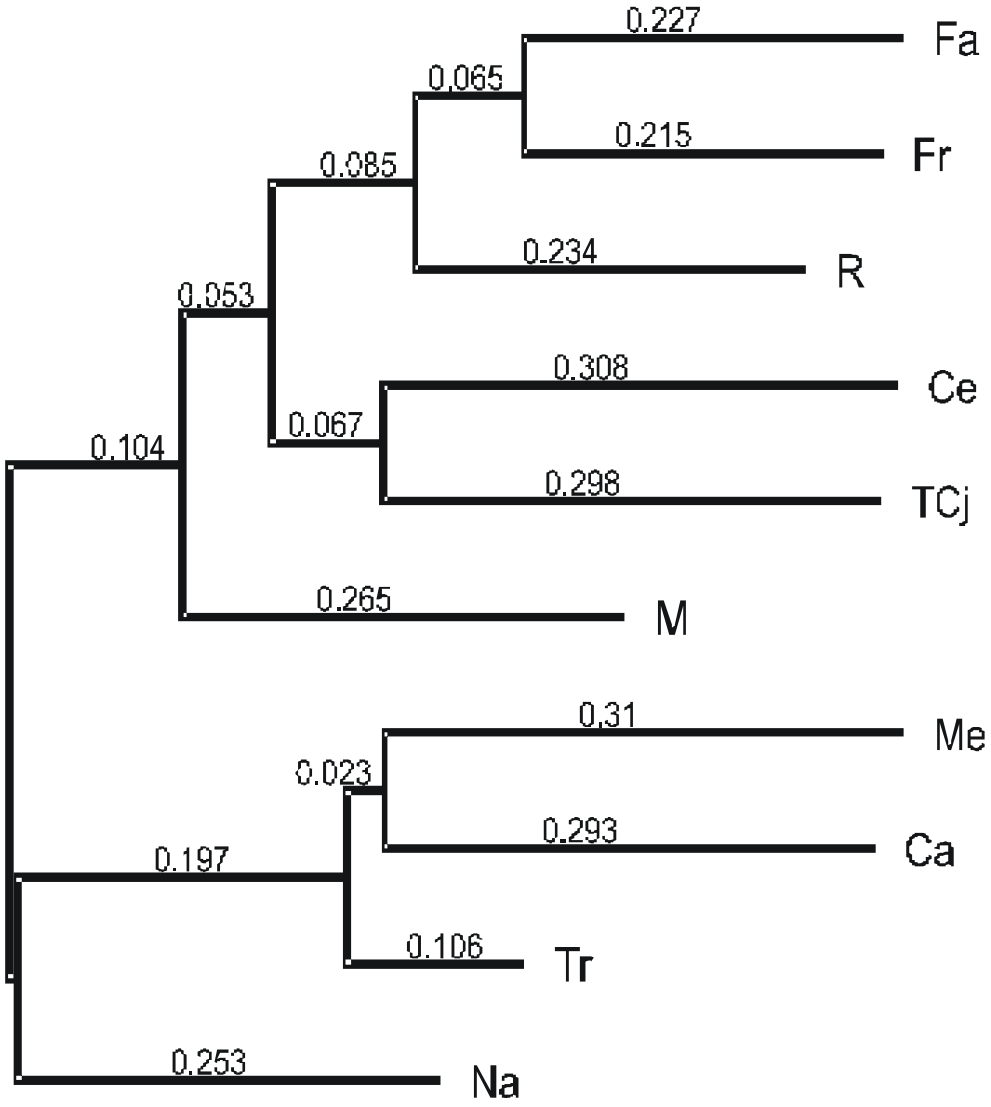


Fig. 2. Dendrograma obținută la cele zece soiuri de viță de vie analizate

Dendrogram of the ten cultivars of Vitis vinifera tested

Grupul B este împărțit şi el în două subgrupuri, respectiv B1 şi B2. Grupul B1 cuprinde soiurile Merlot, Cabernet Sauvignon şi Traminer roz.

Rezultatele experiențelor noastre confirmă faptul că soiul Cabernet Sauvignon şi Merlot sunt apropiate din punct de vedere genetic.

Soiul Traminer roz, deşi este un soi de struguri pentru vinuri albe, se pare că este mult mai apropiat genetic de soiurile roşii. O explicație ar consta în faptul că acest

soi, din punctul de vedere al clasificării pe grupe ecologo-geografice, face parte din *Proles occidentalis*, la fel ca şi soiul Cabernet Sauvignon şi Merlot.

In subgrupul B2 este prezent un singur soi şi anume Napoca, ceea ce sugerează un grad mai îndepărtat de înrudire cu celelalte soiuri analizate.

3.2. REZULTATE OBȚINUTE ÎN EXPERIENȚELE DE MULTIPLICARE *IN VITRO*

3.2.1. Rezultate obținute în experiențele de multiplicare prin lăstărire axilară

Studierea variabilității somaclonale presupune existența unui număr mare de explante. Pentru a asigura o mai mare uniformitate genetică a descendenților s-a ales ca sistem de micropropagare multiplicarea prin lăstărire axilară.

Trebuie remarcat faptul că apariția lăstarilor *in vitro*, ca urmare a multiplicării prin lăstărire axilară, a fost notată la 20 de zile după inițierea culturii, dar numărarea lăstarilor şi măsurătorile privind lungimea acestora şi numărul de noduri/lăstar au fost executate la opt săptămâni de la inițierea culturii.

3.2.1.1. Numărul de lăstari obținuți prin micromultiplicare prin lăstărire axilară

Datele privind influența soiului, a mediului de cultură şi a localității asupra numărului de lăstari obținuți prin multiplicarea din segmente nodale la vița de vie au fost prelucrate statistic, fiind prezentate sub forma tabelului variantelor. Din proba F rezultă că toți factorii experimentali (soi, mediu de cultură, localitatea de proveniență), precum şi interacțiunile simple, duble şi cea triplă dintre aceştia au avut influențe semnificative asupra numărului de lăstari obținuți prin multiplicarea din segmente nodale.

Analizând influența soiului şi a mediului de cultură asupra numărului de lăstari obținuți prin micropropagare prin lăstari axilari la vița de vie, datele prezentate în tabelul 2 relevă faptul că atât soiul cât şi mediul de cultură au avut efecte semnificative asupra acestui caracter.

Tabelul 2

Influenţa soiului (A), a mediului de cultură (B) şi a interacţiunii (A x B) asupra numărului de lăstari de viţă de vie obţinuţi prin micropropagare

Effects of cultivars (A), culture medium (B) and interaction (A xB) upon the number shoots of Vitis vinifera micropropagated

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			***Media soi*** ***Mean of cultivar***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	1,18 t	2,76 lm	6,09 e	**3,34 DE**
Fetească regală	1,60 p	3,09 j	5,57 g	**3,42 D**
Muscat Ottonel	1,46 r	3,04 j	6,58 c	**3,69 B**
Riesling italian	1,46 r	2,74 m	7,12 b	**3,77 B**
Traminer roz	1,40 r	4,82 h	6,30 d	**4,17 A**
Cabernet Sauvignon	1,49 r	2,91 k	7,70 a	**4,03 A**
Napoca	1,42 r	2,52 n	5,65 g	**3,20 E**
Cetăţuia	1,30 s	2,07 o	2,83 kl	**2,07 G**
Timpuriu de Cluj	1,46 r	2,49 n	3,78 i	**2,58 F**
Merlot	1,68 p	3,13 j	5,95 f	**3,59 C**
Media mediu de cultură ***Mean of culture medium***	**1,45 P***	**2,96 N**	**5,76 M**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,15-0,17
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,06-0,07
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,09-0,10

* Diferenţele dintre oricare două variante urmate de cel puţin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

3.2.1.2. Lungimea lăstarilor obţinuţi prin multiplicarea din segmente nodale

Ca şi în cazul numărului de lăstari, şi pentru lungimea lăstarilor obţinuţi prin culturi *in vitro* de segmente nodale, la cele zece soiuri de viţă de vie, pe trei medii de cultură diferite, se observă din datele obţinute, că toţi factorii experimentali şi toate interacţiunile dintre aceştia (duble şi triplă) au efecte semnificative asupra acestui caracter.

Influenţa soiului şi a mediului de cultură asupra lungimii lăstarilor de viţă de vie obţinuţi prin micropropagare din segmente nodale este prezentată în tabelul 3. Ca şi în cazul caracterului studiat anterior, pe primele două locuri se situează două soiuri pentru vin alb (Traminer roz: 5,55 cm şi Riesling italian: 4,98) urmat de data aceasta,

la diferenţe semnificative, de un soi pentru vinuri roşii (Cabernet Sauvignon: 4,84 cm). Celelalte soiuri înregistrează valori mult mai mici ale caracterului studiat, ce ajung până la 3,40 cm la soiul de struguri de masă Timpuriu de Cluj.

Tabelul 3

Influenţa soiului (A), a mediului de cultură (B) şi a interacţiunii (A x B) asupra lungimii lăstarilor (cm) de viţă de vie obţinuţi prin micropropagare

Effect of cultivars (A), culture medium (B) and interaction (A x B) upon the length (cm) of Vitis vinifera shoob obtained micropropagated

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi *Mean of cultivar***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	3,08 o	3,40 m	4,52 gh	**3,67 IJ**
Fetească regală	3,26 n	3,55 lm	4,57 gh	**3,79 I**
Muscat Ottonel	3,70 k	3,94 j	4,76 f	**4,13 H**
Riesling italian	3,54 lm	4,50 h	6,89 c	**4,98 E**
Traminer roz	3,22 n	5,22 e	8,22 a	**5,55 D**
Cabernet Sauvignon	3,58 l	3,79 k	7,14 b	**4,84 F**
Napoca	3,72 k	3,99 j	4,54 gh	**4,08 H**
Cetăţuia	2,58 q	3,48 m	4,60 g	**3,55 J**
Timpuriu de Cluj	2,13 r	2,93 p	5,14 e	**3,40 K**
Merlot	2,95 p	4,13 i	6,13 d	**4,40 G**
Media mediu de cultură *Mean of culture medium*	**3,18 C***	**3,89 B**	**5,65 A**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,15-0,17
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,03
DS 5% pentru două medii soi x mediu cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,09-0,10

* Diferenţele dintre oricare două variante urmate de cel puţin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

3.2.1.3. Numărul de noduri/neoplantulă observat în urma micromultiplicării din segmente nodale la viţa de vie

Ca şi în cazul celor două caractere analizate anterior, tabelul varianţei pentru influenţa soiului, mediului de cultură şi a localităţii asupra numărului de noduri/neoplantulă obţinute prin micromultiplicare din segmente nodale, la viţa de vie, arată o probă F ce scoate în evidenţă acţiunea distinct semnificativă a tuturor factorilor şi interacţiunilor dintre factori (tabelul 4).

Tabelul 4

Analiza varianței pentru experiența trifactorială de tipul 10 x 3 x 5 (soi x mediul de cultură x localitate de proveniență)
(Influenta soiului, mediului de cultură şi a localității asupra numărului de noduri obținuți prin micromultiplicare din segmente nodale la vița de vie)

The three way Anova type experiment 10 x 3 x 5 (cultivars x culture medium x provenance)

Cauza variabilității *Cause of variability*	SP *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Parcele mari	531,47	29		
Repetiții	1,03	2		
Factorul A (soiul de viță de vie)	525,96	9	58,44	234,93**>1,92; 2,50
Eroare (a)	4,478	18	0,249	
Parcele mijlocii	1557,29	60		
Factorul B (mediul de cultură)	1091,20	2	545,60	2716,53**>3,04;4,71
Interacțiunea A x B	458,05	18	25,45	126,70**>1,62;2,09
Eroare (b)	8,034	40	0,2008	
Parcele mici	78,57	360		
Factorul C (localitatea de proveniență)	14,37	4	3,59	54,62**>2,41;3,41
Interacțiunea A x C	19,13	36	0,53	8,08**>1,45;1,69
Interacțiunea B x C	2,99	8	0,37	5,69**>1,98;2,60
Interacțiunea A x B x C	26,29	72	0,37	5,55**>1,35;1,53
Eroare (c)	15,789	240	0,0658	

Analizând influența soiului asupra numărului de noduri/neoplantulă se observă că, între cele zece soiuri luate în studiu, există diferențe semnificative privind acest caracter. Cel mai mare număr de noduri/neoplantulă se înregistrează la soiul Traminer roz (6,65 noduri/neoplantulă) urmat, la diferențe semnificative, de soiul Riesling italian (4,61 noduri/neoplanutulă). Ordinea variantelor celor mai bune pentru acest caracter este identică cu cea înregistrată la lungimea neoplantulelor fapt ce vine în sprijinul afirmației anterioare privind corelația directă şi pozitivă (r = 0,90**) între lungimea neoplantulei şi numărul de noduri pe care îl formează.

Mediul de cultură a influențat în mod şi mai evident decât soiurile numărul de noduri/neoplantulă înregistrat în experiență (tabelul 5). Mediul MS – 2,5 mg/l BAP duce la formarea unor neoplantule cu cel mai mare număr de noduri (6,07) celelalte două medii plasându-se mult sub valoarea menționată mai sus (mediul MS – 0,5 mg/l

BAP = 2,35 noduri/neoplantulă, iar mediul MS – 1,0 mg/l BAP = 3,45 noduri/neoplantulă).

Tabelul 5

Influența soiului (A), a mediului de cultură (B) şi a interacțiunii (A x B) asupra numărului de noduri/neoplantule obținut prin micromultiplicare din segmente nodale la vița de vie

The effect of cultivar (A), culture medium (B) and interaction (A x B) upon the number of nodes/neoplants obtained in Vitis vinifera by micropropagation from nodal semgments

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi *Mean of cultivar***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	3,42 k	2,20 o	6,80 b	**4,14 C**
Fetească regală	2,42 n	3,03 lj	5,73 d	**3,72 D**
Muscat Ottonel	2,09 op	4,59 f	4,81 e	**3,83 D**
Riesling italian	2,91 jk	4,45 g	6,48 c	**4,61 B**
Traminer roz	2,84 kl	4,94 e	12,16 a	**6,65 A**
Cabernet Sauvignon	2,72 lm	2,84 kl	6,73 b	**4,10 C**
Napoca	2,63 m	3,35 k	4,17 h	**3,38 E**
Cetățuia	1,41 r	3,07 l	3,66 j	**2,71 F**
Timpuriu de Cluj	1,11 s	2,22 o	4,28 h	**2,54 F**
Merlot	1,98 p	3,84 i	5,83 d	**3,88 D**
Media mediu de cultură *Mean of culture medium*	**2,35 P***	**3,45 N**	**6,07 M**	

DS 5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,21-0,24
DS 5% pentru două medii mediu de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,11-0,14
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,14-0,17

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significant*

3.2.2. Rezultate obținute în experiențele de inducere a calusogenezei

Variabilitatea somaclonală este asociată adesea cu regenerarea directă din calus sau din suspensii de celule (KARP, 1989). Se apreciază că există o strânsă legătură între parcurgerea fazei de calus şi variabilitatea somaclonală, fapt ce a determinat ca, în micropropagare în scop de înmulțire fidelă a materialului inițial, să se evite formarea calusului.

Având în vedere că unul din obiectivele tezei a fost acela al studierii variabilității somaclonale la vița de vie, în experiențele executate în acest sens a fost indusă etapa de formare a calusului.

Concentrația de ANA 10 mg/l, utilizată de noi în mediile de cultură, a dat naştere unui calus friabil, în timp ce concentrația mai mică, respectiv de 5 mg/l ANA a dus la obținerea unui calus nefriabil şi în cantitate foarte mică.

3.2.3. Rezultate experimentale privind regenerarea de neoplantule din calus menținut timp îndelungat în cultură

Capacitatea organogenă sau embriogenă a țesutului calusal este dependentă de factorii endogeni şi exogeni, de numărul pasărilor, de condițiile de cultură şi de vârsta calusului. Literatura citează cazuri în care calusurile repicate periodic, chiar şi după o perioadă de cinci ani şi-au menținut potențialitatea ridicată de a regenera plante. În cazul calusului obținut de noi la vița de vie, capacitatea regenerativă s-a menținut pentru o perioadă mult mai scurtă, de circa 7-8 luni.

3.2.3.1. Numărul de neoplantule regenerate

Experiențele de regenerare de neoplantule din calus menținut timp îndelungat în cultură (3-4 pasări) au fost şi ele de tip bifactorial cuprinzând cele zece soiuri de viță de vie menționate anterior şi trei medii de cultură MS la care s-au adăugat cantități diferite de TDZ: 0,5 mg/l, 1,0 mg/l şi 2,0 mg/l. Aceste variante de mediu au fost alese pe baza datelor din literatura de specialitate care menționează faptul că adaosul de cantități mici şi moderate de TDZ în mediul de cultură stimulează regenerarea de neoplantule din calusul organogen, mai ales la speciile lenoase şi recalcitrante.

Din tabelul varianțelor se constată că toți factorii experimentali (soi, mediu de cultură), precum şi interacțiunea soi x mediu de cultură au avut influențe semnificative asupra numărului de neoplantule regenerate (tabelul 6).

Tabelul 6

Tabelul varianței. Numărul de neoplantule regenerate în experiența bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viță de vie şi medii de cultură folosite în regenerarea de neoplantule din calus

Table of variance. Number of plant regenerated from callus in two way experiment (10 x 3) with cultivars of Vitis vinifera on culture media

Cauza *Cause*	SPA *SS*	GL *DF*	s^2	**Proba F** ***F test***
Totală	3233,42	89		
Repetiții	5,56	2		
Variante	3223,57	29		
Factorul A	16,90	9	1,9	25,4** > 2,04; 2,72
Factorul B	3177,12	2	1588,6	21484,8**> 3,15; 4,98
Ineracțiunea A x B	29,55	18	1,6	22,2**> 1,81; 2,32
Eroare	4,29	58	0,1	

Analizând influența soiului asupra numărului de lăstari regenerați se observă, din datele tabelului 7, că aceasta este relativ omogenă, toate soiurile regenerând un număr de 8,13 până la 9,60 lăstari/calus regenerativ.

3.2.3.2. Lungimea lăstarilor (neoplantulelor) regenerați

Tabelul 8 prezintă sinteza rezultatelor experimentale privind lungimea lăstarilor regenerați din calus la cele zece soiuri de viță de vie pe trei medii de cultură.

Analiza influenței mediului asupra lungimii lăstarilor regenerați urmează aproape acelaşi model ca şi cel descris la numărul de lăstari regenerați. Concret, cea mai mare lungime a lăstarilor regenerați se înregistrează la mediul cu cea mai scăzută concentrație de TDZ (0,5 mg/l). Mediile cu concentrații moderate (1,0 mg/l) şi mari (2,0 mg/l) de TDZ duc la obținerea unor lăstari scurți şi foarte scurți comparativ cu varianta trei de mediu.

Tabelul 7

Numărul de neoplantule regenerate în experiența bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viță de vie şi medii de cultură folosite în regenerarea de neoplantule din calus

Number of plants regenerated in two way experiment (10 x 3) with Vitis vinifera cultivars and culture media

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi *Mean of cultivar***
	MS – 1,0 mg/l TDZ	MS – 2,0 mg/l TDZ	MS - 0,5 mg/l TDZ	
Fetească albă	4,50 g	4,20 gh	15,70 c	**8,13 F**
Fetească regală	6,50 d	3,70 h	18,60 a	**9,60 A**
Muscat Ottonel	5,30 f	4,50 g	18,70 a	**9,50 AB**
Riesling italian	5,40 f	3,80 h	18,60 a	**9,27 C**
Traminer roz	4,50 g	3,90 gh	17,50 b	**8,63 E**
Cabernet Sauvignon	6,30 d	4,30 gh	17,50 b	**9,37 BC**
Napoca	5,50 ef	4,50 g	15,80 c	**8,60 E**
Cetățuia	5,70 def	3,80 h	17,30 b	**8,93 C**
Timpuriu de Cluj	5,80 def	4,50 g	16,80 b	**9,03 CD**
Merlot	6,10 de	3,97 gh	17,30 b	**9,12 D**
Media mediu cultură ***Mean of culture medium***	**5,56 N***	**4,12 P**	**17,38 M**	

DS5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,14-0,17
DS5% pentru două medii de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,28-0,30
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,57-0,69

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significan*

3.2.4. Rezultate privind identificarea, la nivel molecular, a variabilității somaclonale indusă prin regenerarea din calus menținut timp îndelungat în cultură

3.2.4.1. Rezultate privind extracția şi cuantificarea ADN-ului

Extracția de ADN s-a realizat pe baza protocolului elaborat de LODHI şi colab, modificat (POP şi colab., 2003).

Cantitatea de ADN obținută a fost corespunzătoare (220 ng/µl şi 1947 ng/µl),

având în vedere că pentru amplificare s-au utilizat 50 ng. Puritatea ADN-ului a fost, de asemenea, corespunzătoare fiind cuprinsă între 1,7 şi 2,0. Extracția de ADN s-a făcut, la neoplantulele regenerate, din calus din subcultura a 5-a, a 10-a şi a 15-a.

Tabelul 8

Lungimea (cm) a neoplantulelor regenerate în experiența bifactorială (10 x 3) cu soiuri de viță de vie şi medii de cultură folosite în regenerarea de neoplantule din calus

Length (cm) of plants in the two way experiment (10 x 3) with cultivars of Vitis viniffera and culture media used in plant regeneration from callus

Soiul *Cultivar*	Mediul de cultură *Culture medium*			**Media soi *Mean of cultivar***
	MS – 1 mg/l TDZ	MS – 2 mg/l TDZ	MS- 0,5 mg/l TDZ	
Fetească albă	1,47 bc	0,80 def	2,60 a	**1,62 B**
Fetească regală	1,37 c	0,70 ef	2,80 a	**1,62 B**
Muscat Ottonel	1,60 bc	0,80 def	2,73a	**1,71 A**
Riesling italian	1,60 bc	0,60 f	2,73 a	**1,64 B**
Traminer roz	1,57 bc	0,57 f	2,60 a	**1,58 C**
Cabernet Sauvignon	1,70 b	1,00 d	2,60 a	**1,77 A**
Napoca	1,63 bc	0,63 ef	2,53a	**1,60 B**
Cetățuia	1,60 bc	0,60 f	2,67 a	**1,62 B**
Timpuriu de Cluj	1,60 bc	0,70 ef	2,67 a	**1,66 B**
Merlot	1,50 bc	0,87 de	2,77 a	**1,71 A**
Media mediu cultură *Mean of culture medium*	**1,56 N***	**0,73 P**	**2,67 M**	

DS5% pentru două medii soi (*SD 5% for two means of variety*) = 0,08-0,110
DS5% pentru două medii de cultură (*SD 5% for two means of culture medium*) = 0,17-0,18
DS 5% pentru două medii soi x mediu de cultură (*SD 5% for two means of interaction*) = 0,28-0,35

* Diferențele dintre oricare două variante urmate de cel puțin o literă comună sunt nesemnificative
**The differences between any two values followed by at least a common letter are not significan*

3.2.4.2. Rezultate privind amplificarea şi electroforeza produşilor de reacție

Pentru amplificarea probelor s-au folosit cei 22 primeri care au dat benzi polimorfice în cazul extracție de ADN pentru soiurile de viță de vie recoltate din câmp.

S-a constatat că neoplantule regenerate la subcultura a 15-a prezintă variabilitate la nivel molecular. Această variabilitatea a fost observată la un număr mic de soiuri (cinci), acestea prezentând un număr mic de somaclone. Cele mai multe

somaclone au fost identificate la soiul Merlot (cinci).

În gelurile de agaroză mai întâi au fost pipetate probele de ADN aparţinând plantei mamă, urmate apoi de probele de ADN ale somaclonelor. Notaţiile din imagini fiind următoarele: Cabernet Sauvignon – CR (planta mamă), CR1, CR2, CR3; Fetească albă - F (planta mamă), F1; Merlot – Mr (planta mamă), Mr1, Mr2, Mr3, Mr4, Mr5; Traminer roz – T (planta mamă), T1 şi Riesling italian – Ri (planta mamă) Ri1, Ri2, Ri3.

Fragmentele rezultate prin amplificarea cu primerii polimorfici au avut lungimea cuprinsă între 200 şi 2000 pb, majoritatea având între 300 şi 1400 pb.

Numărul cel mai mare de benzi polimorfice au fost obţinute cu primerul OPX 03 (12 benzi) (fig. 2), cu primerul OPE 14 (11 benzi polimorfice), OPA 04 (10 benzi polimorfice), PB 6 (10 benzi polimorfice), PB 1 (9 benzi polimorfice), primerul PB 3 (7 benzi polimorfice), primerul PB 5 (8 benzi polimorfice), primerul 70.08 (6 benzi polimorfice). Ceilalţi primeri utilizaţi au format de asemenea între şase şi nouă benzi polimorfice.

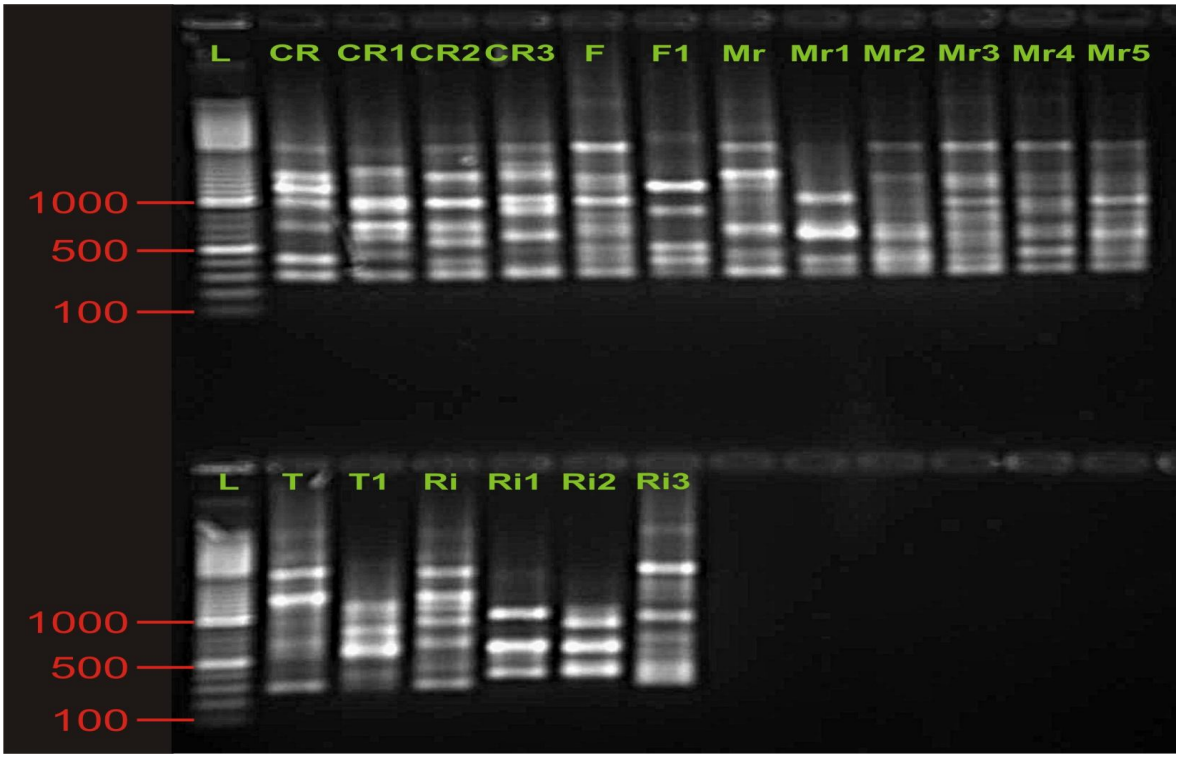


Fig. 2. Produşii de amplificare obţinuţi cu primerul OPX 03 la somaclonele de viţă de vie analizate

Amplification products obtained with primer OPX 03 in somaclones of Vitis vinifera analysed

Din figurile obţinute şi analizate reiese în mod clar că, la toate somaclonele analizate, există diferenţe notabile de structură genetică, relevate de markeri RAPD. Dendrograma realizată pe baza distanţelor genetice dintre soi şi somaclonele sale ilustrează şi mai clar măsura în care, la nivel molecular, somaclonele se deosebesc de soiurile din care provin. Apropierea genetică între soiurile de viţă de vie şi somaclonele identificate în aceste soiuri, stabilită pe baza matricei distanţelor genetice şi a algoritmului Neighbor Joining Tree, sunt prezentate în figura 3 sub forma unei dendrograme.

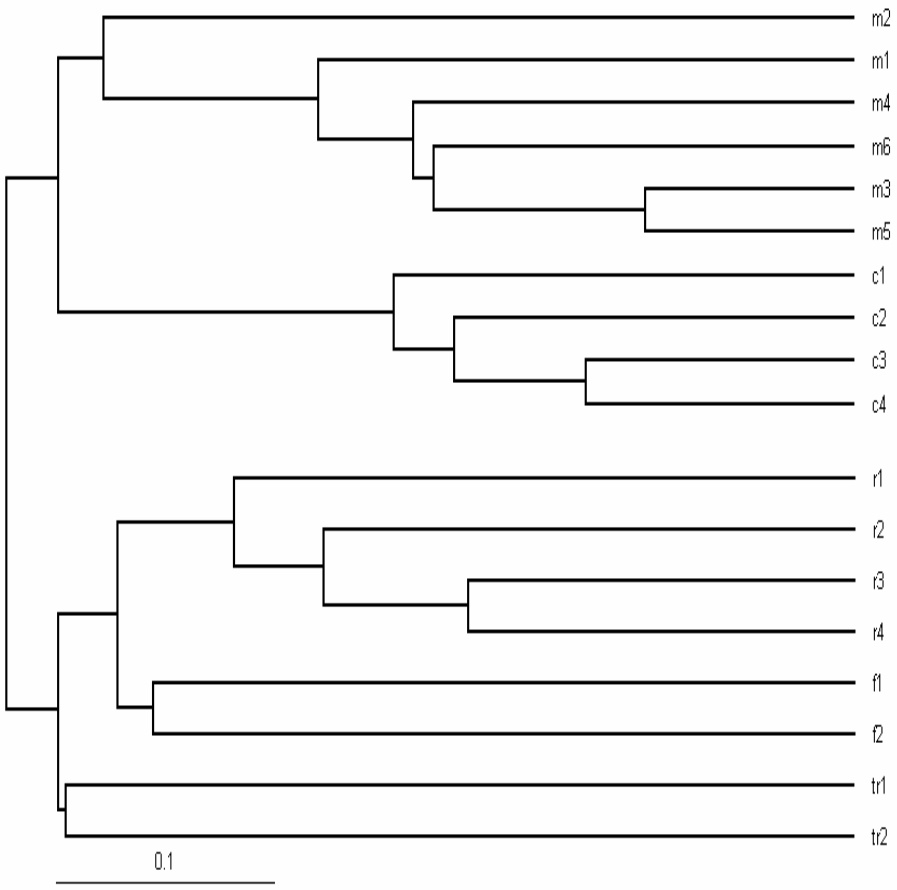


Fig. 3. Dendrograma obţinută la soiurile şi somaclonele de viţă de vie analizate

Dendrogram of cultivars and somaclones of Vitis vinifera analysed

În cadrul dendrogramei se evidenţiază faptul că soiul de viţă de vie şi somaclonele obţinute din acel soi sunt apropiat grupate. De asemenea, se constată că

soiurile Cabernet Sauvignon şi Merlot, împreună cu somaclonele lor sunt reprezentate în acelaşi subgrup, la fel ca şi în cazul dendrogramei obţinute pentru cele zece soiuri de viţă de vie analizate *in vivo*. Un alt subgrup este format din soiurile şi somaclonele de Fetească albă şi Riesling italian, similar cu grupul reprezentat în dendrograma celor zece soiuri de viţă de vie analizate.

Faptul că somaclonele fiecărui soi sunt strict reprezentate în acelaşi grup atestă acurateţea rezultatelor experimentale obţinute. Pe de altă parte, analiza dendrogramei în cadrul fiecărui grup relevă faptul că somaclonele sunt cu adevărat diferite din punctul de vedere al structurii genetice, atât în interiorul grupului cât şi între grupe.

4. CONCLUZII

4.1. CONCLUZII REFERITOARE LA VARIABILITATEA, LA NIVEL MOLECULAR A MATERIALULUI BIOLOGIC PROVENIT *IN VIVO*

In urma cercetărilor noastre efectuate la ni vel molecular la cele zece soiuri de viţă de vie provenite din cinci localităţi, se desprind următoarele concluzii:

4.1.1. În analizele RAPD o condiţie esenţială o constituie obţinerea unui ADN în cantităţi corespunzătoare şi de puritate mare. Dintre cele trei protocoale de extracţie utilizate s-a dovedit că protocolul C a dat cele mai bune rezultate. Cu ajutorul acestui protocol, puritatea ADN-ului a avut valori cuprinse între 1,7 şi 2, puritate ce a permis utilizarea lui în manipulările ulterioare. Includerea în tamponul de extracţie a inhibitorilor de fenoloxidază, cum ar fi acidul dietilenditiocarbamic (DIECA), a antioxidanţilor – acidul ascorbic sau a polivinilpirolidonei (PVP) au eliminat brunificarea extractului.

4.1.2. Din analiza varianţei, aplicată rezultatelor de extracţie a ADN, a reieşit că toţi cei trei factori experimentali (soiul, metoda de extracţie şi localitatea), au influenţat distinct semnificativ cantitatea de ADN extrasă.

4.1.3. Între soiuri există diferenţe asigurate statistic în ceea ce priveşte cantitatea de ADN obţinută, indiferent de metoda de extracţie aplicată, ceea ce sugerează că

genotipul, la vița de vie, influențează în mod hotărâtor cantitatea de ADN ce poate fi extrasă prin metode curent folosite în acest scop. Metoda de extracție a avut, de asemenea, o influență semnificativă asupra cantității de ADN ce se poate obține, indiferent de localitatea de experimentare.

4.1.4. Datele rezultate din analiza varianței pentru experiența trifactorială arată că cei trei factori experimentali au influențat distinct semnificativ şi puritatea ADN-ului. Această semnificație se păstrează şi în cazul interacțiunilor duble soi x metodă de extracție, localitate x metodă de extracție, localitate x soi, ca şi pentru interacțiunea triplă soi x metodă de extracție x localitate.

4.1.5. Calcularea ecuației de regresie relevă faptul că relația dintre cantitate şi puritate este liniară, datele individuale grupându-se destul de strâns în jurul liniei de regresie, în ambele cazuri: "r" calculat pe baza criteriului soi x metodă de extracție şi pe baza criteriului localitate x metodă de extracție. Corelația dintre cele două variabile este directă şi pozitivă, creşterea cantității de ADN ducând la o creştere a purității acestuia (r = 0,89**).

4.1.6. Coeficientul de corelație r = 0,86** indică, de asemenea, o legătură directă între mediile localităților şi cantitatea de ADN extrasă, ceea ce duce în mod automat la sporirea semnificativă a purității acestuia.

4.1.7. Alegerea primerilor s-a dovedit destul de dificilă, deoarece din cei 39 de primeri utilizați numai 22 au dat benzi polimorfice distincte.

4.1.8. Adăugarea PVP-ului în concentrație de 2% în tamponul de amplificare a probelor s-a dovedit, de asemenea, benefică. PVP-ul a redus efectul inhibitor al polifenolilor şi a facilitat marcarea benzilor necesare analizei statistice.

4.1.9. Soiurile analizate se diferențiază la nivel molecular, respectându-se clasificarea sistematică a acestora pe baza caracteristicilor lor morfo-fiziologice (precocitate, culoarea boabelor, pubescență) şi a clasificării din punct de vedere ecologo-geografic, respectiv prolesuri.

4.1.10. Distanțele genetice cele mai mari au fost înregistrate între soiurile total neînrudite, în timp ce distanțele genetice mici arată o înrudire mai mult sau mai puțin apropiată între soiurile respective, analiza RAPD fiind în general în concordanță cu datele din taxonomia clasică.

4.1.11. Dendrograma obținută relevă faptul că soiul Fetească regală este foarte apropiat din punct de vedere genetic de soiul Fetească albă, confirmând ipoteza că cele două soiuri au o origine comună. Soiul Cabernet Sauvignon şi Merlot sunt, de asemenea, foarte apropiate din punct de vedere genetic, lucru confirmat şi de alți autori.

4.1.12. Analizând acelaşi soi dar care a provenit din stațiuni diferite s-a constat că nu există diferențe între ele, acestea fiind omogene, ceea ce sugerează că producerea materialului săditor s-a făcut în mod corespunzător.

4.2. CONCLUZII REFERITOARE LA MATERIALUL BIOLOGIC OBȚINUT *IN VITRO*

4.2.1. Numărul de lăstari obținuți la micropropagarea prin lăstărire axilară la vița de vie este influențat hotărâtor de genotip şi mediul de cultură.

4.2.2. Soiurile cu cea mai ridicată capacitate de reacție la cultura *in vitro* din segmente nodale par a fi Cabernet Sauvignon şi Traminer roz, iar mediul de cultură cel mai adecvat acestui scop s-a dovedit a fi MS – 2,5 mg/l BAP.

4.2.3. Deoarece mediul de cultură are cea mai puternică influență asupra numărului de neoplantule obținut la micropropagarea prin lăstărire axilară, se întâlnesc şi cazuri de interacțiuni între factori care duc la rezultate ce aparent contrazic cele spuse mai sus (exemplu, la soiul Riesling italian, soi pentru vinuri albe, micropropagat pe MS-2,5 mg/l BAP numărul de lăstari obținuți este imediat în apropierea celui realizat la soiul Cabernet Sauvignon). Aceasta este o dovadă în plus că interacțiunea soi x mediu de cultură influențează în mod decisiv caracterul analizat.

4.2.4. Soiul, mediul de cultură şi localitatea de proveniență a soiului au influențat în mod semnificativ lungimea lăstarilor obținuți prin cultura *in vitro* de segmente nodale la vița de vie.

4.2.5. Cea mai accentuată influență asupra caracterului menționat mai sus o are mediul de cultură, de departe mediul MS – 2,5 mg/l BAP ducând la obținerea celor mai bine dezvoltate neoplantule obținute prin cultura *in vitro* de segmente nodale, la diferențe semnificative de oricare alte variante.

4.2.6. Faptul că şi între localități există diferențe semnificative în ceea ce priveşte lungimea lăstarilor obținuți prin micromultiplicarea din segmente nodale poate fi explicat prin nivelele diferite de interacțiune dintre genotip şi mediul său specific, diferențe ce se concretizează în probabilitatea mai accentuată sau mai puțin accentuată la culturile *in vitro*.

4.2.7. Soiul de viță de vie, mediul de cultură utilizat şi locul de proveniență al cultivarului ce a furnizat explantul, precum şi interacțiunile dintre aceşti trei factori au influențat în mod semnificativ numărul de noduri/explant obținut în urma micromultiplicării prin segmente nodale.

4.2.8. În toate cazurile analizate, atât pentru influențele factorilor, cât şi pentru influențele interacțiunilor dintre aceştia, numărul de noduri/neoplantulă a reprodus fidel modelul de variație înregistrat pentru lungimea lăstarilor (neoplantulelor).

4.2.9. Rezultatele noastre confirmă observația generală că, la vița de vie, numărul de noduri/neoplantulă este corelat direct şi pozitiv cu dimensiunile (lungimea) neoplantulelor respective, lăstarii mai lungi având tendința de a forma un număr mai mare de noduri.

4.2.10. Din analiza datelor privind influența soiului şi a mediului de cultură asupra cantității de calus format în experiențele de inducere a calusogenezei, se poate concluziona că greutatea calusului format în urma primei pasări pe medii calusogene, la cele zece soiuri de viță de vie studiate, depinde în mod decisiv de mediu de cultură

şi într-o mică măsură de interacţiunea soi x mediu de cultură.

4.2.11. La viţa de vie concentraţiile moderate şi mari de TDZ ale mediului de cultură influenţează negativ numărul de neoplantule regenerate din calusul organogen. Dimpotrivă, un efect stimulativ asupra numărului de regeneranţi şi a lungimii acestora îl are mediul cu adaos scăzut de TDZ (0,5 mg/l). Pe un astfel de mediu neoplantulele formate sunt în număr foarte mare, de lungimi apreciabile, dar total lipsite de rădăcini.

4.2.12. Soiul de viţă de vie nu a avut, practic, influenţe semnificative asupra numărului regeneranţilor obţinuţi şi a lungimii acestora ceea ce ne permite să afirmăm că modul de comportare al calusului regenerativ pe medul de cultură cu adaos de TDZ este general valabil pentru toate soiurile de viţă de vie încercate.

4.2.13. Analiza benzilor formate prin migrarea în gel a ADN-ului amplificat cu primeri RAPD, arată clar că, la toate somaclonele analizate, există diferenţe notabile de structură genetică faţă de soiurile din care provin.

4.2.14. În cadrul dendrogramei se evidenţiază faptul că soiul de viţă de vie şi somaclonele obţinute din acel soi sunt strâns grupate. De asemenea, se constată că soiurile Cabernet Sauvignon şi Merlot, împreună cu somaclonele lor sunt reprezentate în acelaşi subgrup, la fel ca şi în cazul dendrogramei obţinute pentru cele zece soiuri de viţă de vie analizate *in vivo*. Soiurile şi somaclonele de Fetească albă şi Riesling italian formează un subgrup similar cu cel reprezentat în dendrograma celor zece soiuri de viţă de vie analizate.

4.2.15. Se poate afirma, pe baza rezultatelor prezentate că analizele RAPD reprezintă un instrument sensibil de identificare la nivel molecular a variabilităţii somaclonale apărută la viţa de vie în condiţiile menţinerii îndelungate a calusului şi subculturilor *in vitro*.

4.2.16. Este evident că somaclonele identificate cu ajutorul analizelor RAPD vor trebui, în mod obligatoriu verificate în condiţii *in vivo* pentru a vedea dacă variabilitatea observată la nivel molecular poate fi observată şi la nivel fenotipic.

SUMMARY

Paleonthologic research has it that grapevine had been in existence before man's advent. The proto-ancestors of the grapevine in cultivation nowadays seem to have come up in the Cretaceous system of the planet Earth. However, fossils of Vitaceae from the Cretaceous system of the planet were refuted by most of scientist as there existed mix-ups between the supposed petrified grapevine leaves and those of forest arbours. Reliable proof comes from the Neozoic or Tertiary eras –the Paleogenic period. This period provided for most of the Vitaceae fossils as to the four current genera—*Vitis, Ampelopsis, Cayratia, Tetrastigma.*

The core process generating the passage from the wild vine to the cultivated one is the natural variability which allowed man to select the most valuable vines from the spontaneous flora and grow these in full awareness (ȚÂRLEA *et. al.*, 1995).

In the present state, however, ampelography asserts that the botanical description is faulty—thus, it has also become necessary the study of ecologic- and of culture influence on the variation in the morphological characters and the agrobiologic and technologic traits.

Research on vine has established the genetic centres where the genus *Vitis* is formed, as well as the belonging of genera to certain ecologic-geographic group.

In the case of the genera of unknown- or unsure origin there are mentioned data referring to the oldness in cultivation of the genus as well as hypotheses regarding the provenance , spread (POENARU, 1970).

In plant improvement, the identification of genera in their first stages of development is extremely difficult as the elements characteristic to the genus are coming up gradually, during the following years. At first advent, some organs, such as tendrils and inflorescences, are poorly developed, becoming later more and more typical with lapse of time (ARDELEAN, 1986).

During these last years, with the coming out of molecular markers, the identification of cultivars has been carried out at protein level with the aid of isoenzymes as well as at DNA level assisted by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) methods; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); AFLP (Amplified

Fragment Length Polymorphism); and SSR (Simple Sequence Repeats).

Due to the easiness of RAPD-method – Random Amplified Polymorphic DNA— (WILLIAMS *et .al.,* 1999), i.e., it needs very low quantities of DNA as well as its ability to reveal high degree of polymorphism, it has successfully been applied with various plant species, including *Vitis vinifera* (WOLF *et. Al.,* 2001; RYAN *et al.,* 2001; TESSIER *et al.,*1999; FANIZZA *et al.,* 1999; BOHM *et al.,* 1998; PAMFIL, 1999).

Research on the molecular genetics in grapevine is directed –in general- toward the identification of polymorphism extant within the frames of the genera *Vitis* and toward the determination of the phylogenetic origin of certain species or genera.

1. RESEARCH OBJECTIVES, MATERIAL AND METHOD

1.1. SCOPE OF RESEARCH

Somaclonal variation is taken for one source of obtaining new genotypes having the scope of plant improvement, thus paving the way to new possibilities of application in viticulture. Against all odds, information on variation in regenerated plants is rather scarce and, so far there have been reported only a few examples of somaclonal variation in the vine.

In view of such desiderata, it has been considered beneficial to start up an investigation in the domain of biotechnologies and micropropagation with the genus *Vitis vinifera*.

The main scope of our research consisted in the characterization and determination of phylogenetic connections among ten vine cultivars aided by RAPD-methodology, as well as inducing somaclonal variation and testing the molecular heteromorphism in somaclones obtained from five vine cultivars widely cultivated in Transylvania and even in Romania.

The research work initiated by us probably means the first attempts in identifying somaclonal variation in vine by the RAPD method.

1.2.OBJECTIVES PURSUED WITHIN THE INVESTIGATIONS APPERTAINING TO THE THESIS

The main objectives took shape in the following :

- Laying down the protocol of DNA-extractions and applying the RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)-techniques in view of identifying *in vivo* genetic polymorphism with ten vine cultivars coming from five horticultural stations in differing geographic areas.
- Identification of primers capable to establish polymorphism among the varieties analyzed at molecular level.
- Determination of composition of culture media, of the type of hormones and their concentration which would favour securing of neoplantules; growth and proliferation of sprouts *in vitro* after multiplication through axillary shooting.
- Selection of explant type and culture media adequate for inducing somaclonal variation and obtaining calluses, respectively.
- Subcultivation of the callus on growth medium.
- Determination of culture media for plant regeneration through transferring the callus on to media inducing organogenesis.
- Highlighting of possible genetic differences appearing between regenerants, between somaclones and female plants in which they originated through RAPD-analysis, respectively.

2. MATERIALS AND METHODS OF WORK

2.1. BIOLOGICAL MATERIAL

2.1.1. Biological material in experiments meant to differentiate cultivars aided by molecular markers

The biological material studied was made up of ten grapevine cultivars coming from five vine-growing stations - in this country - located within pedoclimatic conditions differing altogether. There were analyzed five vine cultivars for white wine, two for

claret/red wine, and three for table grapes. Those for white wine were: Fetească albă, Fetească regală, Italian Riesling, Muscat Ottonel, Traminer rose. Those for claret: Cabernet Sauvignon, Merlot. Those for table grapes: Napoca, Timpuriu (early) de (of) Cluj, Cetățuia.

The stations providing the biological-material are located at Recaş, Blaj, Valea Călugărească, Odobeşti and Iaşi.

2.1.1.1. Primers utilised for DNA amplification

To amplify the DAN samples, a number of 39 decanucleotid primers were used, one of the primers having 21 nucleotides.

The provenance of the primers differed; thus, 15 decanucleotid primers produced by the University of British Columbia (UBC), 6 by Pharmacia Biotech (PB), 18 by Mycroshinth (OPAB, OPA, OPE, OPAL, OPX, AB, GY 169) (see Table 1).

Table 1

Primers used in DNA amplification

No.	*Primer*	*Sequence* (5' – 3')	*No.*	*Primer*	*Sequence (5' – 3')*
1.	UBC 228	GCT GGG CCG A	21.	PB 6	CCC GTC AGC A
2.	UBC 241	GCC CGA CGC G	22.	OPAB 11	GTG CGC AAT G
3.	UBC 245	CGC GTG CCA G	23.	OPAB 18	CTG GCG TGT C
4.	UBC 285	GGG CGC CTA G	24.	OPE 14	TGC GGC TGA G
5.	UBC 286	CGG AGC CGG C	25.	AB 11	GTG CGC AAT G
6.	UBC 421	ACG GCC CAC C	26.	OPA 04	AAT CGG GCT G
7.	UBC 436	GAG GGG GCC A	27.	OPA 03	AGT CAG CCA C
8.	UBC 537	CGA AAG GAC T	28.	OPAL 20	AGG AGT CGG A
9.	UBC 538	TGA TCT CTC C	29.	OPX O3	TGG CGC AGT C
10.	UBC 563	CGC CGC TCC T	30.	OPA 01	CAG GCC CTT C
11.	UBC 564	CGG CGT TAC G	31.	GY 169	CTA AGC TGC TTT TGT TTG AGC
12.	UBC 570	GGC CGC TAA T	32.	OPC-14	TGC GTG CTT G
13.	UBC 571	GCG CGG CAC T	33.	OPC 15	GAC GGA TCA G
14.	UBC 584	GCG GGC AGG A	34.	OPA 11	CAA TCG CCG T
15.	UBC 599	CAA GAA CCG C	35.	OPA 17	GAC CGC TTG T
16.	PB 1	GGT GCG GGA A	36.	70.08	CTG TAC CCC C
17.	PB 2	GTT TCG CTC C	37.	OPA 20	GTT GCG ATC C
18.	PB 3	GTA GAC CCG T	38.	70.03	ACG GTG CCT G
19.	PB 4	AAG AGC CCG T	39.	MIC – 07	TGT CTG GGT G
20.	PB 5	AAC GCG CAA C			

2.1.2. Biological material used in experiments of producing somaclonal variation within laboratory conditions

The biological material used to initiate cultures *in vitro* has been made up of shoots pertaining to the ten vine cultivars of the five vine-growing stations aforementioned.

In the studies regarding the inducement of callus genesis plantules micropropagated *in vitro* were used.

The biological material used to study the somaclonal variation was represented by regenerants gained *via* callus cultures, i.e., ten somaclones each from every variety, respectively.

2.1.2.1.Culture media used

With all of our experiments the main medium used was the Murashige-Skoog (1962) one, supplemented with varied hormones, according to the scope in view. Biostimulating substances used in *in vitro* culture with vine were represented by: auxin, naftil acetic alpha acid (NAA) and cytokins, benzyl aminopurine (BAP) and tidiazurone (TDZ), respectively. Depending on the stage covered within the process of *in vitro* multiplication, a certain concentration span for each type of hormone was used.

2.2. WORK METHODS

2.2.1. Work methods applied in the experiments with biological material produced *in vivo*

2.2.1.1. The Extraction of DNA in view of carrying out the RAPD analyses

The extraction of DNA in the vine is difficult due to the presence of polyphenols and of polyglucides in large quantities. Therefore, our experiments were trying to optimize a protocol of DNA extraction possessing an as high degree of purity as possible. Thus, mercaptoethanol, ascorbic acid and diethylditiocarbamic acid (DIECA) were added in the polivinilpirolidon extraction buffer.

In order to obtain quality DNA allowing for utilization in RAPD-techniques there were tested three methods of isolation:

Protocol A described by ROGER et al., 1988

Protocol B described by ROGER et al., 1988 modified

Protocol C described by LODHI et al., 1994, modified (POP et al., 2003).

2.2.1.2. Amplifying- RAPD Protocol

Samples were amplified by means of an Eppendorf Master cycler gradient programmed as follows:

- 95° C for 3 minutes - predenaturation, followed by 45 cycles with the following temperature profile :
  1. 93^{0}C for 1 minute - denaturation
  2. 34^{0}C for 1 minute - fixing of primers
  3. 72^{0}C for 1 minute - extension
  4. 72^{0}C for 10 minutes final extension.

2.2.1.3. Image analysis

The analysis of gels has been carried out by means of the program Total Lab TL 100 and the binary matrix was obtained , which was later used in calculating the genetic distances. To calculate the genetic distances and fulfill the dendrogram we have used the RAPD Distance l.04 program and the Jaccard coefficient for the genetic distances and the Neighbor Joining Tree method for the dendrogram, respectively.

2.2.2. Work methods applied in the experiments with biologic material produced *in vitro*

2.2.2.1. Multiplication by axillary shooting

To study the regenerating ability of vine, there have been used as explant source the nodal segments originating in shoots harvested in field.

The medium for initiating the *in vitro* culture was the Murashige-Skoog (1962) one, supplemented with varying concentrations of hormones, having been obtained three variations of culture media:

V_1 = MS medium - 0.5 mg/1 BAP, 0.5mg/1 NAA , 100 mg/1 hydrolyzed casein;

V_2 = MS medium – 1.0 mg/1 BAP, 0.5 mg/1 NAA , 100 mg/1 hydrolyzed casein;

V_3 = MS medium – 2.5.mg/ 1 BAP, 0.5 mg/1 NAA, 100 mg/1 hydrolyzed casein.

2.2.2.2. Callus culture

The callus culture has been initiated both from nodal segments and from leaves, from the plants obtained *in vitro* in MS culture medium (1962). In view of initiating the callus culture the MS (Murashige – Skoog, 1962) basic medium has been supplemented with naftil acetic acid (NAA) in two concentrations:

- MS_1 - with 10 mg/l NAA and 1.0 mg/BAP
- MS_2 - with 5mg/1 NAA and 1.0 mg/1 BAP.

2.2.2.3. Induction and development of multiple shoots

In order to induce the formation of multiple shoots, the morphogenetic callus obtained from nodal segments has been transferred on to MS medium supplemented with various concentrations of TDZ – thidiazuron (N-phenyl- N'-1,2,3,-thidiazol-5-yl urea) in combination with the acetic naftil alpha acid, in concentration of 0.5 mg/l.

2.2.2.4. Extraction, quantification, amplification of DNA and electropohoresis on agarose gel

DNA - extraction was from leaves of neoplantules obtained after the 6th, 10th and 15th passage on to new culture media. From each of the cultivars there were analyzed ten somaclones. The methods of quantification, amplification and agarose-gel electrophoresis were similar to those applied in the experiments on biologic material produced *in vivo*.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. RESULTS REGARDING THE EXTRACTION OF DNA SAMPLES COMING FROM *IN VIVO* BIOLOGIC MATERIAL

The data obtained revealed that all the three experimental factors i.e., variety, extraction method and provenance, did significantly and distinctly influenced the extracted DNA. The DNA quantity obtained through the three extractions variations was adequate (77.5 – 4518.6 ng/µl), considering that for amplification 50 ng. was needed. The largest amount of DNA, i.e., 4518.6 ng/µl, was obtained from Cetățuia grape cultivar coming from Blaj, by utilising protocol C.

In so far as DNA-purity is concerned, the data obtained revealed that the three experimental factors have distinctly and significantly influenced DNA-purity. Such significance is being kept also with the double-variety interactions x extraction method (F = 7.78**>1.62; 2.09), location x extraction method (F = 20.34**>1.98; 2.60), location X cultivar (F = 7.18**>1.45; 1.69), as well as for triple-variety interaction x extraction method x location (F = 5.08**>1.35; 1.53). Differences in DNA- purity means, obtained with the three protocols, maintain themselves on significant levels, the most efficient protocol being the C one; protocol A placed itself on the lowest position.

3.1.1. Results concerning amplification and electrophoresis of reaction products

Of the 39 primers initially utilized, there were obtained polymorphisms with a number of 22 primers which were also used to amplify somaclones obtained with *in vitro* experiments.

3.1.2. Results regarding the analysis if images and interpretation of data

Band markings were performed directly on the gel photos, by reporting to the DNA-marker. The polymorphic bands were marked with 1, and the monomorphic ones with 0. The presence of bands (marked with 1) and the absence of bands (marked 0) were inscribed in a table as binary matrix . The total number of the generated bands was of 192; of these, 165 were polymorphic, the monomorphic ones being ousted from the statistic

interpretation of data.

3.1.3. Dendrogram analysis

The closeness of the ten types of vine varieties checked, based on the matrix of the genetic distances and on Neighbor Joining Tree algorithm are introduced in Fig.1 as a dendrogram.

Within the dendrogram one can notice two main groups, i.e., A and B. The former includes *Fetească albă, Fetească regală, Italian Riesling, Cetățuia, Timpuriu de Cluj* and *Muscat Ottonel* cultivars and, the latter, *Merlot, Cabernet, Traminer Rose* and *Napoca* cultivars.

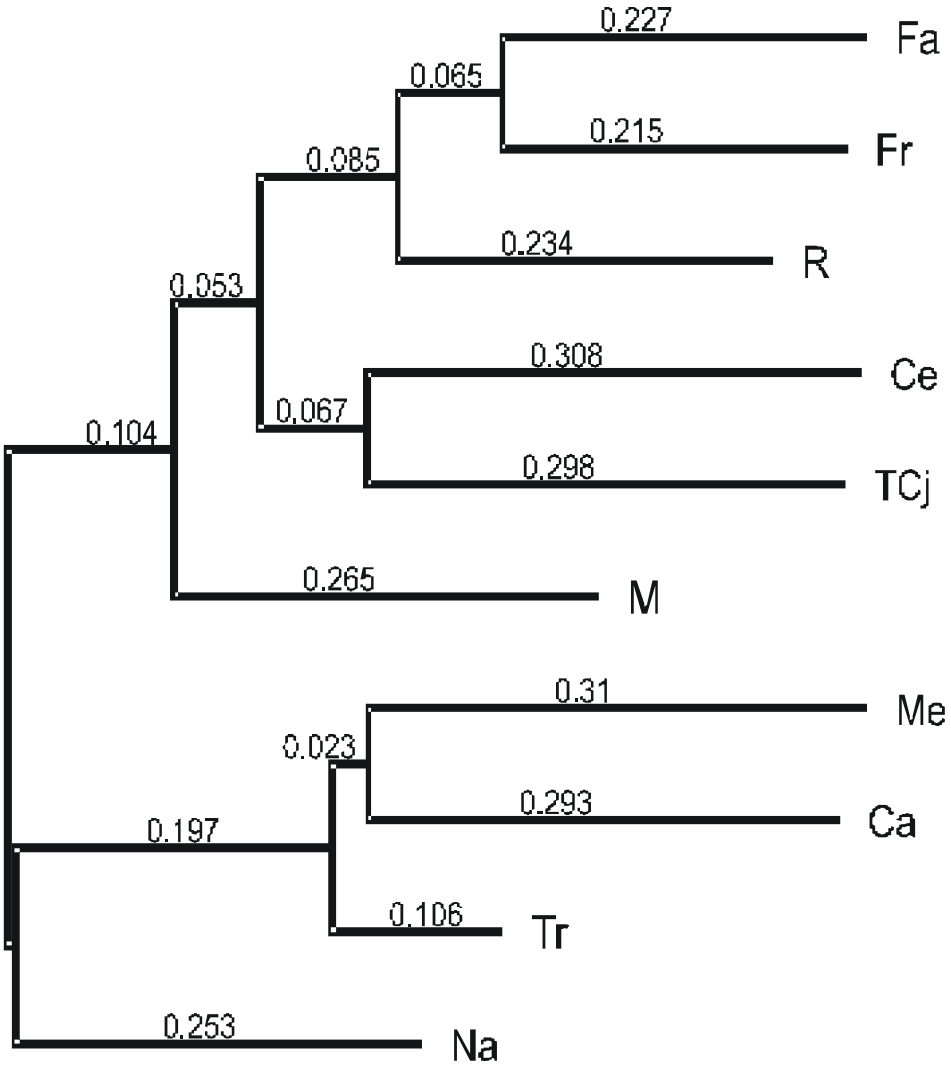


Fig. 1. The dendrogram of the ten cultivars of tested *Vitis vinifera*

Group A is made up - at its turn - of other two subgroups, marked A1 and A2. Subgroup A1 includes the varieties *Fetească albă* and *Fetească regală* which are from the same branch, the genetic distance between them being of 0.4421. The genetic closeness between the two varieties, resulting from RAPD-analysis, thus stands witness to the previous results confirming the common ancestry of the respective varieties.

The *Cetățuia* and *Timpuriu de Cluj* cultivars have a common parent, being situated within the same group in the dendrogram. With this case too, the RAPD-analysis confirmed the common ancestry of these two varieties.

Group B is also divided into two subgroups, B1 and B2, respectively. Group B1 includes *Merlot, Cabernet Sauvignon* and *Traminer Rose.*

The results obtained in our experiments confirm the fact that *Cabernet Sauvignon* and *Merlot* stand close from genetic point-of-view. *Traminer Rose* - in spite of being a variety for white wines, it seems that it is much more close genetically to the red cultivars. One explanation would consist in the fact that this cultivar - from the point-of-view of classification per ecologic-geographic groups—belongs to *Proles occidentalis,* like the other two.

3.2. RESULTS OBTAINED WITH *IN VITRO* MULTIPLICATION EXPERIMENTS

3.2.1. Results obtained in experiments of multiplication through axillary shooting

3.2.1.1. Numbers of shoots obtained in multiplication through axillary shooting

The data on soil , culture medium and location influence on numbers of shoots obtained by multiplying vine nodal segments were statistically processed and displayed in the variation table. Sample F reveals that all the experimental factors (cultivars, culture medium, location of the provenance), as well as the simple, double and triple interactions among these have had significant influences upon the numbers of shoots obtained by multiplication from nodal segments.

The analysis of data on variety- and culture medium influence on the numbers of shoots obtained with micropropagation through vine axillary shooting presented in Table 2, reveal that both variety and culture medium have had significant effects on this trait.

Table 2

Effects of cultivar (A), culture medium (B) and of the interaction (A x B) upon the numbers of shoots of micropropagated *Vitis vinifera*

Cultivar	*Culture medium*			***Mean of cultivar***
	MS-0,5 mg/l BAP	MS – 1,0 mg/l BAP	MS – 2,5 mg/l BAP	
Fetească albă	1,18 t	2,76 lm	6,09 e	**3,34 DE**
Fetească regală	1,60 p	3,09 j	5,57 g	**3,42 D**
Muscat Ottonel	1,46 r	3,04 j	6,58 c	**3,69 B**
Riesling italian	1,46 r	2,74 m	7,12 b	**3,77 B**
Traminer roz	1,40 r	4,82 h	6,30 d	**4,17 A**
Cabernet Sauvignon	1,49 r	2,91 k	7,70 a	**4,03 A**
Napoca	1,42 r	2,52 n	5,65 g	**3,20 E**
Cetățuia	1,30 s	2,07 o	2,83 kl	**2,07 G**
Timpuriu de Cluj	1,46 r	2,49 n	3,78 i	**2,58 F**
Merlot	1,68 p	3,13 j	5,95 f	**3,59 C**
Mean of culture medium	**1,45 P***	**2,96 N**	**5,76 M**	

SD 5% for two means of variety =0.15 – 0.17
SD 5% for two means of culture medium = 0.06 – 0.07
SD 5% for two means of interaction = 0.09 – 0.10
*Differences between any two values followed by at least one common letter are not significant

3.2.1.2. Length of shoots obtained through multiplication from nodal segments

Similarly with the numbers of shoots, the length of shoots obtained in *in vitro* cultures of nodal segments, with the ten vine cultivars , on three differing culture media, one can deduce from the data introduced by Table 3 that all of the experimental factors and all interactions among these (double and triple) have significant effects upon this character.

Cultivar - and culture-medium influence on vine length obtained through micropropagation from nodal segments is introduced by Table 4. As with the previously studied trait, the first two places are taken by two white-wine cultivars (Traminer rose: 5.55 cm and Italian Riesling: 4.98 cm*)* followed – this time – with significant differences, by a red-wine cultivar (Cabernet Sauvignon: 4.84 cm*)*. The other cultivars record much lower values of the checked trait, reaching up to 3.4o cm with the table-grapes cultivar, i.e., Timpuriu de Cluj.

Table 3

Analysis of the three-way Anowa type 10 x 3 x 5 (cultivar x culture medium x provenance)

Cause of variability	SS	DF	s^2	**F test**
Total	886,16	449		
Large plots	200,36	29		
Repeats	0,55	2		
Factor A (vine cultivar)	197,44	9	21,94	166,6**8>1,92;2,50
Error (a)	2,369	18	0,132	
Midplots	626,28	60		
Factor B (culture medium)	485,68	2	242,84	7238,86**>3,04;4,71
Interaction A x B	139,26	18	7,74	230,62**>1,62;2,09
Error (b)	1,342	40	0,0335	
Small plots	59,52	360		
Factor C (provenance)	9,79	4	2,45	54,26** >2,41;3,41
Interaction A x C	16,37	36	0,45	10,08** >1,45;1,69
Interaction B x C	3,05	8	0,38	8,46**>1,98;2,60
Interaction A x B x C	19,47	72	0,27	5,99** >1,35;1,53
Error (c)	10,830	240	0,0451	

Table 4

Effects of cultivar (A), culture medium (B) and of interaction (A x B) upon length (cm) of Vitis vinifera shoots obtained via micropropagation

Cultivar	*Culture medium*			***Mean of cultivar***
	MS-0.5 mg/l BAP	MS – 1.0 mg/l BAP	MS – 2.5 mg/l BAP	
Fetească albă	3,08 o	3,40 m	4,52 gh	**3,67 IJ**
Fetească regală	3,26 n	3,55 lm	4,57 gh	**3,79 I**
Muscat Ottonel	3,70 k	3,94 j	4,76 f	**4,13 H**
Riesling italian	3,54 lm	4,50 h	6,89 c	**4,98 E**
Traminer roz	3,22 n	5,22 e	8,22 a	**5,55 D**
Cabernet Sauvignon	3,58 l	3,79 k	7,14 b	**4,84 F**
Napoca	3,72 k	3,99 j	4,54 gh	**4,08 H**
Cetățuia	2,58 q	3,48 m	4,60 g	**3,55 J**
Timpuriu de Cluj	2,13 r	2,93 p	5,14 e	**3,40 K**
Merlot	2,95 p	4,13 i	6,13 d	**4,40 G**
Mean of culture medium	**3,18 A***	**3,89 B**	**5,65 C**	

SD 5% for two means of variety = 0.15-0.17
SD5% for two means of culture medium =0,03
SD5% for two means of interaction =0,09-0,10

**Differences between any two values followed by at least one common letter are not significant*

3.2.1.3. Number of nodes/neoplantules noticed after micromultiplication from vine nodal segments

As with the other two traits previously analyzed, the table of variance for the influence of cultivar, culture medium and location upon the numbers of nodes/neoplantules obtained by multiplication from nodal segments in the vine, shows one F-sample highlighting the distinctly significant action of all factors as well as interactions among factors (Table 5).

Table 5

Analysis of the three Anowa type 10 x 3 x 5 (cultivar x culture medium x provenance)

Cause of variability	SS	DF	s^2	**F test**
Large plots	531,47	29		
Repeats	1,03	2		
Factor A (vine cultivar)	525,96	9	58,44	234,93**>1,92;2,50
Error (a)	4,478	18	0,249	
Middplots	1557,29	60		
Factor B (culture medium)	1091,20	2	545,60	2716,53**>3,04;4,71
Interaction A x B	458,05	18	25,45	126,70**>1,62;2,09
Error (b)	8,034	40	0,2008	
Small plots	78,57	360		
Factor C (provenance)	14,37	4	3,59	54,62**>2,41;3,41
Interaction A x C	19,13	36	0,53	8,08**>1,45;1,69
Interaction B x C	2,99	8	0,37	5,69**>1,98;2,60
Interaction A x B x C	26,29	72	0,37	5,55**>1,35;1,53
Error (c)	15,789	240	0,0658	

3.2.2. Experimental results regarding neoplantule regeneration from callus maintained in culture for long time

The organic ability, or embryogenesis, of the callus tissue depends on both endogenous and exogenous factors, on the number of passages, on culture conditions and, the age of the callus.

3.2.2.1. Numbers of regenerated neoplantules

The Table of Variance reveals that all of the experimental factors (cultivar, culture medium), as well as the interaction cultivar x culture medium had significant influence on the numbers of regenerated neoplantules (Table 6).

Table 6

Table of Variance. Numbers of neoplantules regenerated in the bifactorial experience (10 x 3) with vine cultivars and culture media used in the regeneration of neoplantules from callus

Cause	SS	DF	s^2	**F test**
Overall	3233,42	89		
Repeats	5,56	2		
Variants	3223,57	29		
Factor A	16,90	9	1,9	25,4* > 2,04; 2,72
Factor B	3177,12	2	1588,6	21484,8**> 3,15; 4,98
Interaction A x B	29,55	18	1,6	22,2**> 1,81; 2,32
Error	4,29	58	0,1	

By analyzing the influence of the cultivar upon the numbers of regenerated shoots, one can notice – from the data in Table 7 – that this is relatively homogenous, i.e., all cultivars will regenerate a number of 8.13 up to 9.60 shoots/regenerating callus.

Table 7

Numbers of plants regenerated in the two-way experiment (10 x 3) with cultivars of *Vitis vinifera* and culture media

Cultivar	*Culture medium*			***Mean of cultivar***
	MS – 1.0 mg/l TDZ	MS – 2.0 mg/l TDZ	MS – 0.5 mg/l TDZ	
Fetească albă	4,50 g	4,20 gh	15,70 c	**8,13 F**
Fetească regală	6,50 d	3,70 h	18,60 a	**9,60 A**
Muscat Ottonel	5,30 f	4,50 g	18,70 a	**9,50 AB**
Riesling italian	5,40 f	3,80 h	18,60 a	**9,27 C**
Traminer roz	4,50 g	3,90 gh	17,50 b	**8,63 E**
Cabernet Sauvignon	6,30 d	4,30 gh	17,50 b	**9,37 BC**
Napoca	5,50 ef	4,50 g	15,80 c	**8,60 E**
Cetățuia	5,70 def	3,80 h	17,30 b	**8,93 C**
Timpuriu de Cluj	5,80 def	4,50 g	16,80 b	**9,03 CD**
Merlot	6,10 de	3,97 gh	17,30 b	**9,12 D**
Mean of culture medium	**5,56 N***	**4,12 P**	**17,38 M**	

SD5% for two means of variety = 0.14-0.17
SD 5% for two means of culture medium = 0.28-0.30
SD 5% for two means of interaction = 0.57-0.69

*Differences between any two values followed by at least one common letter are not significant

3.2.2.2. Length of regenerated shoots (neoplantules)

The data in Table 8 (Table of variances) presents the significance of the action of the two experimental factors and of the interaction between these upon the length of the regenerants.

One can notice that –statistically – only factor B (culture medium) had significant impact upon the length of the regenerated shoots and, the cultivar and the interaction between cultivar and medium, had the F- calculated smaller than the theoretical F.

Table 8

Variance table. Length of regenerated plants (cm) in two-way experiment (10 x 3) with cultivars of *Vitis vinifera* and culture media utilized in callus regeneration

Cause	SS	DF	s^2	**F test**
Overall	59,74	89		
Repeats	0,03467	2		
Variants	57,9773	29		
Factor A (cultivar)	0,27956	9	0,03	1,04 < 2,04; 2,72,
Factor B (culture medium)	57,0127	2	28,51	954,60**>3,15; 4,98
Interaction A x B	0,68511	18	0,04	1,27<1,81, 2,32
Error	1,7	58	0,03	

The longest regenerated shoots were recorded with the medium of the lowest concentration of TDZ (0.5 mg/l). Media of average concentrations (1.0 mg/l) and high (2.0 mg/l) of TDZ will lead to short- and very short shoots in comparison with medium-variant three.

3.2.3. Results regarding identification on molecular level of somaclonal variability induced by regeneration from callus maintained for long in culture

3.2.3.1. Results regarding amplification and electrophoresis of reaction products

In amplifying the samples. 22 primers displaying polymorphic bands in vine-cultivar DNA extraction harvested in field were used.

It was found that the neoplantules regenerated with the 15th subculture display

molecular-level variability. Such variability was noticed with a small number of cultivars, i.e., five, showing a small number of somaclones, too. The most somaclones were identified in *Merlot* (five).

The image markings were the following : Cabernet Sauvignon –CR (female plant), CR1, CR2, CR3; Fetească albă – F (female plant), F1; Merlot (female plant), Mr1, Mr2, Mr3, Mr4, Mr5; Traminer Rose – T (female plant) , T1, and Italian Riesling - R1 (female plant) Ri1, Ri2, Ri3.

Fragments resulting from amplification with polymorphic primers displayed lengths comprised between 200 and 2000-pb, most having it between 300 and 1400 pb.

The highest numbers of polymorphic bands were obtained with primer OPX03 (12 bands), primer OPE 14 (11 polymorphic bands), OPA 04 (10 polymorphic), PB 6 (10 polymorphic bands), PB 6 (10 polymorphic bands), PB 1 (9 polymorphic bends), primer PB 3 (7 polymorphic bands), primer PB 5 (8 polymorphic bands), primer 70.08 (6 polymorphic bands).

The figures obtained and analysed tells obviously that, with all somaclones checked, one can notice that there are noteworthy differences in the genetic structure revealed by the RAPD-markers. The dendrogram drawn on the basis of the genetic distances between cultivars and their somaclones illustrates even more clearly the extent to which, at molecular level, somaclones differ from the cultivar they originate in. The genetic closeness between vine cultivars and somaclones identified with these cultivars, established on the matrix of genetic distances, and of the Neighbor Joining Tree algorithm, are displayed in Figure 2, in the shape of a dendrogram.

Within the frames of the dendrogram one can notice that the *Vitis vinifera* cultivar as well as the somaclones obtained from this are closely grouped . Also, there is to be seen that Cabernet Sauvignon and Merlot, together with their somaclones are represented within the same group just like with the dendrogram obtained for the ten vine cultivars analyzed *ex vitro*. Another subgroup is made up of cultivars and somaclones of Fetească albă and Italian Riesling similar to the group represented in the dendrogram of the ten vine cultivars analyzed.

That the somaclones of each cultivar are represented within the same group is proof of the accuracy of the experimental results obtained.

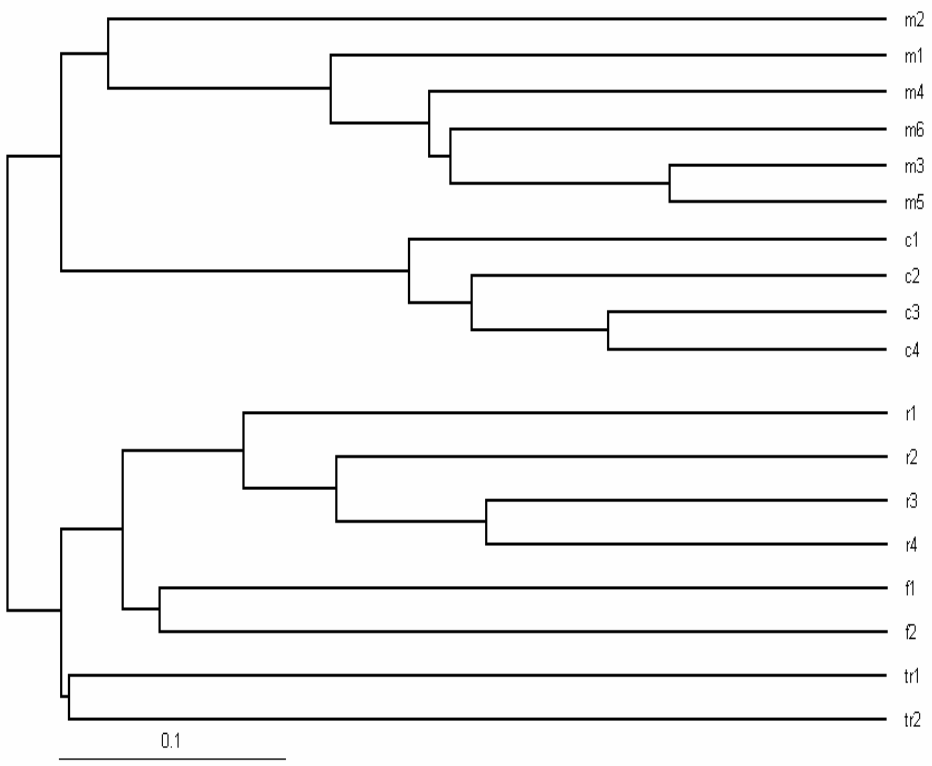


Fig. 2. Dendrogram of cultivars analyzed, with *Vitis vinifera* cultivars and somaclones.

4. CONCLUSIONS

4.1. CONCLUSIONS TO VARIABILITY ON MOLECULAR LEVEL OF THE BIOLOGICAL MATERIAL OBTAINED *IN VIVO*

Following the results of our research work at molecular level with the ten vine cultivars coming from five locations, some conclusions are possible to draw:

4.1.1. In the RAPD analyses one essential condition is that of obtaining a fair quantity of DNA of high purity. Of the three extraction protocols used the C one provided for the most satisfactory results. With this, DNA-purity displayed values between 1.7 and 2, purity allowing for later manipulations. The incorporation in the extraction buffer of phenoloxidase inhibitors , such as the diethyleneditiocarbamic acid (DIECA), and of the antioxidants ascorbic acid or polyvinyl pirolidone (PVP) , have prevented the browning of the extract.

4.1.2. There are differences among cultivars statistically granted regarding the DNA quantity obtained, no matter the extraction method applied , suggesting that the genotype in the vine, decisively influences the quantity of DNA that can be extracted by means of currently used methods for such purpose. The method of extraction also had a significant influence on obtainable DNA-quantity, regardless of the experimentation location.

4.1.3. Data resulting from the variance analysis for the three-way Anova type 10 x 3 x 5 experiment show that the three experimental factors have distinctly and significantly influenced the purity of DNA.

4.1.4. The selection of primers has proved to be rather difficult , as of the 39 primers used only 22 produced distinct polymorphic bands.

4.1.5. Addition of PVP - 2% concentration in the amplification buffer of samples had also proved beneficial. PVP reduced the inhibitory effect of polyphenols and facilitated the marking bands necessary in the statistical analysis.

4.1.6. The cultivars analyzed differentiate at molecular level and their systemic classification based on their morpho – physiological traits (precocity, grape colour, pubescence) respected, as well as the classification from ecologic-geographic point-of-view and, proles, respectively.

4.1.7. The largest genetic distances were recorded among varieties totally unrelated, whereas the small distances point to relations more or less close in the respective varieties and the RAPD-analysis agrees with data in the classical taxonomy.

4.1.8. The dendrogram obtained reveals the fact that Feteasca regala very close genetically to Feteasca alba, thus confirming the hypothesis that the two varieties have a common ancestry. Cabernet Sauvignon and Merlot very close genetically, also confirmed by other authors , too.

4.1.9. The analysis of the same variety but of differing provenance has revealed

that there are no differences between them, as they are homogenous, which suggests that the production of planting stock was correctly carried out.

4.1.10. RAPD analyses proved valuable instruments in establishing the intraspecific genetic polymorphism with *Vitis vinifera*.

4.2. CONCLUSIONS REFERRING TO THE BIOLOGICAL MATERIAL OBTAINED *IN VITRO*

4.2.1. The numbers of shoots obtained with axillary-shooting micropropagation in vine is decisively influenced by genotype and culture medium.

4.2.2. Cultivars of the highest reaction ability to the *in vitro* culture from nodal segments seem to be *Cabernet Sauvignon* and *Traminer Rose*, and the culture medium best adequate to such a purpose proved to be MS – 2.5 mg/1 BAP.

4.2.3. The cultivar, culture medium and provenance of the variety have influenced significantly the length of shoots obtained *in vitro* of vine nodal segments.

4.2.4. The highest degree of influence upon the aforementioned trait has the culture medium, by far the medium MS – 2.5 mg/1 BAP, leading to securing the best developed neoplantules obtained in *in vitro* cultivation of nodal segments, to significant differences as to all other variants.

4.2.5. Vine cultivar, culture medium applied and provenance of cultivar providing for the explant, as well as the interactions between these three factors have significantly influenced the numbers of nodes/explant obtained following micromultiplication *via* nodal segments.

4.2.6. With all cases analysed , both for factor influence and of interaction between these, the numbers of nodes/neoplantule have reproduced with fidelity the variation pattern recorded for the length of shoots (neoplantules).

4.2.7. From the data analysis regarding the influence of cultivar and culture

medium on the callus quantity in the experiments of inducing callus genesis, on can reach the conclusion that the weight of callus formed after the first passage on to callus-generating media, with the ten vines under study, decisively depends on medium culture and, to a lesser extent on the interaction between cultivar and culture medium.

4.2.8. The addition in the MS-culture medium of 1.5 mg TDZ/l does not lead to significant differences in the weight of callus formed, but it certainly leads to obvious quality differences in the callus.

4.2.9. With grape vines the moderate- and high concentrations of TDZ in the culture media, negatively influence the numbers of regenerated plantules from the organogenic callus. As to the contrary, however, a stimulating effect on the numbers of regenerants and their length has the medium with low addition of TDZ (0.5 mg/l).

4.2.10. Vine variety did not have practically significant influence on regenerant numbers obtained and on their length; thus, allowing us the assertion that the behavioural pattern of the regenerative callus on culture medium with TDZ supplement is generally true with all the vines tested.

4.2.11. Band analysis formed through migration on gel of DNA amplified with RAPD primers shows obviously that, with all somaclones checked, there are noteworthy differences of genetic structure, as to the cultivars they come from.

4.2.12. Within the frames of the dendrogram there shows up that the cultivars and somclones obtained from that variety are closely grouped. Also, one can discern that *Cabernet Sauvignon* and *Merlot,* together with their somaclones are represented in the same subgroup, similarly to the dendrogram obtained for the ten vine cultivars analysed *ex vitro*. Cultivars and somaclones of Feteasca alba and Italian Riesling make up one subgroup similar to that featured in the dendrogram of the ten vines analysed.

4.2.13. It is possible to assert that, based on the results introduced, the RAPD-analyses represent one sensible instrument of identification at molecular level of the somaclonal variability, coming up in the grape vine, within the conditions of maintaining of callus and subcultures *in vitro* for long time.