UTILIZAREA MARKERILOR MOLECULARI PENTRU IDENTIFICAREA UNOR SURSE DE GERMOPLASMĂ DE RAPIȚĂ (*BRASSICA NAPUS* L.) CU REZISTENȚĂ GENETICĂ LA *VERTICILLIUM* SP.

Titlul proiectului
Studii de genetică moleculară privind adaptarea rapiței de toamnă (*Brassica napus L.*) la condiții de stres biotic şi abiotic, precum şi optimizarea tehnologiei de cultură, în vederea extinderii arealului de cultivare.
- proiect cofinanțat prin Fondul European de Dezvoltare Regională –

Editorul materialului
UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI
Data publicării materialului: - 2014

"Conținutul acestui material nu reprezintă în mod obligatoriu poziția oficială a Uniunii Europene sau a Guvernului României"

Burlacu (Arsene) Mădălina-Cristina

UTILIZAREA MARKERILOR MOLECULARI PENTRU IDENTIFICAREA UNOR SURSE DE GERMOPLASMĂ DE RAPIȚĂ (*BRASSICA NAPUS* L.) CU REZISTENȚĂ GENETICĂ LA *VERTICILLIUM* SP.

Programul Operațional Sectorial "Creşterea Competitivității Economice"
- cofinanțat prin Fondul European de Dezvoltare Regională-

"Investiții pentru viitorul dumneavoastră"

EDITURA „ION IONESCU DE LA BRAD" IASI

Burlacu (Arsene) Mădălina-Cristina

UTILIZAREA MARKERILOR MOLECULARI PENTRU IDENTIFICAREA UNOR SURSE DE GERMOPLASMĂ DE RAPIȚĂ *(BRASICA NAPUS L.)* CU REZISTENȚĂ GENETICĂ LA *VERTILICILLIUM SP.*

EDITURA „ION IONESCU DE LA BRAD”

IAŞI

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
BURLACU, MĂDĂLINA-CRISTINA
Utilizarea markerilor moleculari pentru identificarea unor surse de germoplasmă de rapiță (*Brassica napus* L.) cu rezistență genetică la *Verticillium sp.* / Burlacu (Arsene) Mădălina-Cristina. – Iaşi : Editura Ion Ionescu de la Brad, 2014
ISBN 978-973-147-140-2

632.1:633.854.9

UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI

Instrumente Structurale 2007 - 2013

CUPRINS

INTRODUCERE **3**
LISTA DE ABREVIERI **4**
CAPITOLUL I CONSIDERAŢII GENERALE PRIVIND IMPORTANŢA ŞI CULTIVAREA RAPIŢEI DE TOAMNĂ **5**
1.1. Clasificarea sistematică, originea şi importanţa rapiţei pentru ulei **5**
1.1.1. Originea şi istoria **5**
1.1.2. Morfologia **6**
1.1.3. Importanţa economică a rapiţei **7**
1.1.4. Principalele utilizări ale rapiţei pentru ulei **7**
1.2. Tehnologia de cultură **8**
1.2.1. Rotaţia **8**
1.2.2. Fertilizarea **8**
1.2.3. Lucrările solului **9**
1.2.4. Sămânţa şi semănatul **9**
1.2.5. Lucrări de îngrijire **9**
1.2.6. Recoltarea **10**
CAPITOLUL II DESCRIEREA AGENTULUI PATOGEN *VERTICILLIUM LONGISPORUM* **11**
2.1. Studii privind taxonomia agentului patogen *Verticillium longisporum* **11**
2.2. Descrierea morfologică a ciupercii *Verticillium longisporum* **12**
2.3. Studii privind ciclul de viaţă al ciupercii **13**
2.4. Simptome şi plante gazdă **14**
2.5. Pagube produse de boală în cultura de rapiţă **15**
2.6. Transmiterea bolii **15**
CAPITOLUL III UTILIZAREA METODELOR MODERNE ÎN AMELIORAREA RAPIŢEI **17**
3.1. Ameliorarea rapiţei pentru ulei **17**
3.1.1 Metode de amprentare genetică **18**
3.1.2 Aplicarea markerilor moleculari în ameliorarea rapiţei **21**
3.1.3 Studii privind rezistenţa rapiţei la *Verticillium longisporum* **22**
CAPITOLUL IV CADRUL NATURAL ŞI INSTITUŢIONAL ÎN CARE S-AU DESFĂŞURAT CERCETĂRILE **24**
4.1. Prezentarea Staţiunii de Cercetare – Dezvoltare Agricolă Secuieni **24**
4.1.1. Aşezarea geografică şi caractere generale ale zonei Secuieni **24**
4.1.2. Condiţiile mediului natural **24**
4.1.3. Caracterizare climatică **25**
4.2. Descrierea laboratorului LECOM **25**
CAPITOLUL V OBIECTIVELE URMĂRITE, MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE **28**
5.1. Scopul şi obiectivele cercetărilor **28**
5.2. Materialul biologic folosit **29**
5.3. Metode de cercetare în câmp **33**
5.4. Metode de cercetare în laborator **34**
5.4.1 Izolarea ADN-ului genomial **34**
5.4.2 Determinarea cantităţii şi purităţii ADN –ului izolat **35**
5.4.3 Analiza RAPD **37**
5.4.4 Analiza SSR **41**
5.5. Metoda de lucru utilizată pentru realizarea infecţiei artificiale a rapiţei cu *Verticillium longisporum* **45**
5.5.1 Pregătirea materialului vegetal **45**
5.5.2 Pregătirea inoculului pentru infecţie **46**
5.5.3 Realizarea infecţiei artificiale cu *Verticillium longisporum* **47**
CAPITOLUL VI REZULTATE ŞI DISCUŢII **51**
6.1 Rezultate privind caracterele morfologice studiate la cele 130 de cultivare de

rapiță..... **51**
6.2. Determinarea diversității genetice a cultivarelor de rapiță luate în studiu..... **59**
6.2.1. Determinarea diversității genetice prin tehnica RAPD..... **59**
6.2.2 Determinarea diversității genetice prin tehnica SSR..... **63**
6.2.3 Dendrograma obținută în urma combinării datelor RAPD şi SSR..... **65**
6.3. Rezultate obținute în urma testării cultivarelor de rapiță la infecția cu agentul patogen *V. longisporum*..... **69**
6.3.1 Rezultate privind infecția cultivarelor de rapiță 1-39 ..... **70**
6.3.2. Rezultate privind infecția cultivarelor de rapiță 41-86..... **73**
6.3.3. Rezultate privind infecția cultivarelor de rapiță 87-130..... **75**
6.4 Rezultate privind identificarea markerilor SSR asociați cu rezistența cultivarelor de rapiță la *V.longisporum*..... **79**
6.5 Întocmirea hărții genetice şi identificarea unui QTL pentru rezistența la *Verticillium longisporum*..... **81**
CAPITOLUL VII CONCLUZII..... **84**
BIBLIOGRAFIE..... **86**

INTRODUCERE

Rapiţa (*Brassica napus* L.) este o specie relativ nouă care a apărut în urmă cu câteva sute de ani în urma unei hibridări interspecifice spontane între varză (*Brassica oleracea* L.) şi nap (*Brassica rapa* L.) (Rygulla şi colab., 2007).

Datorită conţinutului ridicat în ulei, rapiţa a devenit una dintre cele mai importante plante oleaginoase, fiind o sursă importantă de ulei şi proteine vegetale utilizate în alimentaţia umană, furajarea animalelor sau la obţinerea de biocombustibil.

Suprafe ele cultivate cu rapi ă au crescut în ultimii 30 de ani şi se preconizează extinderea acestora în următoarea perioadă, ceea ce aduce în atenţia cercetătorilor problematica studierii bolilor care afectează această cultură.

Una dintre bolile ce se află în ascensiune în cultura de rapiţă este şi veştejirea plantelor produsă de agentul patogen *Verticillium longisporum*. Această boală este frecventă în nordul Germaniei şi Suediei, dar a fost întâlnită şi în Franţa, Polonia, Ucraina şi Rusia. Agentul patogen invadează sistemul vascular al plantei, obstrucţionând fluxul sevei şi în consecinţă induce o stare de stres afectând productivitatea şi chiar viabiliatatea plantei.

Având în vedere faptul că, până în prezent nu există tratamente chimice care să combată eficient atacul acestui agent patogen, controlul fitosanitar al acestei boli poate fi realizat prin cultivarea unor soiuri şi hibrizi rezistenţi.

Până în prezent însă, nu au fost identificate cultivare de rapiţă rezistente la această boală, de aceea am considerat oportună analiza detaliată a sursei de germoplasmă existente, în ceea ce priveşte rezistenţa acesteia la *V. longisporum*.

Lucrarea prezintă rezultatele obţinute în urma evaluării genetice a unor cultivare de rapiţă provenite de la banca de gene CGN (Centrer for Genetic Resources) din Olanda, în ceea ce priveşte rezistenţa acestora la atacul agentului patogen *V. longisporum.*

LISTĂ DE ABREVIERI

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism;
ADN – acid dezoxiribo nucleic;
AUDPC - area under disease progress curve;
CGN - Centrul de Resurse Genetice;
cM – Centimorgani;
CS – coeficient de similaritate genetică;
GS – similaritate genetică;
LG – grup linkage;
LOD - Logarithm of Odds;
PCR - polimerase chane reaction;
QTL - Quantitative Trait Loci;
RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA;
RFLP - Restiction Fragment Length Polimorfism;
SSR - Simple Sequence Repeat;
UPGMA - unweighted pair-group method arithmetic average;
MH- masa hectolitrică;
MMB- masa a o mie de boabe;
PDB – potato dextrose broth.

CAPITOLUL I
CONSIDERAŢII GENERALE PRIVIND IMPORTANŢA ŞI CULTIVAREA RAPIŢEI DE TOAMNĂ

1.1. Clasificarea sistematică, originea şi importanţa rapiţei pentru ulei

Rapiţa aparţine familiei *Cruciferae*, genul *Brassica*, ce cuprinde 34 de specii din care numai cinci sunt cultivate (Mogârzan, 2012). Pentru producerea uleiului se cultivă specia *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg (rapiţa mare, colza sau rapiţa de toamnă) şi *Brassica campestris* L. ssp. *oleifera* D. C. (rapiţa mică sau navetă).

1.1.1 Originea şi istoria

În anul 1935, botanistul corean U, a studiat evoluţia şi relaţiile speciilor din genul *Brassica*, prin efectuarea unor hibridări artificiale între speciile diploide şi triploide de *Brassica*, examinând apoi modul de transmitere a cromozomilor în hibrizii rezultaţi. În urma cercetărilor efectuate, U a elaborat o teorie privind relaţiile speciilor din genul *Brassica*, pe care a denumit-o „triunghiul U" (figura 1.1).

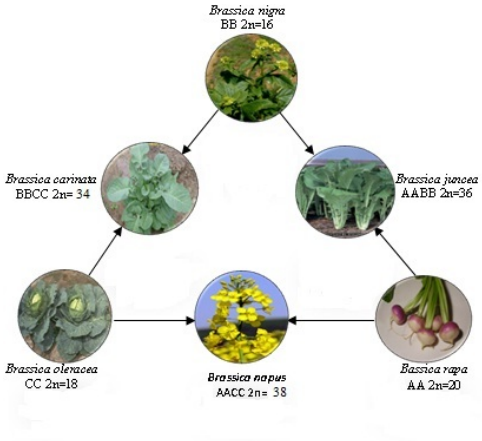


Figura 1.1 Triunghiul *Brassica*, prelucrare după U (1935)

Conform acestui triunghi, se pare că majoritatea speciilor din genul *Brassica* provin din trei genomuri ancestrale care sunt reprezentate simbolic de literele AA, BB şi CC. Aceste trei specii şi anume *B. nigra* (2n=16), *B. oleracea* (2n=18) şi *B. rapa* (2n=20) sunt localizate în cele trei colţuri ale triunghiului, au cel mai mic număr de comozomi şi sunt diploide.

Astfel, prin încrucişarea spontană între aceste specii s-au format speciile alotetraploide *B. carinata* (2n=34), *B. juncea* (2n=36) şi *B. napus* (2n=38), fiecare având câte patru seturi de cromozomi.

Rapiţa colza (*Brassica napus* 2n=19*)* a apărut în urma unei încrucişări spontane interspecifice între *Brassica rapa* L, syn. *campestris* (genom AA, 2n=20) şi *Brassica*

oleracea L. (genom CC, 2n=18). În urma acestei încrucişări a rezultat o specie aloploidă având în zestrea ereditară atât genomul A de la *Brassica rapa* cât şi genomul C de la *Brassica oleracea* (Koike, 2007).

Legumele din familia crucifere şi plantele pentru ulei se cultivă din cele mai îndepărtate timpuri. Acestea au jucat un rol important fiind folosite în alimentaţia oamenilor, nutriţia animalelor, ca îngrăşământ verde şi condimente. Există date care arată că plantele crucifere au început să fie cultivate cu aproape 10 000 de ani în urmă. În India s-au descoperit dovezi care sugerează că plantele crucifere (probabil ridichea) s-au utilizat cu 4000 de ani î. Hr, iar în China şi Japonia, în urmă cu 2000 de ani (Gupta, 2007).

Seminţe aparţinând speciei *Brassica juncea* au fost găsite în siturile arheologice din India şi se presupune că ar data din anul 2300 î. Hr (Prakash, 1980; Weiss, 1983). De asemenea, în însemnările greceşti, romane şi chinezeşti, datate din anii 500-200 î. Hr., sunt descrise valorile medicinale ale unor plante de *Brassica rapa* (Robbelen şi Downey, 1989).

În Europa, cruciferele au început să fie cultivate încă din timpul romanilor, iar uleiul produs din acestea, a început să fie utilizat în jurul secolului 13 (Snowdon şi colab., capitol în Kole, 2007).

Rapiţa a început să fie cultivată în jurul anului 1600, când uleiul era utilizat la iluminat şi ca materie primă în fabricarea săpunului (Toxopeus, 1979). Până în secolul XVI, rapiţa a devenit cea mai importantă sursă de ulei de lampă din Europa, iar în secolul XVII existau suprafeţe mari cultivate cu această plantă (Kroll, 1994; Kimber şi McGregor, 1995). În zilele noastre, rapiţa pentru ulei este una din cele mai cultivate plante în Europa, dar şi în alte regiuni ca America de Nord, China şi Canada.

1.1.2. Morfologia

Rapiţa pentru ulei este cultivată în Europa şi Asia ca rapiţă de toamnă, iar în Canada şi Australia se cultivă forma de primăvară. Diferenţierea între rapiţa de toamnă şi cea de primăvară, este determinată de un mecanism genetic care controlează cerinţele de vernalizare ce determină înflorirea (Snowdon şi colab., capitol în Kole, 2007).

Rapiţa pentru ulei, atât varietatea de toamnă cât şi cea de primăvară, este o plantă anuală sau bienală.

Rădăcina este pivotantă, slab ramificată şi pătrunde în sol până la o adâncime de 70-100 cm (Zaharia, 2011). Masa principală de rădăcini este răspândită la adâncimi de până 25-40 cm (Axinte şi colab., 2006; Mogârzan, 2012).

Tulpina plantei este erectă, ramificată, rezistentă la cădere, iar înălţimea ajunge până la 1,2 - 2 metri. Gradul de ramificare a tulpinii este determinat, în general, de densitatea culturii (Axinte şi colab., 2006; Zaharia, 2011; Mogârzan şi colab, 2011).

Frunzele sunt aşezate altern, cele de la bază sunt peţiolate, lirate, penat-sectate. Cele mijlocii sunt lanceolate şi sesile, iar cele de la vârf sunt semiamplexicaule, lanceolate, cordate. (Mogârzan şi colab., 2011; Mogârzan, 2012).

Inflorescenţa este reprezentată de un racem. Florile sunt pe tipul patru, fiind alcătuite din patru petale rotunjite, alternate cu patru sepale. Floarea cuprinde şase stamine, patru mediane cu filamentul mic şi două laterale cu filamentul mare (Mogârzan şi colab., 2011).

Pistilul este format din două carpele unite iar ovarul inferior posedă două loje false datorită unui perete fals, despărţitor. În fiecare lojă sunt între 10 şi 40 de ovule. Polenizarea florilor este alogamă şi entomofilă (Mogârzan şi colab., 2011; Zaharia, 2011).

Fructul este o silicvă cu lungime medie de 5-10 cm, având în interior un perete despărţitor longitudinal. O silicvă poate avea în medie între 10 şi 30 de seminţe. Pe o plantă se pot forma până la 800 de silicve (Axinte şi colab., 2006).

Seminţele au formă sferică, cu suprafaţa neregulat-reticulată, iar culoarea poate varia de la cafeniu închis, cenuşiu închis până la negru. MMB este între 3,5 şi 6,6 grame, iar MH ajunge până la 61-68 kg. Germinaţia seminţelor este epigee (Bîlteanu, 2001; Mogârzan, 2012).

În funcţie de varietate, perioada de vegetaţie a rapiţei variază între 270-300 de zile la soiurile de toamnă şi 110-130 la soiurile de primăvară (Bîlteanu, 2001; Axinte şi colab., 2006).

1.1.3 Importanţa economică a rapiţei

Datorită progresului realizat în ameliorarea rapiţei pentru ulei, aceasta a devenit în ultimii 30 de ani o plantă agricolă importantă şi, în prezent, este cea de-a treia sursă de ulei, după soia şi palmier (Snowdon şi colab., în Kole, 2007).

Suprafaţa mondială cultivată cu rapiţă a crescut din ce în ce mai mult, în ultimii ani ajungând la peste 31 milioane ha în 2010, cu o producţie medie de 59 milioane de tone/ha (FAOSTAT, 2010). Cele mai mari suprafeţe cultivate cu rapiţă se întâlnesc în China (7,3 milioane ha), Canada (6,5 milioane ha), India (5,3 milioane ha), Australia (1,7 milioane ha), Franţa (1,4 milioane ha), Germania (1,4 milioane ha), etc. (http://faostat.fao.org/site/).

În Europa, suprafeţele cultivate cu rapiţă au crescut, în ultimii zece ani, de la 4,6 milioane ha în anul 2000, la peste 8,7 milioane ha în anul 2010 (FAOSTAT, 2010).

În Romania, suprafeţele cultivate cu rapiţă au crescut de la 364 mii ha în 2007, la 537 mii de ha în 2010 (tabelul 1.1), înregistrând o scădere în anul 2011 (http://www.madr.ro)

Tabelul 1.1

Evoluţia suprafeţelor şi a producţiei derapiţă în România

Specificare	UM	2007	2008	2009	2010	2011*
Suprafaţa	mii ha	364,9	365,0	419,9	537,3	382,5
Producţie medie	Kg/ha	991	1844	1357	1755	1951
Producţie totală	mii to	361,5	673,0	569,6	943,0	746,6

Sursa: 2007 - 2010 - Date INS - Anuarul Statistic al României 2011
** Date MADR, AGR 2B*

1.1.4 Principalele utilizări ale rapiţei

Seminţele plantelor oleaginoase conţin, în general, acizi graşi de tipul trigliceridelor, care sunt o sursă importantă de grăsimi pentru alimentaţia omului. Din toată producţia mondială de ulei, aproximativ 80% este utilizată în alimentaţia oamenilor, 6% în nutriţia animalelor şi aproximativ 14 % reprezintă baza pentru industrie. (Luhs şi Friedt, 1994b; Friedt şi colab., 2004).

Rapiţa (*Brassica napus*) a devenit una din cele mai cultivate plante uleioase, datorită utilizării uleiului în diferite sectoare cum ar fi alimentaţia oamenilor, ca sursă alternativă de biocombustibil sau ca materie primă în industria chimică. De asemenea, şroturile rezultate în urma extagerii uleiului sunt utilizate în nutriţia animalelor fiind considerate surse importante de proteine.

La început, uleiul de rapiţă, datorită gustului neplăcut conferit de conţinutul ridicat în acid erucic şi glucozinolaţi, nu era utilizat în alimentaţie. Odată cu crearea soiurilor libere de acid erucic şi glucozinolaţi şi a conţinutului ridicat în grăsimi (circa 33-49%), rapiţa a devenit una dintre principalele specii oleaginoase, furnizoare de materie primă pentru industria alimentară, după soia (Snowdown R., capitol în Kole, 2007).

Conţinutul ridicat al uleiului de rapiţă în acizi graşi nesaturaţi (58-60%), în special acid oleic acid, linoleic şi linolenic face ca acesta să fie comparabil din punct de vedere al calităţilor benefice, cu uleiul de măsline şi de floarea soarelui (Kimber, 1995).

Pe lângă compoziţia avantajoasă în acizi graşi, uleiul de rapiţă mai conţine şi o cantitate importantă de vitamina E, ceea ce îi conferă o calitate superioară pentru consumul uman.

O dată cu utilizarea directă a uleiului de rapiţă pentru consum, acesta mai este folosit şi în industria alimentară ca materie primă pentru producerea margarinei, maionezei, mâncărurilor pentru sugari, sosurilor, etc.

În urma extragerii uleiului din seminţele de rapiţă rezultă şroturile şi turtele care datorită conţinutului bogat de proteine, glucide şi săruri se folosesc în furajarea animalelor, având o valoare biologică ridicată.

În ţările din vestul Europei, uleiul de rapiţă se foloseşte şi la producerea biodieselului, un biocarburant întrebuinţat la alimentarea motoarelor Diesel. Biodieselul este fabricat prin procesarea uleiului de rapiţă şi adăugarea metanolului (Luhs şi Friedt, 1998; Piazza şi Foglia, 2001).

1.2. Tehnologia de cultură a rapiţei

1.2.1. Rotaţia

Pentru cultivarea rapiţei, este necesară asigurarea unor condiţii bune de pregătire a terenului şi acumularea apei necesară răsăririi plantelor, de aceea, ca plante premergătoare bune sunt culturile care eliberează terenul până la începutul lunii iulie (Axinte şi colab., 2006; Zaharia, 2011; Mogârzan, 2012).

Cele mai bune premergătoare sunt: cerealele de toamnă, cartoful timpuriu, mazărea, borceagul de toamnă şi trifoiul roşu după prima coasă. Din cauza putegaiului alb (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary) nu se recomandă cultivarea rapiţei după soia şi floarea – soarelui. În cadrul unui asolament, rapiţa poate reveni pe acelaşi teren după 3 ani, iar în cazul în care a fost atac de *Sclerotinia sclerotiorum* nu este recomandată cultivarea acesteia timp de 7-8 ani (Axinte şi colab., 2006).

1.2.2. Fertilizarea

Rapiţa este o plantă mare consumatoare de elemente nutritive de aceea este foarte pretenţioasă la fertilizare. Pentru a produce o tonă de seminţe şi biomasa aferentă, rapiţa are un consum specific de 50 - 60 kg azot, 30 - 60 kg fosfor, 40 - 50 kg potasiu, 50 - 60 kg calciu, 20-30 kg sulf precum şi importante cantităţi de microelemente (Bîlteanu, 2001; Mogârzan, 2012).

1.2.3. Lucrările solului

Pentru cultivarea rapiţei este necesar ca arătura să fie efectuată imediat după eliberarea terenului de cultura premergătoare. Adâncimea la care se execută arătura este 20-25 cm cu plugul în agregat cu grapa stelată. În cazul în care solul este foarte uscat şi arătura nu poate fi efectuată fără a scoate bolovani, se recomandă prelucrarea solului cu grapa cu discuri în agregat cu grapa cu colţi reglabili, iar arătura să fie efectuată după prima ploaie. După realizarea arăturii, terenul se menţine curat de buruieni, afânat prin lucrări cu grapa cu discuri în agregat cu grapa cu colţi (Axinte şi colab., 2006).

Înainte de semănat se execută o lucrare cu combinatorul care are rol de pregătire a patului germinativ. În cazul unui teren prea afânat, se execută o lucrare cu tăvălugul pentru se asigura încorporarea seminţei la adâncimea optimă de semănat.

1.2.4. Sămânţa şi semănatul

Sămânţa reprezintă un factor biologic foarte important în eficienţa cultivării rapiţei. Astfel, sâmânţa trebuie să provină din anul însămânţării, să aibă o puritate minimă de 97% şi o germinaţie minimă de 85%. Pentru a reduce atacul agenţilor patogeni şi a dăunătorilor este recomandat ca, înainte de semănat, să se efectueze tratamente la sămânţă, cu produse cum ar fi: Modesto 480 FS (1,25 l/100 kg semin e), Cruiser OSR 322 FS (15 l/t seminţe), Seedoprid 600 FS (6 l/t seminţe) şi altele (http://www.agrimarvas.ro).

Perioada în care se poate realiza semănatul în ţara noastră este diferită în funcţie de zone. Astfel în sudul tării semănatul se poate realiza între 5 şi 15 septembrie, iar în estul, vestul şi nordul ţării între 1 şi 10 septembrie. Rapiţa de primăvară se seamănă timpuriu, în prima urgenţă (Axinte şi colab., 2006; Mogârzan, 2012).

Desimea plantelor la recoltare, diferă în funcţie de soi şi hibrid, dar în general este 70-80 plante/m^2. În România, la semănat, se asigură 100 - 150 seminţe germinabile/m^2 pentru a avea la recoltare 80 - 110 plante/m^2. Pentru a asigura această desime este necesară o cantitate de sămânţă de 6-10 kg/ha, în funcţie de umiditatea solului, textura şi calitatea pregătirii patului germinativ (Axinte şi colab., 2006).

Semănatul se realizează cu semănătorile pentru cereale, la distanţa între rânduri de 12,5 cm. La această distanţă culturile luptă mai bine cu buruienile, nu necesită praşile, sunt mai rezistente la cădere şi se pot recolta mecanizat în condiţii bune.

Adâncimea de semănat este de 2,5 - 3,5 cm, în funcţie de umiditatea solului şi textură.

1.2.5. Lucrări de îngrijire

Combaterea buruienilor

Combaterea buruienilor din cultura de rapiţă se poate realiza chimic prin utilizarea erbicidelor. Pentru speciile de buruieni anuale, dar şi pentru combaterea samulastrei de grâu şi orz, inclusiv *Sorgum halepense* se utilizează erbicidele Teridox 500 EC (5l/ha), Treflan sau Balan (Bîlteanu, 2001; Mogârzan, 2012). Speciile monocotiledonate de buruieni anuale şi perene se pot combate prin aplicarea în timpul vegetaţiei (postemergent) a unor erbicide ca: Fusilade forte (1-1,3 l/ha), Pantera, Leopard (1,5 l/ha), Select super, Aramo (1,5 l/ha), Agil (1,0 l/ha), Galant super (1,0 l/ha).

Combaterea bolilor

Combaterea bolilor din cultura de rapiţă se poate face eficient prin combinarea metodelor preventive cu cele curative. Bolile ce pot fi întâlnite în cultura de rapiţă sunt: rugina albă a cruciferelor - *Albugo candida*, putrezirea rădăcinilor - *Olpidium*

brassicae, căderea plantulelor - *Pythium de Baryanum*, mana cruciferelor - *Peronospora brassicae*, hernia rădăcinilor - *Plasmodiophora brassicae*, făinarea cruciferelor - *Erysiphe communis*, putregaiul alb - *Sclerotinia sclerotiorum* L.de Bary, pătarea neagră a cruciferelor - *Alternaria brassicae*, putregaiul uscat - *Phoma lingam* şi verticilioza – *Verticillium longisporum* .

Mijloacele agrotehnice au un mare rol în prevenirea instalării bolii deoarece prin arăturile adânci, igienă culturală, distrugerea buruienilor şi rotaţia de 3-4 ani, se crează condiţii favorabile pentru plante şi nefavorabile pentru instalarea agentului patogen.

În toate culturile semincere se recomandă la apariţia atacului un tratament cu Dithane M-45-80 WP - 0,2 %, Ridomil Cu-18-WP -0,3 % sau Ridomil MZ 72 WP-0,25 %. Pentru prevenirea atacului de *Sclerotinia* se recomandă-Orius 25 EW-1 l/ha (Ulea, 2001).

Combaterea dăunătorilor

Puricii de pământ (*Phyllotreta sp*.) se combat prin tratarea seminţelor cu Chinook 200 FS 20 l/t. Păduchii cenuşii (*Brevicoryne brassicae*) se combat cu Sinoratox 35 CE sau Carbetox 37, în doză de 1,5 l/ha. Gărgăriţa tulpinilor (*Ceutorhynchus sp*.) se combate prin 3 tratamente cu Sinoratox 35 CE, 3 l/ha. Intervalul de pauză este de 14 - 21 zile.

Gândacul lucios al rapiţei (*Meligethes aeneus*) se combate cu Fastac 10 CE (0,075 l/ha) prin două tratamente, cu interval de pauză de 7 - 10 zile, sau cu Sumicidin 20 CE (0,025%) în perioada înfloritului (Axinte şi colab., 2006).

Irigarea este necesară în sudul ţării. Se aplică o udare în toamnă cu 300 - 400 m3 apă/ha, pentru stimularea răsăririi plantelor şi a formării rozetei de bază până la întrarea în iarnă. Primăvara sunt necesare udări la începutul formării primelor silicve cu 400 - 500 m^3/ha şi la încheierea înfloritului cu 500 -600 m /ha. Udările târzii favorizează căderea plantelor şi atacul de afide.

1.2.6. Recoltarea

Recoltarea este dificilă din cauza scuturării uşoare a seminţelor. Se execută mecanizat direct cu combina de cereale. Recoltarea se efectuează în general la 5 - 7 zile după aplicarea desicantului Reglone, în doză de 2-3 l/ha, când silicvele au devenit galbene-liliachii şi a început colorarea seminţelor. In momentul declanşării recoltatului, umiditatea seminţelor trebuie să fie în jur de 16%. Lucrarea se execută seara, dimineaţa şi în cursul nopţii (Axinte şi colab., 2006).

CAPITOLUL II
DESCRIEREA AGENTULUI PATOGEN *VERTICILLIUM LONGISPORUM*

2.1. Studii privind taxonomia agentului patogen *Verticillium longisporum*

Verticillium sp. sunt agenţi patogeni care se găsesc în sol şi sunt responsabili de veştejirile plantelor din regiunile temperate şi sub-tropicale (Pegg şi Brady, 2002). Aceşti agenţi patogeni au ca plante gazdă un număr mare de specii, acesta ajungând până la 250.

Au fost realizate numeroase studii referitoare la taxonomia ciupercii, ce au condus la acceptarea a şase specii de *Verticillium*: *V. albo-atrum, V. dahliae, V. theobromae, V. nigrescens, V. nublilum, V. tricorpus*. Dintre acestea, unii autori au afirmat că cele mai importante, din punct de vedere economic, ar fi *V. dahliae* şi *V. albo-artrum* (Barbara şi Clewer, 2003).

Astfel, *V. dahliae* infectează specii ca: tomate, ardei, pepene verde, mentă, salată, cartof, bumbac şi căpşuni (Gordon şi colab., 2006), iar *V. albo-atrum* cauzează ofilirea plantelor la lucernă, tomate şi cartof (Heale, 2000).

Celelalte patru specii de *Verticillium* (*V. tricorpus, V. nigrescens, V. nubilum şi V. theobromae)* sunt considerate de către Isaac (1957), ca fiind mai puţin patogene, deoarece ele sunt întâlnite în sol ducând un mod de viaţă saprofit. În prezent s-a propus introducerea unei noi specii de *Verticillium* denumită *Verticillium longisporum*, care să cuprindă toate tulpinile cu spori lungi şi care au ca plante gazdă, plante din familia crucifere (Karapapa şi colab., 1997; 2000).

Identificarea speciilor de *Verticillium* ca agenţi patogeni ai speciilor din familia cruciferelor a fost raportată încă din anul 1957. Primele izolate de ciuperci ale genului *Verticillium* au fost realizate în anul 1950 de la varza de Bruxelles (Isaac, 1957) şi în anul 1960 de la hrean (Stark, 1961).

Starck, în anul 1961 a fost primul care a reuşit să izoleze o specie de *Verticillium* cu spori lungi, pe care a denumit-o *V. dahliae* var. *longisporum*. În 1997, Karappa şi colaboratorii au propus introducerea unei noi specii şi anume *V. longisporum* deoarece, prin analiza mai multor tipuri de izolate de ciuperci din acest gen au fost în măsură să facă o distincţie clară a speciilor de *Verticillium* care atacă plantele crucifere.

Astfel, în urma cercetărilor efectuate, au demonstrat că între tipurile de ciuperci studiate există diferenţe morfologice, enzimatice şi moleculare. În plus, tot în acelaşi studiu, după compararea ADN extras de la fiecare specie de ciupercă, au emis ipoteza că, *V. longisporum* ar fi putut apărea în urma hibridării parasexuale între *V. dahliae* şi *V. albo-atrum,* astfel aşa se explică stadiul său aproape diploid.

Studiul ciupercii *V. longisporum* ca specie separată a fost făcut de către Collins şi colaboratorii în anul 2003. Aceşti autori, au afirmat că în cercetările făcute de către Karapapa şi colaboratorii (1997), aceştia nu s-au referit la toate speciile de ciuperci cu spori lungi, iar noul taxon *V. longisporum* nu se potriveşte cu locul taxonomic al izolatelor de pe crucifere, care au spori scurţi.

2.2. Descrierea morfologică a agentului patogen

Ciuperca filamentoasă *V. longisporum* aparţine familiei *Mucedinaceae*, ordinul *Moniliales*, clasa *Hyphomycetes*, subîncrengătura *Deuteromycotina*, încrengătura *Eumycota*.

Ciupercile imperfecte apar înând subîncrengăturii *Deuteromycotina* constituie un grup heterogen de specii, la care nu se cunoaşte sau lipseşte forma de înmulţire sexuată.

Hifele vegetative ale *V. longisporum* sunt hialine, simple, grupate, septate sau multinucleate (McGarvie şi Isaac, 1996).

Datorită faptului că pe miceliu conidioforii prezintă ramifica ii dispuse sub formă de verticiliu acest gen a primit numele de *Verticillium*. La specia *V. longisporum* conidioforii formează de obicei trei, patru fialide pe nod (figura 2.1).

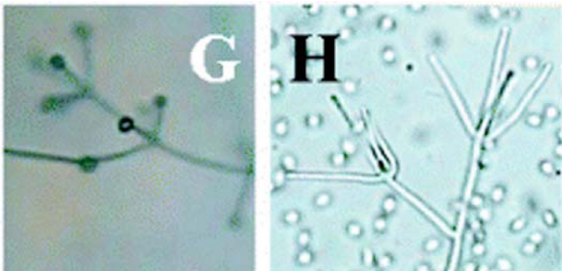


Figura 2.1. Tipurile de conidiofori la *V. longisporum* (după Fradin şi Thomma, 2006)

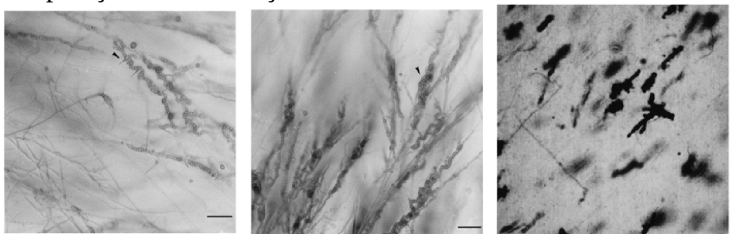
Conidiile se formează separat la vârful fialidelor şi sunt uninucleate, hialine, ovoide (Buckley şi colab., 1969). Formele de rezistenţă ale ciupercii sunt microscleroţii care au culoare neagră şi pereţii îngroşaţi (Garber şi colab., 1966).

Ciclul de formare a microscleroţilor are trei stadii (figura 2.2):

· *Stadiul de iniţiere*: hifele încep să se mărească şi apar septate;

· *Stadiul de formare*: hifele mărite, prezintă o ramificaţie bidimensională şi formează o structură neregulată, alungită, iar celulele care le alcătuiesc au o formă aproape sferică;

· *Stadiul de maturare*: structura devine închisă la culoare datorită depozitării unui pigment în pereţii microscleroţilor individuali.



a b c

Figura 2.2 Cele trei stadii de formare a microscleroţilor: a –Stadiul de iniţiere; b-Stadiul de formare; c-Stadiul de maturare (după Karapapa şi colab., 1997).

2.3. Studii privind ciclul de viaţă al ciupercii

Ciclul de viaţă (figura. 2.3) al agentului patogen *Verticillium spp*. poate fi împărţit în trei faze distincte denumite faza de repaus, faza parazită şi faza saprofită.

Faza de repaus, se desfăşoară atunci când condiţiile de mediu nu sunt prielnice pentru dezvoltarea ciupercii, iar microscleroţii sunt prezenţi în sol în stare latentă (Schnathorst, 1981; Heale şi Karapapa, 1999).

Debutul celei de-a doua faze din ciclul de viaţă al ciupercii este determinată de apariţia rădăcinilor plantelor în sol. Se presupune că germinarea microscleroţilor ar fi determinată de eliminarea unor cantităţi mari de carbon şi azot de către rădăcinile plantelor (Huisman, 1982; Mol şi colab., 1995; Mol şi Scholty, 1995). Astfel, prin germinarea microscleroţilor se formează miceliul, care se răspândeşte în sol, ajungând la rădăcinile plantelor.

În momentul când miceliul întră în contact cu rădăcinile plantelor, agentul patogen intră în faza parazită, în care are loc pătrunderea acestuia în rădăcină prin intermediul celulelor epidermice.

Procesul de infestare a fost studiat de mulţi autori, existând controverse în ceea ce priveşte modul de pătrundere a miceliului în plante. Astfel, o serie de autori, au emis ipoteza că miceliul de *V. longisporum* ar pătrunde în rădăcină prin intermediul leziunilor provocate de nematozi sau insecte din sol (Talboys, 1985 a,b; Bishop şi Cooper, 1983 a).

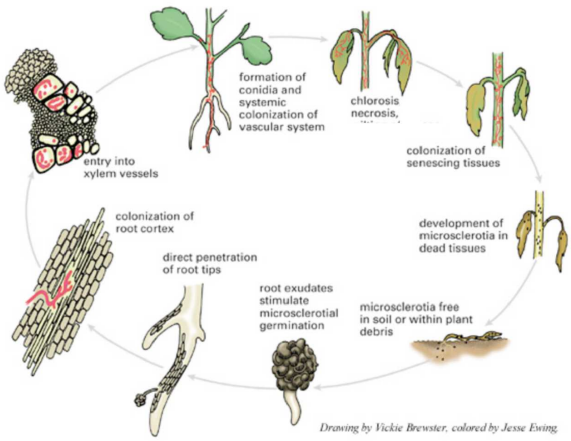


Figura. 2.3 – Ciclul de viaţă al ciupercii *V. longisporum* (după Rowe şi Powelson, 2002)

Alţi autori au afirmat că, *V. longisporum* pătrunde în plantă prin intermediul rădăciniţelor laterale (Zhou şi colab., 2006), dar cele mai recente studii realizate de Eynck şi colaboratorii (2007) au demonstrat că ciuperca infectează plantele prin intermediul hifelor care penetrează celulele epidermice de la nivelul perişorilor absorbanţi ai rădăcinilor principale.

La trei săptamâni de la inoculare, agentul patogen începe colonizarea sistemului vascular al plantei, unde se găseşte un mediu nutritiv sărac, format din cantităţi mici de zaharuri, săruri anorganice şi aminoacizi la care ciuperca este foarte bine adaptată

(Wood 1961; Dimond, 1970; Dixon şi Pegg, 1972; Green, 1981; Pegg, 1984, 1985; Van Alfen, 1989).

În acest mediu nutritiv, *V. longisporum* îşi manifestă atât stadiul de creştere vegetativă, prin formarea miceliului cât şi stadiul de reproducere, prin formarea conidiilor direct din hife sau formate pe scurte fialide (Buckley şi colab., 1969; Gold şi colab., 1996).

După formarea sporilor, aceştia sunt răspândiţi în plantă prin intermediul sevei brute, ei oprindu-se în cavităţile existente de-a lungul vaselor conducătoare şi la capetele acestora. Sporii vor începe să germineze, formând miceliul care va determina obturarea vaselor conducătoare şi invadarea sistemului conducător adiacent. Astfel de colonizare a fost observată de mai mulţi autori în studiile lor (Heinz şi colab., 1998; Beckman, 1987; Zinkernagel, 1982; Gold şi Robb, 1995; Henz şi colab., 1998; Chen şi colab., 2004). În stadii mai avansate, când planta intră în senescenţă, agentul patogen intră în faza saprofitică.

2.4 Simptome şi plante gazdă

Simptome

Verticilioza este dificil de diagnosticat la rapiţă până la momentul începerii coacerii semin elor.

În prima fază de atac, la rapiţă simptomele se manifestă prin cloroze marginale a frunzelor aşa cum se observă în figura 2.4a. Aceste simptome pot fi confundate uşor cu ofiliri cauzate de diverşi factori şi de cele mai multe ori sunt trecute cu vederea. În stadii mai avansate ale bolii, simptomele se prezintă tot sub formă de cloroze pe frunze, dar de această dată doar pe o singură margine a frunzei şi piticiri ale plantelor (Johansson Anna, 2006).

Simptomele interne se pot observa atunci când prin îndepărtarea ţesutului protector al unei tulpini de rapiţă la mijloc apare o dungă de culoare maro-închis (figura 2.4 –b). Acest tip de simptome interne, pot fi observate destul de devreme la majoritatea speciilor de plante atacate de *V. longisporum*, dar la rapiţă este foarte greu de observat (Johansson Anna, 2006).

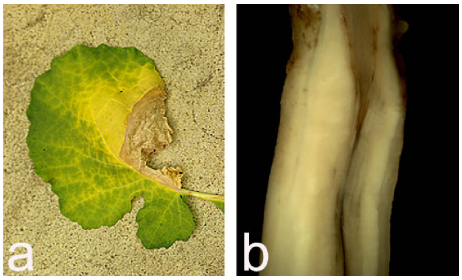


Figura. 2.4 Simptome ale atacului de *V. longisporum* la rapiţă (sursa: Anna Johansson, 2006) – a) Cloroză unilaterala pe marginea frunzei; b) Necroza la nivelul tulpinii plantei infestate

La sfârşitul perioadei de vegetaţie a plantei, când tulpina este uscată, microscleroţii se pot observa cu ochiul liber, dacă se îndepărteaza epiderma superioară. (figura 2.5).

Figura 2.5. Microscleroţi de *V. longisporum* formaţi sub epidermă (Sursa: P Gladders, 2009)

Plante gazdă

Fiind o specie relativ nouă, numeroase studii au avut ca obiect principal şi cercul de plante gazdă al ciupercii *V. longisporum.*

Unii autori au testat virulenţa ciupercii la mai multe specii de plante din familia crucifere, prin rezultatele lor observând că, rapi a este cel mai mult afectată decât alte specii cum ar fi: varza chinezească pak choi *(Brassica rapa* spp. *Chinensis),* conopida *(Brassica oleracea* var *botrytis)* şi broccoli *(Brassica oleracea* var *italica)* (Zeise şi von Tiedemann, 2002).

În urma testelor de virulenţă a agentului patogen *V. longisporum* la mai multe specii de plante s-a constatat că, anumite specii cum ar fi: căpşun *(Fragaria x ananassia)*, in *(Linum usitatissimum),* mazăre (*Pisum sativum*), lupin (*Lupinus* spp.), bob (*Vicia faba*) nu sunt afectate de atacul patogenului, iar la cartof (*Solnanum tuberosum*) şi tomate (*Lycopersicon esculentum*), *V. longisporum* a fost slab virulentă, cauzând totuşi pierderi de recoltă (Zeise şi von Tiedemann, 2002).

2.5 Pagube produse de boală în cultura de rapiţă

Deoarece agentul patogen *Verticillium longisporum* provoacă ofilirea plantelor, sunt de aşteptat efecte asupra produc iei. Studiile realizate au demonstrat că, culturile afectate sever cu *V. longisporum* se maturează cu 14 zile mai devreme decât cele sănătoase (Svensson şi Lerenuis, 1987).

În Suedia s-au semnalat pierderi de recoltă până în 50% (Eastburn şi Paul, 2007), dar acestea pot varia considerabil de la an la an (Anon., 2006). Din acest motiv această boală este considerată ca cea mai importantă pentru rapiţă, în Suedia.

În studiile din Germania elaborate de Dunker şi colaboratorii (2008) au comparat pierderile de recoltă obţinute în doi ani, în cazul unor parcele de rapiţă inoculate artificial cu *V. longisporum*.

2.6 Transmiterea bolii

V. longisporum este o ciupercă din sol, iar prin formele sale de rezistenţă (microscleroţi) poate supravieţui în sol mai mulţi ani. Fiind un patogen care se găseşte în sol, răspândirea acestuia se poate realiza pe mai multe căi (Pegg şi Brady, 2002).

Vântul, apa de suprafa ă sau de drenaj, mașinile agricole pot contribui la răspândirea verticiliozei. În cele mai multe cazuri, cantitatea de inocul transferat este mică şi sunt necesare mai multe cicluri de produc ie astfel încât cantitatea de inocul să devină semnificativă pentru infec ia culturilor.

Apariţia bolii este influenţată de mai mulţi factori cum ar fi temperatura, umiditatea, solul şi rotaţia culturii (Gladders, 2009). În urma unor studii referitoare la influenţa temperaturii asupra apariţiei bolii făcute în Germania s-a afirmat că temperaturile din sol cuprinse între 15-19^{0}C în timpul primelor stadii ale dezvoltării plantelor sunt favorabile infecţiei cu *Verticillium spp*. (Dunker şi colab., 2008; Soesanto şi Termorshuizen, 2009).

Prin studii realizate în Germania, rezultatele obţinute au demonstrat că şi rotaţia culturii este un factor foarte important în apariţia infecţiei cu *Verticillium spp* (Kreye şi colab., 2006).

În alte studii, s-a constatat că infecţia cu *Verticillium* este influenţată şi de umiditate. Astfel, la varza de Brusseles, infecţia cu *Verticillium* a fost mai pronunţată în sezoanele ploioase decât în sezoanele cu secetă (Isaac, 1957).

CAPITOLUL III
UTILIZAREA METODELOR MODERNE ÎN AMELIORAREA RAPIŢEI

3.1. Ameliorarea rapiţei pentru ulei

Plantele oleaginoase reprezintă surse importante de energie atât în consumul uman cât şi în nutriţia animalelor, dar şi surse importante de materie primă pentru numeroase industrii. Din acest considerent, rapiţa (*Brassica napus*) este în zilele noastre una din cele mai importante surse de ulei vegetal din lume (Fiedt şi Luhs, 1998).

De-a lungul timpului, prin programele de ameliorare a rapiţei pentru ulei, s-a urmărit îmbunătăţirea producţiei, îmbunătăţirea fondului de germoplasmă, modificarea compoziţiei seminţelor obţinute şi îmbunătăţirea calităţii uleiului obţinut.

Un progres mare în ameliorarea rapiţei s-a realizat prin utilizarea tehnicilor clasice de selecţie. Primele cultivare de rapiţă au fost obţinute în urma unor scheme diferite de ameliorare ce au fost proiectate pentru selecţia pedigree-ului (Ţârdea, 2002).

Astfel, încrucişarea de tip backcross a fost utilizată cu succes, pentru transmiterea unor caractere moştenite cum ar fi conţinutul scăzut de acid erucic şi glucozinolaţi din seminţe la materialul ameliorat. Prin această tehnică, în 1969, s-a obţinut prima varietate de rapiţă de primăvară cu un conţinut redus de acid erucic şi glucozinolaţi, ce a marcat debutul utilizării rapiţei ca plantă oleaginoasă (Friedt şi Snowdon, capitol înVollman, 2009).

Cu ajutorul mutagenezei şi a selecţiei s-au obţinut primele soiuri mutante cu un conţinut scăzut de acid erucic şi glucozinolaţi(Rakow, 1973; Robbelen şi Nitsch, 1974).

Datorită caracterelor sale, rapiţa colţa (*Brassica napus)* este una dintre cele mai maleabile specii care poate fi ameliorată cu ajutorul biotehnologiilor. De exemplu, la această specie obţinerea de plante dublu haploide, cu ajutorul culturilor de microspori este facilă, obţinându-se într-un timp scurt un număr mare de indivizi (Weber şi colab., 2005).

Pentru crearea unei variabilităţi genetice cât mai mari, se utilizează şi alte tehnici cum ar fi hibridările interspecifice realizate cu ajutorul embrionilor somatici sau fuziunii de protoplaşti. Aceste tehnici au contribuit la îmbunătăţirea fondului de germoplasmă a rapiţei.

Astfel, pentru extinderea bazei genetice a materialului utilizat în ameliorarea rapiţei de toamnă, s-au produs linii resintetizate de rapiţă rezultate în urma încrucişărilor interspecifice dintre genitorii ancestrali *Brassica oleracea* şi *Brassica rapa*. Aceste linii artificiale, au fost produse pe de o parte pentru extinderea diversităţii genetice dar şi pentru îmbunătăţirea bazei genetice a rezistenţei la boli şi dăunători care în unele cazuri este foarte precară la rapiţă.

Biotehnologiile au fost utilizate în multe studii ale genului *Brassica*, iar în unele cazuri liniile obţinute au fost utilizate ulterior pentru producerea unor hibrizi ce posedă gene de rezistenţă de la speciile diploide. De exemplu, Diederichsen şi Sacristan (1996) au utilizat tehnica fuziunii de protoplaşti pentru transferarea rezistenţei la boala hernia rădăcinilor (*Plasmodiophora brassicae*) de la *Brassica oleracea* la *Brassica napus*.

Într-un alt studiu realizat, cu ajutorul culturilor de embrioni, Mithen şi Magrath (1992) au generat o serie de linii sintetice de rapiţă ce aveau rezistenţă la putregaiul negru (*Phoma lingam/Leptosphaeria maculans*) de la *Brassica rapa*. Rezistenţa la putregaiul negru a fost integrată cu succes la rapiţa de primăvară ssp. canola în anii 1990, prin intermediul cultivarului „Surpass" şi ulterior s-au făcut încercări pentru integrarea rezistenţei şi în cadrul rapiţei de toamnă.

O altă boală care a atras atenţia cercetătorilor este boala produsă de agentul patogen *Verticillium longisporum.* Această boală produce pagube de producţie însemnate în Suedia, Danemarca, Marea Britanie şi nodul Germaniei. Ajunsă pe sol, ciuperca formează microscleroţi care pot rezista în sol mai mulţi ani, iar datorită faptului că, în prezent, încă nu sunt fungicide pentru a preveni apariţia acesteia, este foarte importantă realizarea unei rotaţii corespunzătoare şi utilizarea de cultivare rezistente (Snowdon şi Friedt capitol în Kole, 2007).

În ceea ce priveste rezistenţa genetică a rapiţei la această boală, au fost realizate puţine studii, de aceea un alt obiectiv este identificarea şi transferarea de noi surse de rezistenţă la această boală. În acest sens, în anul 2003 Happstadius şi colaboratorii, au încercat transferarea unor surse de rezistenţă genetică la *V. longisporum*, identificată la *Brassica oleraceae* în genomul de *Brassica napus* prin intermediul hibridării interspecifice.

Rygulla şi colaboratorii (2007) au identificat surse de rezistenţă poligenică la indivizi diferiţi ce au ancestori napul şi varza. În acest scop, prin intermediul hibridării interspecifice şi a culturii de ovule, acestia au încrucişat genotipuri de la *Brassica oleracea* cu indivizi de *Brassica rapa*. Astfel, populaţia obţinută în urma încrucişării poate fi un nou punct de plecare în obţinerea unor varietăţi noi cu rezistenţă combinată de la doi părinţi diploizi.

Hibridările interspecifice au fost folosite în ameliorare şi pentru îmbunătăţirea unor caractere morfologice ale rapiţei cum ar fi culoarea tegumentului seminţelor. Interesul amelioratorilor pentru acest caracter este determinat de asocierea culorii cu grosimea tegumentului care determină cantitatea de fibre din seminţe. În acest sens, unii autori consideră că, grosimea tegumentului îmbunătăţeşte considerabil calitatea furajului obţinut în urma extragerii uleiului de rapiţă (Shirzagedan şi Robbelen, 1985; Slominski şi colab., 1994, 1999).

Baldani şi colaboratorii (2003) au studiat determinismul genetic al caracterelor culoarea seminţelor şi conţinutul în fibre la mai multe linii de rapiţă cu seminţe de culoare galbenă ce au provenit din încrucişări între două surse de *Brassica rapa*, diferite din punct de vedere genetic, şi au constatat că în fiecare caz caracterul „seminţe galbene" este controlat de o genă dominantă cu unul sau doi loci epistatici.

3.1.1 Metode de amprentare genetică

a) Utilizarea markerilor biochimici şi a izoenzimelor

Înainte de descoperirea markerilor moleculari, cea mai rapidă metodă pentru caracterizarea şi identificarea noilor varietăţi, a noilor indivizi şi a populaţiilor foarte greu de deosebit era utilizarea markerilor biochimici şi a izoenzimelor.

La rapiţă, această tehnică era foarte utilizată în anii 80, având numeroase aplicaţii în ameliorarea acesteia. Acest tip de markeri morfologici au fost folosiţi în mai multe studii, pentru caracterizarea indivizilor obţinuţi prin hibridare interspecifică (Sascristan şi colab., 1989; Sjodin şi Gimelius, 1989; Sundberg şi Gimelius, 1991), pentru testarea

purităţii genetice a indivizilor din generaţia F_1 obţinuţi în urma încrucişărilor (Arus şi colab., 1983; Nijenhuis, 1979), dar şi pentru studiile filogenetice şi taxonomice a familiei *Brassicaceae* (Arus şi colab., 1983; Denford şi Vaughan, 1977; Truco şi Arus, 1987; Vaughan şi Denford, 1968).

Polimorfismul enzimatic detectat prin electroforeză a fost un mijloc util în identificarea şi caracterizarea cultivarelor de rapiţă (Gupta şi Robbelen, 1986; Mundges şi Kohler, 1990; Chevre şi colab., 1991a), diferenţierea genomurilor obţinute prin hibridare somatică (Sundberg şi colab., 1987; Jourdan şi colab., 1989) şi estimarea ratelor hibridărilor îndepărtate (Jain, 1979; Hackenberg şi colab., 1980; Becker şi colab., 1992).

Rezultatele numeroase şi cu reproductibilitate mare obţinute cu ajutorul izoenzimelor în cadrul identificării şi caracterizării genotipurilor la diferite specii au dus la perspectiva utilizării acestei tehnici pentru selecţia asistată de markeri (Marker Assisted Selection). Dar în această privinţă, utilizarea izoenzimelor s-a dovedit a fi limitată datorită asocierii insuficiente dintre acestea cu caracterele morfologice (Snowdon şi colab., capitol în Kole 2009).

b)Utilizarea tehnicilor bazate pe markeri moleculari

Un progres esenţial în munca de ameliorare a plantelor s-a înregistrat odată cu apariţia tehnicilor bazate pe markeri moleculari. Aceste tehnici de studiere a genomurilor au la baza mai multe tipuri de markeri ADN cum ar fi: RFLP (Restiction Fragment Length Polimorfism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) etc.

Tehnica RFLP (Restiction Fragment Length Polymorphism)

Debutul utilizării markerilor moleculari în procesul de ameliorare a plantelor a fost o dată cu apariţia markerilor RFLP. Acestă tehnică se bazează pe variaţia lungimii fragmentelor de ADN genomic rezultate în urma restricţiei cu ajutorul unor enzime numite endonucleaze. Aceste enzime, originare de la organismele procariote, au capacitatea de a „tăia” ADN genomic în fragmente palindromice, bine definite, cu mărimi cuprinse între 4-6 perechi de baze (Gupta, 2007). Identificarea fragmentelor obţinute se face cu ajutorul electroforezei apoi, prin hibridarea acestora cu o sondă radioactivă care con ine doar unele secven e, se face screeningul materialului, râmânând doar fragmente complementare celor din sondă ce se vor observa prin autoradiobiografie (Leonte, 2011).

Aceşti tip de markeri au fost utiliza i în amelioarea plantelor pentru determinarea diversităţii genetice între specii, studii taxonomice, în cartarea genetică dar şi identificarea de QTL (Quantitative Trait Loci).

Markerii specifici pentru RFLP au stat la baza întocmirii mai multor hăr i genetice la rapiţă pentru diverse popula ii segregante rezultate prin încrucişări între: hibrizi sintetici de rapi ă cu varietă i normale (Sharpe şi colab., 1995), două linii dublu haploide cu indivizi homogametici (Hoenecke şi Chyi, 1991; Parkin şi colab., 1995), încrucişare de tip backcross între două linii diferite de rapi ă de primăvară (Kelly şi colab., 1997), etc.

Cu ajutorul markerilor pentru RFLP a fost posibilă localizarea unor gene şi QTL responsabile de anumite caractere agronomice importante cum ar fi: identificarea

genelor responsabile de înflorit (Ferreira şi colab., 1995b, Osborn şi colab., 1997), QTL asociat cu creşterea rapi ei (Ferreira şi colab., 1994, 1995 a, b,c).

Tehnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a fost descoperită de Williams şi colaboratorii în anul 1990. Metoda este rapidă, relativ ieftină şi bine adaptată pentru obţinerea unei amprente genetice neradioactive (Welsh şi Mcclelland, 1990). Tehnica RAPD se bazează pe determinarea polimorfismului la nivel alelic, în ceea ce priveşte producerea unor produşi de amplificare sau lipsa lor, în urma utilizării unui primer oligonucleotidic, arbitrar, într-o poziţie care să-i permită realizarea amplificării (Carşai şi colab., 2009).

Acestă tehnică a fost utilizată cu succes în programele de ameliorarea a genului *brassica*, în studii taxonomice ale speciilor ce alcătuiesc triunghiul „U" (Demeke şi colab., 1992), în amprentarea genetică la broccoli şi conopidă (Hu şi Quiros, 1991), dar şi pentru diferenţierea unor specii de *Brassica* cum ar fi: *B. nigra*, *B. juncea*, *B. hitra şi B. rapa* (Sakova şi Curn, 1998).

La rapiţă, markerii specifici pentru RAPD au fost utiliza i, la întocmirea hăr ilor genetice (Foisset şi colab., 1995, 1996; Uzunova şi colab., 1995), pentru caracterizarea hibrizilor sintetici, a hibrizilor obţinuţi în urma hibridărilor interspecifice şi a plantelor transgenice (Hajkova şi colab., 2005; Kerlan şi colab., 1993).

Tehnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Metoda AFLP se bazează pe utilizarea enzimelor de restricţie urmate de amplificarea fragmentelor rezultate şi detectarea polimorfismelor lungimii acestor fragmente. Metoda a fost elaborată de Vos şi colaboratorii în anul 1995.

Această tehnică a fost utilizată cu succes în evaluarea divesităţii genetice a unor cultivare de rapiţă (Seys şi colab., 2003a, b), caracterizarea unor hibrizi obţinuţi în urma hibridărilor interspecifice (Hansen şi colab., 2001, 2003), evaluarea relaţiilor genetice între cultivare (Das şi colab., 1999) şi în alcătuirea hărţilor genetice şi a identificării de QTL pentru caractere de interes.

Tehnica SSR (Simple Sequence Repeat)

Markeri specifici SSR, descoperiţi de către Litt şi Lutty (1989) sunt secvenţe scurte care se repetă în tandem şi conţin motive de 1-6 perechi de baze care flanchează cu o secvenţă unică de ADN. Una din cele mai importante caracteristici ale acestor tip de markeri este faptul că determină la un nivel foarte ridicat variaţia alelică dintre genotipuri apropiate (Smith şi Devery, 1994).

Polimorfismul determinat de microsateliţi poate fi analizat fie prin tehnica „southern hybridization" fie prin tehnica PCR (polimerase chane reaction). Se pare că aceştia sunt rezultatul crossing-overului inegal. Tehnica PCR este aceea care va fi utilizată pentru relevarea profilurilor individuale, furnizând markeri specifici de locus ce se transmit codominant (Dakin E. şi colab., 2004).

Markerii specifici pentru SSR sunt folosiţi cu succes în ameliorarea rapiţei pentru determinarea identităţii genetice între indivizi de acelaşi fel, relaţiilor genetice între anumite genotipuri şi în cartarea genetică (Kresovich şi colab., 1992; Ribaut şi colab., 1997; Uzonuva şi Ecke, 1999).

3.1.2. Aplicarea markerilor moleculari în ameliorarea rapiţei

· Cartarea genetică şi QTL identificate pentru caractere morfologice

Multe caractere ale plantelor de cultură cum ar fi: producţia, calitatea producţiei şi câteva forme de rezistenţă la boli sunt controlate de mai multe gene şi sunt denumite „trăsături cantitative, trăsături poligenice sau polifactoriale".

Regiunile din genom ce conţin gene care sunt asociate cu o anumită trăsătură sunt cunoscute sub numele de „QTL" (Quantitative Trait Loci). Identificarea QTL a fost posibilă prin descoperirea markerilor ADN în anul 1980. Una din principalele utilizări ale markerilor ADN în ameliorare este în întocmirea hărţilor linkage la diferite specii de plante cultivate. Hărţile linkage sunt utilizate, pentru identificarea regiunilor din cromozom, unde sunt localizate acele locusuri care conţin gene ce controlează trăsături simple şi trăsături cantitative (QTL). Procesul întocmirii hărţii linkage şi identificarea a anumitor regiuni de pe cromozomi asociate cu anumite trăsături se numeşte cartare QTL (Collard, 2009).

În ultimele două decade, un număr mare de hărţi genetice au fost întocmite la rapiţă, având ca material genetic diferit şi s-au depus eforturi mari în localizarea genelor şi QTL care sunt responsabile pentru cele mai relevante caractere agronomice.

În acest sens, multe studii s-au concentrat pe cartarea regiunilor genomice care controlează caractere ca timpul de înflorire şi durata de vernalizare (Ferreira şi colab., 1995c). Au fost identificaţi markeri asociaţi de gena care controlează caracterul de „piticire" la rapiţă (Foisset şi colab., 1995; Barret şi colab., 1998).

Conţinutul de glucozinolaţi este un caracter poligenic, fiind controlat de mai mulţi QTL. Acumularea glucozinolaţilor este influenţată în general de trei QTL, identificaţi în regiuni omoloage în genomul de *Brassica napus*, ceea ce sugerează că, pentru acest caracter ar fi responsabile două gene identice (Howell şi colab., 2003).

Cantitatea de acid linoleic din seminţele de rapiţă determină calitatea uleiului, de aceea acest caracter a fost studiat mult. Au fost realizate studii în ceea ce priveşte conţinutul de acid linoleic din seminţele de rapiţă, fiind identificaţi mai mulţi markeri specifici pentru RAPD şi pentru AFLP asociaţi cu acesta (Somers şi colab., 1998; Tanhuanpaa şi colab., 1995; Hu şi colab., 1999; Schierholt şi colab., 2000; Jourdren şi colab., 1996).

· QTL identificaţi pentru rezistenţa la boli

Caracterizarea genetică a rezistenţei la boli şi dăunători şi identificarea markerilor asociaţi cu genele ce conferă rezistenţă, sunt printre cele mai importante obiective în ameliorarea rapiţei pentru ulei, datorită impactului negativ pe care îl au bolile şi dăunătorii asupra producţiei.

Cele mai importante boli în cultura rapiţei sunt: putregaiul negru produs de *Leptosphaeria maculans,* putregaiul alb produs de *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary şi virusul mozaicului galben al rapiţei.

Pillet şi colaboratorii (1998b, 2001) au identificat un QTL pentru genele ce conferă rezistenţa la boala putregaiul uscat la diferite genotipuri de rapiţă cu zestre ereditară diferită. Un alt QTL de rezistenţă a fost identificat într-o populaţie segregantă alcătuită din 98 de linii dubluhaploide, rezultată din încrucişarea unui cultivar rezistent „Cresor" cu un cultivar sensibil „Weslar"(Dion şi colab.,1995).

Rezistenţa rapiţei la virusul mozaicului galben a fost studiată prin cartarea unei populaţii de indivizi DH proveniţi din încrucişarea unei linii resintetizate (folosită ca donor al rezistenţei) şi cultivarul „Express", identificându-se astfel un QTL pentru această boală (Dreyer şi colab., 2001).

O altă boală care a fost studiată este putregaiul alb produsă de agentul patogen *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary. Zao şi Meng (2003) au realizat o hartă genetică cu scopul de a identifica QTL de rezistenţă la putregaiul alb la un material cu rezistenţă parţială provenit din China.

În ceea ce priveşte rezistenţa rapiţei la boala produsă de agentul patogen *Verticillium longisporum* există o mică variabilitate genetică în genomul de *B. napus*. Însă identificarea unei rezistenţe la *B. oleracea* şi transferarea acesteia în genomul de *B. napus* prin hibrizi resintetizaţi crează posibilitatea obţinerii unor populaţii rezistente care vor contribui la elucidarea controlului genetic la această boală.

3.1.3 Studii privind rezistenţa rapiţei la *Verticillium longisporum*

Rezistenţa la bolile produse de agenţii patogeni din genul *Verticillium* a fost studiată la mai multe specii de plante. Astfel la hamei a fost studiată de Talboys, (1957, 1958a), la tomate (Bishop şi Cooper, 1984; Gold şi Robb, 1995), cartof (Concibido şi colab., 1994; Lynch şi colab., 1997; Jansky, 2000).

În ceea ce priveşte plantele din familia crucifere, rezistenţa la *Verticillium ssp*. a fost descrisă la conopidă (Koike şi Subbarao, 1994; Debode, 2005), varza japoneză (Kemmochi şi colab., 2000), hrean (Atibalentja şi Eatburn, 1998), varză, nap (Happstadius şi colab., 2003; Dixelius şi colab., 2005) şi rapi ă (Steventon şi colab., 2002b).

Mecanismul rezisten ei plantelor la acţiunea agentului patogen *Verticillium spp* a fost studiată la bumbac, hamei şi tomate. Potrivit lui Talboys (1957), mecanismele de rezistenţă încep să se manifeste în faza când miceliul intră în contact cu rădăcina plantelor (faza pre-vasculară) şi devin mai eficiente din momentul în care miceliul intră în sistemul vascular al plantei (faza post-vasculară).

La rapiţă, o primă reacţie de apărare a plantei la atacul cu *Verticillium* este, realizarea acelor formaţiuni (lignituburi) între pereţii celulari ai vaselor conducătoare din rădăcină, prin acumularea ligninei, care funcţionează ca adevărate „bariere" împotriva răspândirii ciupercii (Talboys, 1958; Presley şi colab., 1966; Griffiths, 1971; Bishop şi Cooper, 1983a).

Epiderma suberizată a rădăcinilor este considerată în general, o barieră naturală împotriva infec iei cu *Verticillium* în rădăcini (Talboys, 1964, 1984). Un alt mecanism de apărare împotriva agentului patogen este producerea fitoalexinelor, care sunt eliberate în rădăcină după infecţie (Bell, 1969; Daayf şi colab., 1997).

Reacţia de apărare sistemică a plantelor implică declanşarea unei serii de mecanisme de natură anatomomorfologică, fiziologică şi biochimică.

Deoarece încă nu există o combatere chimică a acestei boli, realizarea unor cultivare rezistente la boală este foarte importantă pentru controlul acestei boli. Baza genetică şi mecanismele moleculare care determină rezistenţa plantelor la atacul cu *Verticillium* sunt puţin cunoscute. Multe specii, cum ar fi lucerna şi menta conţin gene care determină o anumită toleranţă la atacul agentului patogen, dar nu o rezistenţă completă (Hastie şi Heale, 1981

Singura genă responsabilă de rezistenţa la *Verticillium*, este gena *Ve* identificată la tomate care se pare că, este dominantă şi conferă rezistenţă la ambele specii de *V. albo-atrum* şi *V. dahliae* (Schailbe, 1951; Diwan şi colab., 1999; Gols şi Robb, 1995; Kawchuk şi colab., 2001).

La rapiţă, amelioratorii au încercat să obţină cultivare rezistente la boala produsă de agentul patogen *V. longisporum*, de mai mul i ani, dar s-au obţinut doar soiuri tolerante. Un exemplu în acest sens sunt soiurile „Express" şi „Talent" care au o oarecare rezisten ă, în timp ce „Falcon" este sensibil. Variabilitatea genetică privind rezistenţa la *Verticillium* în cadrul speciei *Brassica napus* este foarte limitată, astfel că pentru obţinerea de soiuri rezistente este necesară introducerea unor gene de rezistenţă de la alte specii de *Brassica* cum ar fi *Brassica oleracea*, specii rustice *B. incana*, etc (Happstadius şi colab., 2003).

Surse de rezistenţă la atacul agentului patogen au fost identificate la conopidă, varză şi *Brassica rapa* (Debode și colab., 2005). Baza genetică a acestor surse de rezistenţă nu este cunoscută, dar nici markeri moleculari legaţi de locii pentru rezistenţă şi nici selecţia asistată de markeri nu a mai fost realizată până acum pentru acestă boală.

Cele mai promi ătoare surse de rezisten ă au fost identificate la *B. oleracea* şi s-a încercat transferul acestor gene de rezistenţă la rapită, prin intermediul încrucişărilor între aceste specii (Happstadius și colab., 2003; Rygullla şi colab., 2003).

Referitor la rezistenţa rapiţei la *V. longisporum*, au fost identificaţi patru QTL localizaţi în patru zone diferite în genomul rapiţei, într-o populaţie de linii sintetice rezultate din hibridarea interspecifică între *B. oleracea şi B. rapa* (Rygulla şi colab., 2007, 2008).

CAPITOLUL IV
CADRUL NATURAL ŞI INSTITUŢIONAL IN CARE S-AU DESFĂŞURAT CERCETĂRILE

4.1 Prezentarea Staţiunii de Cercetare – Dezvoltare Agricolă Secuieni

Staţiunea Experimentală Agricolă Secuieni a fost înfiinţată la 1 ianuarie 1962 cu scopul de a ridica nivelul agriculturii practicate în Podişul Central Moldovenesc.

Unitatea face parte din reţeaua de staţiuni zonale ale Institutului Naţional de Cercetare Dezvoltare Agricolă Fundulea, subordonat Academiei de Ştiinţe Agricole şi Silvice „ Gheorghe Ionescu-Şişeşti", activitatea fiind structurată în două sectoare, cercetare şi dezvoltare.

4.1.1. Aşezarea geografică şi caractere generale ale zonei Secuieni.

Staţiunea de Cercetare Dezvoltare Agricolă Secuieni (S. C. D. A.) este situată în partea de S-E a judeţului Neamţ pe teritoriul Podişului Central Moldovenesc.

Din punct de vedere al aşezării geografice, staţiunea se încadrează în coordonatele de 26°5' longitudine estică şi 46°5' latitudine nordică, având o altitudinde de 205,7 m faţă de nivelul mării.

Climatul este de tip temperat continental. În acestă zonă sunt caracteristice influenţele est-europene imprimate de predominarea maselor de aer rece în timpul iernii şi a celor calde şi uscate în vară.

4.1.2. Condiţiile mediului natural.

Geologia terenului

În alcătuirea geologică de ansamblu se distinge prezenţa Platformei Moldoveneşti al cărei soclu este constituit din formaţiuni cristaline de vârstă precambiană, înscriindu-se între primele uscaturi ale pământului Europei.

Relieful

Relieful zonei are aspect structural fiind alcătuit din interfluvii şi văi orientate în principal NV-SE şi platouri structurale. Se remarcă un relief de coline şi dealuri, care înglobează câmpuri interfluviale întinse, lunci şi terase. Văile sunt largi, au 7-8 terase cu altitudini relative ce depăşesc 170 – 200 m.

Solurile

Solurile se împart în două mari zone sau etaje de sol:

- zona solurilor argilo-iluviale - corespunzătoare zonei forestiere din partea mai înaltă;
- zona solurilor molice - corespunzătoare silvostepei sarmato-pontice din părţile mai joase.

Vegetaţia apare reprezentată ca o consecinţă a climatului şi a etajării descendente a reliefului. În zonele mai înalte s-a instalat o vegetaţie caracteristică zonei forestiere, subetajul gorun – stejar.

În zonele mai joase, vegetaţia este cea caracteristică silvostepei. Peisajul natural al silvostepei a suferit puternice transformări antropozoogene, peste 80% din teritoriul ei devenind terenuri arabile, iar pâlcurile de pădure şi pajiştile care se mai păstrează sunt intens modificate sub aspectul vegetaţiei spontane.

Apele din zonă aparţin bazinului hidrografic Siret şi au un regim de tip pericarpatic estic, caracterizat printr-o scurgere foarte variată în timpul anului. Viiturile au geneză pluvială în 90% din cazuri.

Sursa principală de alimentaţie a unităţilor acvatice o constituie precipitaţiile. Cel mai important consumator îl reprezintă evapotranspiraţia. Principalele cursuri de apă sunt Siretul, Moldova şi Valea Neagră.

4.1.3. Caracterizare climatică.

Climatul este de tip temperat continental caracterizat prin primăveri scurte, veri răcoroase şi ierni aspre.

Datele climatice analizate provin de la Staţia Meteorologică proprie amplasată la S.C.D.A. Secuieni din anul 1962, în apropierea câmpurilor experimentale şi reprezintă prelucrarea mediilor a patru citiri zilnice.

· Caracterizarea climatică a anului agricol 2010-2011

În toamna anului 2010 s-au înregistrat condiţii climatice favorabile efectuării lucrărilor de bază pentru înfiinţarea culturilor de toamnă. Regimul termic a fost apropiat de normal pentru luna septembrie, mai răcoros în octombrie (abaterea -2,7^{0}C) şi foarte călduros în noiembrie (abaterea +4,8^{0}C).

Regimul pluviometric a fost excendentar cu 8,1-10,7 mm/lună (tabelul 4.1). În condiţiile descrise, răsărirea plantelor s-a realizat rapid şi uniform. La intrarea în iarnă cerealele de toamnă erau înfrăţite, iar rapiţa de toamnă era în faza de 6-8 frunze complet dezvoltate.

Iarna a fost mai rece şi mai secetoasă decât normală, iar temperaturile minime negative s-au înregistrat în ultimele zile din decada a III a lunii noiembrie.

Temperaturile medii cu valori negative s-au înregistrat în primele zile ale lunii decembrie. Prima zăpadă a apărut în jumătatea primei decade a lunii decembrie.

Stratul de zăpadă s-a menţinut 22 de zile în decembrie având grosimea de 2-15 cm; 22 de zile în ianuarie (2-7 cm), 16 zile în februarie (3-17 cm) şi 13 zile în martie (4-19 cm).

Desprimăvărarea a avut loc mai târziu. Primăvara a fost secetoasă cu deficite pluviometrice de 17 mm în martie şi 16,9 mm în mai, comparativ cu normală.

În concluzie, condiţiile climatice din anul agricol 2010-2011 au fost foarte favorabile pentru culturile de rapiţă, cereale de toamnă, porumb şi fasole.

4.2. Descrierea laboratorului LECOM

Laboratorul LECOM are sediul în Aleea M. Sadoveanu, nr. 3 – 9, cod 700490, Iasi, şi este parte integrată a Departamentului de Cercetare al Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară “Ion Ionescu de la Brad” Iaşi (USAMV).

Laboratorul pentru expertizarea, certificarea şi controlul organismelor modificate genetic şi a produselor agro-alimentare ob inute – LECOM a fost creat în anul 2006, în contextul intrării României în piaţa unică europeană avându-se în vedere necesitatea existenţei unor laboratoare care să poată certifica conformitatea produselor agricole, calitatea acestora, în vederea creşterii securităţii alimentare pentru consumul regional dar şi al produselor care pătrund pe piaţa europeană. Suportul tehnic, personalul calificat al laboratorului permit efectuarea de analize genetice atât la plante cât şi la ADN extras din produse alimentare şi furajere.

Fluxul laboratorului este realizat astfel:

1. Camera de primire probe

Camera de primire probe este destinată primirii probelor de către personalul laboratorului de la clienţi. Probele primite sunt păstrate în condiţii optime, iar analizele efectuate sunt înregistrate electronic şi au acces controlat.

2. Camera de măcinare probe

Această cameră este dotată cu o moară de laborator de RETSCH MM400. Moara este prevăzută cu 4 capsule metalice, iar măcinarea se realizează cu ajutorul bilelor metalice. Cu acaestă moară pot fi măcinate probe ca: seminţe de soia, porumb, fasole etc. De asemenea moara are posibilitate de măcinare cu ajutorul criogeniei. Folosind acest tip de măcinare se poate mărunţi şi material vegetal îngheţat, în vederea extragerii ADN. Camera mai este prevăzută şi cu un smasher de laborator care poate fi utilizat la pregărirea materialului vegetal în vederea realizării culturilor in vitro.

3. Camera de extragere ADN.

Pentru extragerile de ADN din diverse materiale vegetale, laboratorul LECOM are prevăzută o cameră specială care are în dotare echipamentele necesare extragerii ADN şi anume:

- *Nişă chimică* – are rol de protecţie a operatorului şi a mediului înconjurător în cazul manipulării substanţelor şi pulberilor periculoase, prin utilizarea filtrelor de cărbune activ şi a filtrelor HEPA. Este necesară în procesul de extragere ADN pentru că se folosesc substanţe volatile cum ar fi: cloroform, alcool etilic, B-mercamptoetanol;
- *Ultracentrifugă cu răcire HETTICH MIKRO 200R* – este folosită pentru centrifugarea plăcilor de 1,5 ml la o temperatură de 4 ^{0}C, temperatură la care trebuie centrifugate tuburile Eppendorf în timpul extragerii de ADN;
- *Balanţă analitică KERN*- este utilizată la cântărirea materialului vegetal pentru extragere ADN;
- *Baie marină* – este utilizată în timpul extragerii pentru incubarea probelor de material vegetal la o temperatură de 60^{0}C;
- *Etuvă (incubator)*;
- *Agitatoare magnetice cu încălzire* – sunt folosite la procedeul de extragere ADN pentru prepararea substanţelor necesare în cadrul procesului de extragere. Acestea sunt prevăzute cu placă de aluminiu care asigură încălzirea şi amestecarea uniformă a soluţiilor chimice;
- *Vortexuri de laborator* – aceste aparate cu rotaţii line şi viguroase sunt folosite la amestecarea componentelor biologice şi chimice în tuburi de 1,5 şi 2 ml.

4. Camera de realizare amestec PCR

Analizarea ADN presupune realizarea în prealabil a reac iei PCR. Efectuarea acestei operaţii se face într-o cameră separată dotată cu:

- *Hotă cu flux laminar* – aceasta funcţionează pe principiul recirculării aerului din interior. Aerul circulă descendent prin filtrul principal montat deasupra spaţiului de lucru, astfel în interior se crează condiţii de sterilitate.
- *Centrifugă HETTICH MIKRO 120*- este folosită pentru centrifugarea tuburilor de 1,5 ml al căror conţinut nu necesită menţinerea la temperaturi scăzute (nu are sistem de răcire) pentru separarea gravimetrică a compuşilor cu greutate specific diferită. Are dimensiuni mici şi este uşor de utilizat.
- *NanoDrop 2000* – este un florospectofotometru cu ajutorul căruia se citeşte concentraţia de ADN după extragere.

5. Camera de amplificare

Este destinată multiplicării fragmentelor de ADN. În vederea realizării acestei opera ii camera este dotată cu:

- *Sistem pentru apă ultrapură* – sistemul are o capacitate de 4l/h apă purificată prin osmoză inversă la presiune de alimentare de 60 psig, grad de recuperare al apei de 10-20%, debit de apă tip l de 800 ml/min. Puritatea apei este monitorizată iar rezistivitatea este măsurată cu un aparat inclus şi afişată pe panoul frontal. Cu acest tip de aparat se obţine apa necesară pentru diferite diluţii sau medii de reacţie, liberă de ADN, ARN etc.

- *Sistem de electoforeză în gel vertical* – este un sistem de electroforeză în gel acrilamidic, în timp real destinat analizei rapide a fragmentelor de ADN. Pot fi produse date, în gel de electroforeză de rezoluţie mare, în doar câteva minute, cu posibilitatea de re-utilizare a gelului de până la 5 ori fără pierderea calităţii imaginii (se pot încărca mai multe serii de probe în acelaşi gel, succesiv).

6. Camera de electroforeză

Camera de electroforeză este folosită în laborator pentru realizarea gelurilor de agaroză in plan orizontal pentru a putea vizualiza fragmentele de ADN care au fost amplificate în urma reacţiei PCR. Camera este dotată cu:

- *Centrifuga pentru plăci* – este folosită pentru centrifugarea plăcilor PCR.

- *Cuptor cu microunde* – este utilizat în laborator pentru prepararea gelului de agaroză care necesită fierbere;

- *Balanţă analitică* – este utilizată pentru cântărirea diferitelor substanţe chimice şi a agaroză folosite în laborator;

- *Cuve de electroforeză* cu sursele aferente lor de diferite mărimi – aceste echipamente permit separarea fragmentelor de ADN din soluţia de reacţie pe principiul vitezei diferite de deplasare, invers proporţională cu masa moleculară a acestora în gel de agaroză. Se foloseşte pentru RAPD.

7. Camera de secvenţiere

Această cameră este destinată secvenţierii fragmentelor de ADN şi cuantificării ADN. Pentru realizarea acestor operaţii camera are în dotare:

- *Secvenţiator ADN ABI PRISM 310 Genetic analyzer* – este un analizor cu un singur capilar ce permite realizarea unui număr mare de aplicaţii (secvenţiere, analiza fragmentelor ADN, genotipizare, obţinerea de grupe de linkage). Echipamentul permite secvenţializarea fregmentelor de ADN din soluţia de reacţie.

- *Real time PCR* – este un termocycler care permite vizualizarea curbelor de amplificare ADN. Posedă 4 detectori fiind capabil să suporte multiple aplicaţii inclusive cuantificarea relativă, genotipizarea SNP. Florocromii calibraţi ce pot fi detectaţi sunt SYBR Green, FAM™ VIC™, JOE™ ,JOE™, NED™, TAMRA™, ROX™. Poate detecta de la 10 copii de ADN, iar gradul de confidenţă este de 99,7%.

8. Camera de preluare imagini

După ce fragmentele de ADN au fost încărcate pe gelul de agaroză, vizualizarea acestora se va face în camera destinată special pentru această operaţie, întrucât principiul de vizualizare a fragmentelor este cu ajutorul bromurii de etidium care este foarte toxică.

CAPITOLUL V
OBIECTIVELE URMĂRITE, MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

5.1. Scopul şi obiectivele cercetărilor

Cercetările realizate în cadrul tezei de doctorat au avut ca scop identificarea unor surse de germoplasmă de rapiţă (*Brassica napus* L.) cu rezistenţă genetică la atacul agentului patogen *Verticillium longisporum*, cu ajutorul tehnicilor bazate pe markeri moleculari.

Verticilioza, provocată de agentul patogen *V. longisporum* este considerată în prezent una dintre cele mai importante boli la rapiţă întâlnite în Europa.

Ciuperca invadează sistemul vascular al plantei, prin perişorii absorbanţi, iar o dată cu dezvoltarea acesteia, sistemul se blochează, oprindu-se astfel circulaţia apei şi sevei în plantă. Planta suferă astfel de stres hidric şi poate muri.

Până în prezent, încă nu s-au descoperit tratamentele chimice pentru prevenirea acestei boli, un control al acesteia putând fi realizat doar prin cultivarea unor soiuri şi hibrizi rezistenţi.

În urma documentării efectuate, am constatat că, literatura de specialitate străină este destul de bogată în ceea ce priveşte cercetările privind identificarea genelor responsabile cu rezistenţa plantelor din genul *Brassica* la atacul agentului patogen *V. longisporum*.

În România, nu s-au făcut cercetări referitor la acestă temă, deşi interesul pentru acestă cultură a început să fie din ce în ce mai mare, de aceea este important să acordăm mai multă atenţie bolilor care afectează această cultură.

Evaluarea genetică a cultivarelor de rapiţă provenite de Centrul de Resurse Genetice (Centre for Genetic Resources Netherlands – CGN) se înscrie într-un domeniu de interes mondial în ceea ce priveşte evaluarea unor forme de germoplasmă existente care pot fi utilizate ca material iniţial în procesul de ameliorare în condiţiile schimbărilor climatice şi a extinderii agenţilor patogeni.

De asemenea, dotările existente în cadrul laboratorului LECOM au premis îndeplinirea obiectivelor propuse.

Pentru aceasta, prin tema propusă am reuşit să stabilim corelaţiile existente între markerii moleculari (RAPD şi SSR) şi comportarea fenotipică a liniilor/soiurilor de rapiţă în cazul infecţiei cu agentul patogen *Verticillium longisporum*, utilizând ca sursă de germoplasmă 130 de linii şi soiuri de rapiţă de toamnă provenite de la Centrul pentru Resurse Genetice din Olanda (Centre for Genetic Resources Netherlands – CGN).

Deoarece, la cele 130 de cultivare luate în studiu se cunoaşte doar ţara de origine, iar descrierea cultivarelor din punct de vedere morfologic şi genetic nu a fost disponibilă, am considerat necesară şi o analiză în câmp a principalelor caractere morfologice a materialului biologic studiat pentru a avea şi o caracterizare fenotipică a acestuia.

Pentru îndeplinirea scopului cercetărilor, s-au urmărit o serie de obiective specifice:

Ø Evaluarea fenotipică a celor 130 de linii luate în studiu, prin analizarea principalelor caractere morfologice în câmp: înălţimea plantelor, numărul de ramificaţii, numărul de silicve pe plantă şi MMB (masa a 1000 de boabe);

Ø Evaluarea genetică a 130 de linii şi soiuri de rapiţă de toamnă provenite de la Centrul pentru Resurse Genetice din Olanda (Centre for Genetic Resources Netherlands – CGN) prin utilizarea markerilor moleculari specifici pentru RAPD şi SSR şi generarea unor dendrograme cu scopul de a determina diversitatea genetică a acestor linii;

Ø Identificarea cultivarelor sensibile/tolerante la boala produsă de agentul patogen *V. longisporum*.

Ø Stabilirea corelaţiilor existente între structura genetică şi comportarea fenotipică prin markeri moleculari specifici pentru SSR, întocmirea harţilor genetice şi identificarea QTL (Quantitative Traits Loci);

5.2. Materialul biologic folosit

Cercetările care fac obiectul acestei lucrări, au la bază, materialul biologic reprezentat de 130 de linii şi soiuri de rapiţă provenite de la Centrul pentru Resurse Genetice din Olanda (Centre for Genetic Resources Netherlands – CGN) (tabelul 5.1).

Aceste linii au fost semănate în câmp în anul 2010-2011 (figura 5.1) la Staţiunea de Cercetare şi Dezvoltare Agricolă, Secuieni, judeţul Neamţ cu scopul de obţine datele fenotipice necesare caracterizării morfologice a liniilor dar şi pentru obţinerea materialului vegetal necesar analizelor moleculare (RAPD şi SSR).

Figura 5.1 Aspecte din câmpul de rapiţă de la Secuieni (original)

Pentru obţinerea datelor fenotipice cu privire la rezistenţa materialului biologic la atacul agentului patogen *V. longisporum*, acesta a fost testat, în seră, prin infecţie artificială, experimentele efectuându-se în cadrul Laboratorului de Fitopatologie şi Protecţia Plantelor de la Universitatea Georg August, Goettingen, Germania.

Tabelul 5.1

Date despre liniile de *Brassica napus* luate în studiu

Nr. Crt.	Denumire cultivar	Tara de origine	Codificare
-0-	-1-	-2-	-3-
1.	Libritta	Germania	CGN17350
2.	Skriverskii	Lituania	CGN17310

Continuare tabel 5.1

-0-	-1-	-2-	-3-
3.	Brassica napus group 1	Ucraina	CGN17311
4.	Kievskii 216	Ucraina	CGN17312
5.	Kievskii 18	Ucraina	CGN17313
6.	Kombi	Ucraina	CGN17314
7.	SKR. II Kormovoi	Lituania	CGN17315
8.	Uspekh	Ucraina	CGN17316
9.	Blagodatnyi	Ucraina	CGN17317
10.	Fedorovskii	Ucraina	CGN17318
11.	Snityskii	Ucraina	CGN17319
12.	Diana	Germania	CGN17320
13.	Ksaverovskii	Ucraina	CGN17321
14.	Kodakskii	Ucraina	CGN17322
15.	Lictor	Germania	CGN17351
16.	Liglandor	Germania	CGN17352
17.	Ligora	Germania	CGN17353
18.	Lindora	Germania	CGN17354
19.	Lingot	Franta	CGN17355
20.	Link	-	CGN17356
21.	Liquanta	Germania	CGN17357
22.	Lirabon	Germania	CGN17358
23.	Lirajet	Germania	CGN17359
24.	Lirakotta	Germania	CGN17360
25.	Lirama	Germania	CGN17361
26.	Lirastern	Germania	CGN17362
27.	Lirektor	Germania	CGN17363
28.	Liropa	Germania	CGN17364
29.	Madora	Germania	CGN17365
30.	Maras	Polonia	CGN17367
31.	Marens	Franta	CGN17368
32.	Marex	Germania	CGN17369
33.	Matador	Suedia	CGN17370
34.	Mirander	Germania	CGN17371
35.	Niederarnbacher	Germania	CGN17372
36.	Norli	Germania	CGN17373
37.	Octavia	-	CGN17383

Continuare tabel 5.1

-0-	-1-	-2-	-3-
38.	Olimpiade	Italia	CGN17374
39.	Olymp	Germania	CGN17375
40.	Panter	Suedia	CGN17377
41.	Perle	Germania	CGN17379
42.	Andol	Franta	CGN18948
43.	Arabella	Germania	CGN18950
44.	Bienvenu	Franta	CGN18955
45.	Brilland	Polonia	CGN18956
46.	Bristol	Franta	CGN18957
47.	Buko	-	CGN18958
48.	Capricorn	Marea Britanie	CGN18959
49.	Cobra	Germania	CGN18960
50.	Collo	Germania	CGN18961
51.	Planet	Germania	CGN17380
52.	Prominj	Rusia	CGN17381
53.	Ridana	Germania	CGN18974
54.	Samourai	Franta	CGN18975
55.	Score	Marea Britanie	CGN18976
56.	Silesia	Cehoslovacia	CGN18977
57.	Silvia	Germania	CGN19951
58.	Sollux	Germania	CGN19952
59.	Susana	Germania	CGN19953
60.	Tamara	Germania	CGN19955
61.	Tapidor	Franta	CGN19956
62.	Tor	Suedia	CGN19957
63.	Veronika	Germania	CGN19959
64.	*Brassica napus* group 2	Ucraina	CGN17300
65.	*Brassica napus* group 3	Republica Moldova	CGN17301
66.	*Brassica napus* group 4	Ucraina	CGN17302
67.	*Brassica napus* group 5	Lituania	CGN17303
68.	*Brassica napus* group 6	Lituania	CGN17304
69.	Shen-Li Jutsaj	China	CGN17305
70.	*Brassica napus* group 7	China	CGN17306
71.	*Brassica napus* group 8	Ucraina	CGN17307
72.	Diadem	Germania	CGN18965

Continuare tabel 5.1

-0-	-1-	-2-	-3-
73.	Diamant	Germania	CGN18966
74.	Doral	Germania	CGN18967
75.	Doublol	Germania	CGN18968
76.	Eka	Germania	CGN18969
77.	Elena	Germania	CGN18970
78.	Elvira	Germania	CGN18971
79.	Erra	Germania	CGN18972
80.	Enrol	Franta	CGN18973
81.	Falcon	Germania	CGN17323
82.	Fertodi	Ungaria	CGN17324
83.	Fiona	Germania	CGN17325
84.	Gesunder	Germania	CGN17326
85.	Girita	Germania	CGN17327
86.	Glacier	Germania	CGN17328
87.	Gundula	Germania	CGN17329
88.	Hambourg	Franta	CGN17330
89.	Hambourger	-	CGN17331
90.	Heimer	Suedia	CGN17332
91.	Herkules	Suedia	CGN17333
92.	Hunnia	-	CGN17334
93.	Jade	-	CGN17335
94.	Janetzkis	Austria	CGN17336
95.	Jupiter	Suedia	CGN17337
96.	Kurander	Germania	CGN17338
97.	Lecor	-	CGN17339
98.	Ledos	Germania	CGN17340
99.	Lesira	Germania	CGN17342
100.	Lester	Germania	CGN17343
101.	Libelle	Germania	CGN17344
102.	Liberator	Germania	CGN17345
103.	Kombainer	Ucraina	CGN17308
104.	Liborius	Germania	CGN17346
105.	Librador	Germania	CGN17347
106.	Libraska	Germania	CGN17348

Continuare tabel 5.1

-0-	-1-	-2-	-3-
107.	Libravo	Germania	CGN17349
108.	Cascade	SUA	CGN13914
109.	Bridger	SUA	CGN13915
110.	Kromerska	Fosta Cehoslovacia	CGN06869
111.	Slapska	Fosta Cehoslovacia	CGN06870
112.	Mestnji	Rusia	CGN06871
113.	Trebieckska Krajova	Fosta Cehoslovacia	CGN06872
114.	Niemierczanski	Rusia	CGN06874
115.	Jet Neuf	Franţa	CGN07227
116.	Rafal	Franţa	CGN07228
117.	Expander	Germania	CGN13912
118.	Mansholts Hamburger	Olanda	CGN11012
119.	Primor	Olanda	CGN11013
120.	R-33	Franţa	CGN11014
121.	Rapol	Franţa	CGN13913
122.	Dublianski	Rusia	CGN06877
123.	Vinnickij 21	Ucraina	CGN06879
124.	Mytnickij	Ucraina	CGN06880
125.	Vinnickij 15/59	Ucraina	CGN06881
126.	Nemercanskij I	Ucraina	CGN6882
127.	Nemercanskij 2268	Uncraina	CGN06883
128.	Podol'skij Mestnij	Ucraina	CGN06884
129.	Skziverskij	Lituania	CGN06885
130.	Brassica napus group 9	Ucraina	CGN06886

5.3. Metode de cercetare în câmp

Pentru realizarea obiectivelor de cercetare, în primă fază am realizat o evaluare a materialului biologic luat în studiu, prin determinarea principalelor caractere morfologice importante pentru rapiţă.

Evaluarea morfologică acelor 130 de cultivare de rapiţă luate în studiu a fost necesară deoarece, la aceste cultivare descrierea morfologică nu a fost disponibilă, iar aceste caractere, corelate cu evaluarea genotipică ar putea fi utilizate ulterior în procesele de selecţie.

Pentru caracterizarea morfologică a celor 130 de cultivare de rapiţă, plantele au fost semănate în câmp, în anul agricol 2010-2011 la SCDA Secuieni. Experienţa a fost realizată în blocuri randomizate în trei repetiţii pentru a permite interpretarea rezultatelor prin analiza varianţei.

În timpul perioadei de vegetaţie s-au făcut observaţii pentru a determina următoarele caractere morfologice:

- Înălţimea plantelor;
- Numărul mediu de silicve pe plantă;
- Numărul de ramificaţii;
- Masa a 1000 de boabe.

Determinarea înălţimii plantelor s-a realizat în câmp, în luna iunie când plantele de rapiţă erau înflorite complet. Pentru realizarea acesteia, de la fiecare cultivar şi repetiţie în parte s-au măsurat câte 10 plante, de la nivelul solului până la vârf.

O dată cu măsurarea înălţimii plantelor, pentru fiecare repetiţie şi cultivar s-au determinat şi numărul de ramificaţii.

Numărul de silicve şi MMB au fost numărate în laborator la sfârşitul perioadei de vegetaţie, înainte de recoltat, prin prelevarea silicvelor a 10 plante de la fiecare cultivar şi fiecare repetiţie în parte şi analizarea acestora în laborator.

Astfel, pentru fiecare cultivar s-au numărat silicvele de la fiecare plantă şi repetiţie, iar determinarea MMB s-a realizat prin cântărirea seminţelor la balanţa analitică.

Determinările biometrice asupra caracterelor morfologice (înălţimea plantelor, numărul de silicve pe plantă, numărul de ramificaţii pe plantă şi MMB) s-au efectuat în trei repetiţii, pentru ca rezultatele să poată fi prelucrate statistic prin analiza varianţei (Săulescu şi colab., 1967; Leonte, 1997). Semnificaţiile diferenţelor dintre variantele analizate şi martor (media experienţei) s-au determinat şi interpretat cu ajutorul metodei diferenţelor limită (Dl 5%, Dl 1% şi Dl 0,1%).

5.4. Metode de cercetare în laborator

5.4.1 Izolarea ADN genomial

Pentru realizarea analizelor de genetică moleculară a fost necesară, în primul rând extragerea de ADN genomic. Pentru realizarea acestui lucru, s-au folosit frunze tinere de la fiecare linie de rapiţă, ce au fost recoltate din câmp, în eprubete de 50 ml de tip Falcon. Pentru fiecare linie în parte, de la o singură plantă, s-au prelevat câte 4-5 frunze tinere care au fost introduse imediat în eprubetă şi îngheţate rapid în azot lichid.

Varianta de extragere a ADN pe care am utilizat-o a fost metoda CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) modificată de către Doyle şi Doyle în anul 1987.

Etapele de lucru au fost:

· Mojararea materialului vegetal cu azot lichid într-un mojar cu pistil foarte bine spălat în prealabil şi flambat;

· Cântărirea a 200 mg din pudra obţinută prin mojarare şi transferarea acesteia în tuburi de 1,5 ml;

· Adăugarea a 700µl soluţie de extracţie D&D[1] peste materialul vegetal şi incubarea acestuia timp de 30 minute la 65^{o}C;

· La 30 de minute de la incubare, s-a adăugat o cantitate de 600 µl CIA[2], după care a urmat o agitare uşoară timp de 5 minute;

[1] soluţia D&D conţine 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 20mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 1% NA2S2O5, H2O, toate autoclavate şi 0,2% -Mercaptoetanol.

· După ce amestecul a fost agitat, s-a centrifugat timp de 10 minute la 10.000 rpm (4 ^{o}C);

· Faza lichidă a fost extrasă cu ajutorul unei pipete, iar peste aceasta s-a adăugat din nou 600 µl CIA urmată de agitare uşoară timp 5 minute (figura 5.4);

· Amestecul s-a centrifugat din nou timp de 10 minute la 10.000 rpm (4 ^{o}C);

· Faza lichidă s-a transvazat în eprubete noi (preinscripţionate), iar peste lichidul rezultat s-a adăugat 60 µl CH_3COONH_4 (acetat de amoniu - 10 M) şi 50 µl CH_3COONa (acetat de sodiu - 3M, pH 5,5);

· Pentru pecipitarea ADN, s-au adăugat 2/3 din volum 2-izopropanol şi s-a agitat uşor;

· Eprubetele s-au centrifugat apoi timp de 10 minute la 10.000 rpm, pentru ca ADN să se depună la baza eprubetei;

· Partea lichidă s-a eliminat cu ajutorul unei pipete, iar pentru spălarea ADN s-a pipetat soluţie de etanol 70% cu 10 mM acetat de amoniu;

· Minieprubetele s-au uscat (deschise) într-un termostat la 37^{o}C, până ce alcoolul s-a evaporat complet;

· ADN s-a rediluat în 200 µl soluţie TE buffer[3].

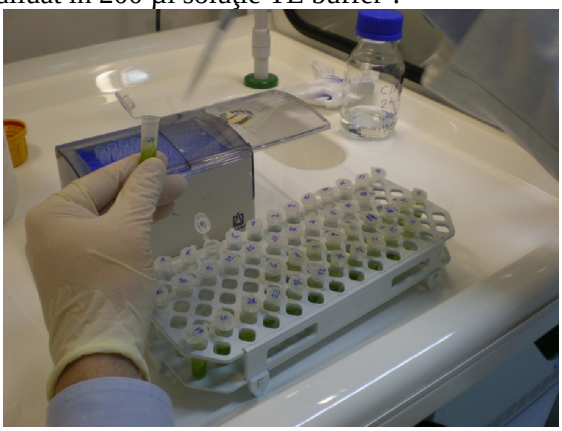


Figura 5.4 Extragerea ADN din frunze de rapiţă

5.4.2 Determinarea cantităţii şi purităţii ADN izolat

Determinarea concentraţiei de ADN şi a purităţii acestuia s-a făcut cu ajutorul spectofotometrului NanoDrop ND2000. Pentru ca reacţia PCR să dea cele mai bune rezultate un rol important îl are concentraţia şi puritatea ADN extras.

Pentru determinarea concentraţiei şi purităţii ADN se pot utiliza două metode:

a) Metoda directă de determinare care presupune măsurarea concentraţiei de ADN direct în soluţii apoase, diluate sau nediluate, prin înregistrarea absorbţiei la o anumită lungime de undă în spectru ultraviolet.

b) Metoda indirectă presupune migrarea probelor de ADN extrase în geluri de agaroză alături de un marker molecular de concentraţie cunoscută şi vizualizarea acestora prin colorare cu bromura de etidium (Querci, 2006).

---

[2] **soluţia CIA (24:1) conţine 24 părţi cloroform şi o parte isoamilalcool.**

[3] TE conţine 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

Principiul determinării concentraţiei de ADN prin metoda spectofotometrică

Principiul de funcţionare al spectofotometrului este transmisia luminii cu o lungime de undă cunoscută în soluţia în care se află molecula de interes. Molecula de ADN are proprietatea de a absorbi lumina violetă, astfel în momentul în care proba este măsurată, concentraţia acesteia este determinată de diferenţa dintre cantitatea de lumină transmisă înspre probă şi lumina care se recepţionează la ieşire cu ajutorul unei fotocelule (Querci, 2006).

Concentraţia acizilor nucleici este determinată prin măsurarea soluţiei la o lungime de undă de 260 nm prin comparaţie cu o probă blank (figura 5.5).

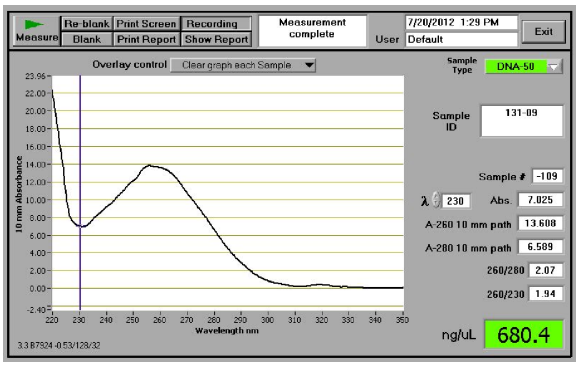


Figura 5.5 Determinarea concentraţiei de ADN cu ajutorul NanoDrop 2000

Cu ajutorul spectofotometrului se poate determina atât concentraţia de ADN cât şi puritatea acestuia. Este cunoscut faptul că soluţiile de ADN prezintă absorbţie maximă la lungimea de undă de 260 nm, iar soluţiile proteice la 280 nm (Querci, 2006).

Datorită faptului că soluţiie de ADN absorb parţial lumina la lungime de 280 nm, iar soluţiile proteice la 260, puritatea soluţiei de ADN poate fi estimată prin raportul dintre citirile la 260 nm şi 280 nm (*A260/A280*).

În urma extragerii ADN din probele de rapiţă, s-a măsurat concentraţia şi puritatea acestuia cu ajutorul spectofotometrului NanoDrop 2000.

În urma citirilor concentraţiilor de ADN extras de la cele 130 de cultivare de rapiţă s-au obţinut valori ale concentraţiilor între 137,87 ng/µl şi 1373,77 ng/µl. Cantitatea de ADN obţinută a fost suficientă pentru realizarea analizelor RAPD şi SSR.

Ø **Metoda PCR**

Tehnica PCR sau reacţia în lanţ a polimerazei, dezvoltată la mijlocul anilor ’80, a revoluţionat genetica moleculară, făcând posibilă studierea şi analizarea genomului plantelor prin metode mai accesibile şi mai simple. Această tehnică a fost pusă la punct de Kary Mullis în anul 1983, plecând de la caracteristicile replicării ADN, cu ajutorul enzimei ADN polimeraza care utilizează o catenă a ADN ca matriţă pentru sinteza unei noi catene complementare. Prin această tehnică se produc un număr mare de copii a unor secvenţe de ADN (gene) fără a se apela la clonare.

Amplificarea fragmentelor de ADN, se realizează pe baza unei secvenţe de oligonucleotide, numită primer specific care se află în soluţia de reacţie. Primerii sunt secvenţe scurte de 15 – 35 nucleotide, complementare capetelor 3’ ale secvenţei de ADN ce se doreşte a fi amplificată; ei sunt specifici fiecărei gene şi sunt sintetizaţi cu ajutorul unor sintetizatoare automate de ADN.

Principiul metodei este următorul: pentru realizarea amplificării, într-o eprubetă specială de 200 µl se realizează un amestec alcătuit din:

· ADN genomic care conţine secvenţa ţintă care trebuie amplificată;

· 2 primeri – secvenţele complementare a fragmentului ţintă care trebuie amplificat.

· Taq polimerază – este o enzimă care contribuie la amplificarea fragmentului ţintă;

· dNTP (dezoxinucleotid trifosfaţi) – dATP, dGTP, dCTP şi dTTP;

· Diverşi cationi: ioni de Mg, sau Mn;

· Tampon de reacţie.

Reacţia PCR se realizează in tuburi mici (0,2-0,5 ml) iar volumul reacţiei de 15-100 µl se introduce într-un aparat în care realizarea ciclurilor termice este controlată automat (termocycler). Acesta este un aparat care încălzeşte sau răceşte tubul cu reacţie până la temperatura cerută de fiecare pas al reacţiei.

Tuburile sunt, în general, construite cu pereţi subţiri care au conductibilitate termică favorabilă pentru a se face rapid echilibrarea termică. Cele mai multe aparate au capace care se încălzesc pentru a preveni condensarea de pe capacele tuburilor de reacţie. În mod normal reacţia PCR are nevoie de o serie de 20-40 de cicluri, iar fiecare ciclu în parte are 2-3 trepte de temperatură.

1. *Faza de denaturare* – în această fază, amestecul de reacţie este încălzit la 94-96^0 C şi menţinut la această temperatură timp de 1-9 minute. În această fază ADN este supus procesului de denaturare care constă în distrugerea punţilor de hidrogen dintre cele două lanţuri de nucleotide. Astfel dintr-o secvenţă de ADN dublu-catenar vor rezulta 2 secvenţe de ADN monocatenare;
2. *Ataşarea primerilor se* realizează prin răcirea la 40 - 60 ^{0}C a soluţiei în care se află ADN de amplificat. În această etapă, primerii recunosc pe ADN genomic capetele de la secvenţa complementară şi se ataşează la capetele 3’ ale celor două catene de ADN ale genei pe care dorim să o amplificăm. Scăderea temperaturii determină activarea enzimei polimerază.
3. *Etapa de elongare* – temperatura ajunge undeva între 70-74 ^{0}C. În acestă fază polimeraza determină ataşarea dNTP la secvenţa complementară de ADN genomic între capetele recunoscute de cei doi primeri. Taq polimeraza funcţionează optim, în faza de extensie. Ciclul se repetă de 25 – 40 ori. Amplificarea este exponenţială, după 3 cicluri realizându-se 2 cópii, după 10 cicluri 256 cópii, iar după 32 cicluri 1,73 miliarde cópii ale secvenţei supuse amplificării.

5.4.3 Analiza RAPD

Pentru realizarea reacţiei PCR, în primă fază s-au adus probele la o concentraţie de 5 ng/µl. Amestecul de reacţie (pentru o singură variantă) pentru PCR destinat obţinerii RAPD a fost: 5 ng ADN genomic; 10 mM din fiecare dNTP; 10 X PCR Buffer; 25 mM $MgCl_2$; Apă ultrapură şi 10 U/µl Taq ADN Polimerază.

Pentru realizarea analizelor RAPD în vederea evaluării genetice a celor 130 de cultivare de rapiţă luate în studiu, am utilizat un număr de 20 de markeri RAPD proveniţi de la firma ROTH (tabelul 5.2).

Tabelul 5.2

Secven a primerilor RAPD utiliza i

Nr Crt.	Denumire primer	Secventa la capetele 3` şi 5`
1	ROTH A07	GAA ACG GGT G
2	ROTH A08	GTG ACG TAG G
3	ROTH A09	GGG TAA CGC C
4	ROTH A10	GTG ATC GCA G
5	ROTH A13	CAG CAC CCA C
6	ROTH A17	GAC CGC TTG T
7	ROTH A18	AGG TGA CCC T
8	ROTH B04	GGA CTG GAG T
9	ROTH B06	TGC TCT GCC C
10	ROTH B07	GGT GAC GCA G
11	ROTH B08	GTC CAC ACG G
12	ROTH B10	CTG CTG GGA C
13	ROTH B11	GTA GAC CCG T
14	ROTH B18	CCA CAG CAG T
15	ROTH C07	GTC CCG ACG A
16	ROTH C10	TGT CTG GGT G
17	ROTH C12	TGT CAT CCC C
17	ROTH C14	TGC GTG CTT G
18.	ROTH C18	TGA GTG GGT G
19	ROTH C20	ACT TCG CCA C
20	ROTH C06	GAA GCG ACT C

Modul de lucru a fost următorul:

Eprubetele de 1,5 ml în care se aflau probele de ADN cu concentraţie de 5 ng/µl şi componentele necesare amestecului de reacţie cu excepţia polimerazei s-au scos la decongelat. Termociclerul s-a pornit în prealabil şi s-a programat pentru a ajunge la temperatura necesară de lucru până la finalizarea amestecului PCR.

Într-o placă PCR s-au pipetat câte 5 µl de ADN de concentraţie de 5 ng. Amestecul de reacţie s-a realizat separat într-o eprubetă de 2 ml, în care s-a pipetat pe rând componentele amestecului de reacţie în următoarea ordine: primer, dNTP, PCR Buffer, $MgCl_2$ şi apă (tabelul 5.3).

Polimeraza s-a scos din congelator la final şi s-a pipetat ultima în amestecul de reacţie după care, acesta s-a agitat uşor şi s-a centrifugat. Câte 15 µl s-a pipetat în placa PCR, după care s-a introdus în termocicler şi s-a pornit programul specific pentru RAPD.

Tabelul 5.3

Cantităţile de substanţă folosite pentru realizarea amestecului RAPD la rapiţă

Denumire substanţă	Cantitate µl/o probă
Primer	1,5 µl
dNTP	1,0 µl
10 xPCR Buffer	2,0 µl
$MgCl_2$	4,8 µl
Apă	5,6 µl
Taq	0,1 µl

Condiţiile de realizare a amplificării PCR pentru RAPD

Pentru realizarea reacţiei PCR, probele s-au împărţit în două plăci astfel pentru amplificare au fost utilizate două termociclere: unul Palm Cycler Corbett şi unul Eppendorf Mastercycler. Condiţiile în care s-a efectuat amplificarea au fost:

- După o perioadă de 4 minute la o temperatură de 94^0 C în care s-a realizat denaturarea ADN au urmat 45 de cicluri cu următoarele etape:
  - Denaturare: 1 min la 94^0C;
  - Ataşarea primerilor: 1 min la 36^0C;
  - Extensia: 2 min la 72^0C;
- După finalizarea acestor cicluri, probele se răcesc la temperatura de 4 grade. Păstrarea probelor se face în congelator la -20^0C.

Separarea produşilor PCR pentru RAPD

Produşii PCR ob inu i au fost separa i în gel de agaroză de concentra ie 2%. Pentru separarea fragmentelor PCR ob inute în gel de agaroză se efectuează următoarele opera ii:

- Prepararea gelului de agaroză;
- Prepararea probelor amplificate şi încărcarea lor pe gel;
- Electroforeza.

Pregătirea gelului de agaroză a constat în:

- Pregătirea suportului de gel – cuva în care s-a turnat gelul s-a curăţat bine cu etanol de 96 %. În acelaşi timp s-a pregătit pieptenele care va forma alveolele necesare.
- La o balan ă tehnică, într-un pahar Erlenmayer de 500 ml s-au cântărit 6 gr de agaroză, peste care s-au adăugat 300 ml de TBE Buffer de concentra ie 1 %. Soluţia s-a fiert apoi într-un cuptor cu microunde până ce pura de agaroză s-a dizolvat complet.
- Gelul s-a răcit în apă, prin agitare continuă până la temperatura de 55^0C.
- Când acesta s-a răcit suficient, s-a turnat în suportul special şi s-a introdus pieptenele;
- Pentru întărire, s-a ţinut la temperatura camerei 30 de minute;
- După întărirea acestuia, s-au îndepărtat dinţii şi s-a introdus în cuva de electroforeză în soluţie de electrolit

- **Pregătirea ADN amplificat**

După terminarea programului de amplificare, probele au fost scoase din termocicler şi pregătite pentru migrarea pe gel de agaroză. Pregătirea acestora pentru migrare a constat în adăugarea a 5 µl de solu ie de colorare, agitarea energică a acestora şi centrifugarea uşoară.

Din solu ia astfel realizată, s-au utilizat câte 10 µl pentru fiecare variantă, cantitate care a fost introdusă în alveolele gelului prin pipetare. La capetele gelului s-a încărcat 1,2 µl dintr-o solu ie standard de 100 bp. După încărcarea tuturor probelor, instalaţia s-a cuplat la tensiunea de 150 de vol i timp de aproximativ 3 ore.

- **Ob inerea imaginilor**

După aproximativ 3 ore, gelul s-a trecut de pe suportul acestuia în soluţie de bromură de etidium de concentra ie 2 µg/ml în vederea colorării fragmentelor de ADN rezultate în urma amplificării. Durata acestei operaţii a fost de 15 minute.
Pentru fotografiere, acesta s-a aşezat pe un transiluminator cu radia ii ultraviolete de o lungime de undă de 254 nm. Cu ajutorul aparatului de fotografiat, s-au obţinut imaginile aferente fiecărui gel în parte (figura 5.7).

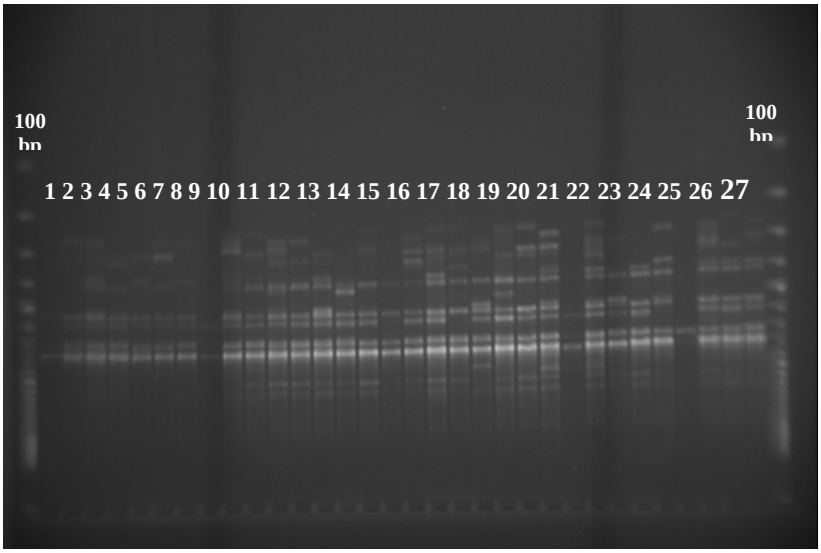


Figura 5.7. Imaginea fragmentelor obţinute prin amplificarea cu markerul ROTH B04

- **Analiza imaginilor rezultate**

Analiza imaginilor s-a făcut cu ajutorul programului RFLP scan 2.1. La analiză s-au luat în considerare doar acele fragmente clare şi care nu ridicau nici un semn de întrebare în ceea ce priveşte prezen a sau absen a lor. Toleran a admisă de noi a fost de 0,3 %.

În func ie de lungimea fragmentelor de ADN calculată de către program şi de toleran a admisă sunt stabilite numărul de fragmente cu lungimi diferite existente într-o imagine.

S-a pornit de la premiza că fiecare bandă de lungimi diferite prezintă un singur locus.

Datele rapoartelor furnizate de programul RFLPscan s-au preluat cu programul EXCEL fiind apoi prelucrate cu ajutorul programului NTSYS-pc 1.7.

Prelucrarea datelor a constat în determinarea similarită ii genetice dintre fiecare variante cu ajutorul coeficientului Dice (1945).

- **Prelucrarea informa iilor ob inute din analiza imaginilor**

Prelucrarea informa iilor ob inute din analiza imaginilor s-a făcut cu ajutorul programului NTSYS-pc 1.7.

Denumirea programul **NTSYS-pc 1.7** (Rohlf, 1992) provine de la **N**umerical **T**axonomy **SYS**tem. poate fi utilizat atât în prelucrarea informa iilor legate de morfologia unor grupuri de indivizi cât și în studiile de filogenie.

Gruparea variantelor pe grupe înrudite genetic (cluster analyses) a fost realizată utilizând acest program, folosind ca variabile **coeficientul de similaritate genetică** și **UPGMA** (unweighted pair-group method arithmetic average).

Metoda UPGMA (SAHN clustering) a fost aleasă deoarece dintre toate celelalte metode similare eviden iază cel mai bine grupările (clusters) existente (Milligan, 1980).

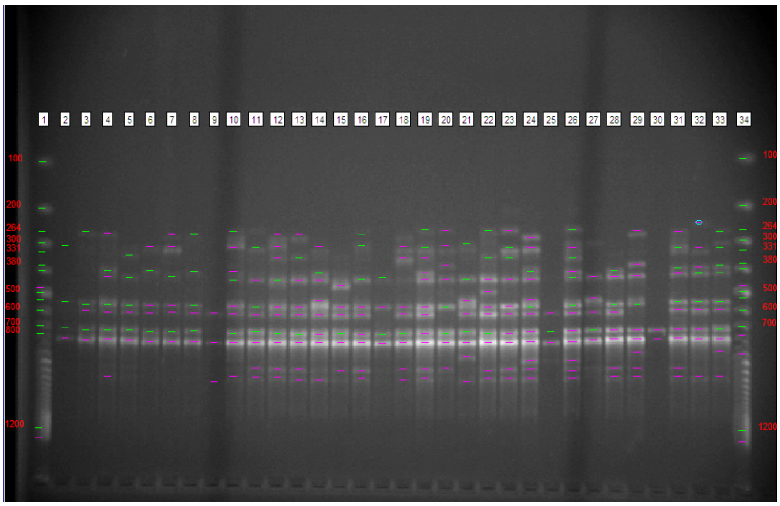


Figura 5.8. Analizarea imaginii obţinute cu primerul B10 programul RFLPscan

5.4.4. Analiza SSR

Cercetările privind analiza SSR s-au efectuat în cadrul laboratorului de Ameliorarea plantelor de la Universitatea Justus von Liebig, Giessen, Germania. Pentru realizarea analizei SSR, probele de ADN s-au adus la o concentraţie de 10 ng/µl. Amestecul de reacţie pentru PCR destinat obţinerii SSR este prezentat în tabelul 5.4.

Modalitatea de lucru în cazul realizării amestecului PCR dentinat analizei SSR a fost asemănător cu cel prezentat la analiza RAPD.

Tabelul 5.4

Cantităţile de substanţă folosite pentru realizarea amestecului SSR la rapiţă

Substanţa	Concentraţia	Volum o probă
Apă ultrapură		4,1 µl
10 X PCR Buffer		1 µl
dNTP	10 mM	0,2 µl
$MgCl_2$	25 mM	0,4 µl
Forward primer	5 pmol/ µl	0,1 µl
Reverse primer	5 pmol/ µl	0,1 µl
M13-IRD primer	10 pmol/ µl	0,05 µl
Taq ADN Polimerază	5 U µl	0,05 µl
ADN genomic	10 ng/ µl	4 µl

Condiţiile de realizare a amplificării PCR pentru SSR

Pentru realizarea reacţiei PCR, probele s-au împărţit în două plăci, astfel pentru amplificare au fost utilizate două termociclere de la firma Applied Biosystem. Programul de amplificare pentru reacţia SSR a fost de tip touch down PCR.

Această tehnică de amplificare este o metodă PCR prin care se elimină probabilitatea markerilor de a amplifica secvenţe nespecifice.

Metoda are la bază utilizarea celei mai mari temperaturi de ataşare a primerilor, în primul ciclu al reacţiei, urmată apoi de scăderea acesteia la fiecare ciclu cu câte 2^0C. Prin scăderea temperaturii de ataşare, scade şi probabilitatea amplificare a secvenţelor nespecifice. Pentru realizarea SSR, am utilizat un număr de 51 markeri SSR de unde au rezultat un număr de 139 fragmente polimorfice.

Condiţiile în care s-a realizat amplificarea au fost:

Tabelul 5.5

Condiţiile de amplicare în cazul analizei SSR

Numărul de cicluri	Durata	Temperatura	Observaţii
1	2 min	95^0C	Denaturare iniţială
5	45 sec 4 min 1 min	95^0C 60-68^0C 72^0C	Cu fiecare ciclu temperatura se scade cu 2^0C
5	45 sec 5 min 1 min	95^0C 58-50^0C 72^0C	Cu fiecare ciclu temperatura se scade cu 2^0C
27	45 sec 30 sec 1 min	95^0C 47^0C 72^0C	
1	10 min	72^0C	

Separarea produşilor PCR pentru SSR

Separarea produşilor rezultaţi în urma amplificării SSR s-a realizat în gel de poliacrilamidă pe un sistem de tip LICOR 4200. Înainte de pregătirea gelului de poliacrilamidă, s-a pregătit în prealabil suportul de sticlă, în care acesta a fost turnat.

Plăcile de sticlă s-au spălat foarte bine cu alcool etilic 70% şi apoi au fost clătite cu apă distilată pentru îndepărtarea urmelor de murărie sau alte impurităţi. După spălarea acestora, am procedat la montarea suportului în care a fost turnat gelul. Suportul de gel este format din cele două plăci de sticlă ce sunt aşezate una peste alta, distanţate de un spacer de 0,2 mm şi prinse în lateral cu niste suporţi speciali.

Pentru realizarea unui gel de poliacrilamidă de concentraţie 7% au fost necesare:

- 20 ml soluţie PAA[4] de 7 %;
- 13,5 ml TEMED;
- 135 ml APS 10%;

Prepararea gelului de poliacrilamidă s-a făcut separat într-un pahar Berzelius de 50 ml, în care s-au amestecat rapid componentele de mai sus, după care, amestecul a fost turnat între plăcile de sticlă, în aşa fel încât să se obţină o linie continuă de curgere a lichidului între acestea.

Este foarte important ca gelul să fie turnat cât mai repede şi cât mai uniform pentru a nu se forma bule de aer în gel, iar în cazul în care acestea s-au format se elimină cât mai rapid folosind o ansă metalică specială pentru acest scop.

După turnarea gelului, acesta s-a lăsat la întărit timp de o oră. După expirarea timpului, suportul şi plăcile s-au curăţat de resturile de gel cu un şerveţel cu apă distilată, acordându-se o atenţie deosebită zonei în care se face "citirea" de către fascicolele laser (zonă aflată în partea inferioară a gelului, la 5-7 cm de bază). După această operaţie, suportul cu plăcile de sticlă şi gelul au fost montate în aparat, adăugându-se soluţia de electroforeză (1.0 x TBE Buffer)[5][6] şi făcându-se conexiunile electrice necesare.

Pentru a uşura încărcarea probelor, în spatele gelului a fost intodusă o folie de aluminiu care reflectă lumina. Locul în care s-au încărcat probele s-au spălat atent cu buffer folosind o pipetă de 1000 µl pentru a se îndepărta toate resturile de gel din interior. După spălare s-a introdus pieptenul între cele două plăci de sticlă în care se află gelul cu atenţie ca vârfurile dinţilor să nu intre mai mult de 1 mm în gel. Grosimea pieptenului care se introduce în gel este de 2 mm, iar numărul de probe care pot fi încărcate este de 47 probe.

Setarea aparatului (LI-COR DNA Gene Readir 4200) pentru începerea electroforezei a constat în calibrarea fascicolelor laser, pregătirea fişierelor în care se înmagazinează informaţiile obţinute, aducerea temperaturii si a tensiunii de lucru la valorile dorite.

---

[4] preparată anterior din Long Ranger 50% - 16 ml, uree (USB) - 42 g, soluţie Long Run (1.0xTBE) - 10 ml şi apă dublu distilată până la 100 ml, toate amestecate şi filtrate

[5] o sticlă de un litru după care se lasă la dizolvat pe agitatorul magnetic. După dizolvare se aduce soluţia la un pH-ul de 8,3.

[6] *Soluţia de TBE Buffer* este realizată din Tris Base - 162g (1340 mM), Acid boric – 27,5g (450 mM), EDTA - 9,3 g (25 mM) şi apă dublu distilată. Acestea se amestecă într-o sticlă de un litru după care se lasă la dizolvat pe agitatorul magnetic. După dizolvare se aduce soluţia la un pH-ul de 8,3

Toată această pregătire a aparatului durează aproximativ 30 minute (din care 20 minute preîncălzirea). Condiţiile în care s-a realizat electroforeza au fost U=1500 V, P=40 W, I=40 mA şi T=48^{o}C.

- ***Pregătirea probelor pentru încărcarea pe gel:***

După ce probele au fost scoase de la amplificat, pentru încărcarea lor pe gelul de acrilamidă a fost necesară colorarea. Colorarea probelor s-a realizat cu o soluţie de fuxină care conţinea 95% formamidă, 10 mM EDTA pH 8 şi 0,1% fuxină basică.

Peste fiecare probă s-a adăugat un volum de 10 µl fuxină după care s-au agitat şi centrifugat. Înainte de încărcarea acestora pe gel, probele au fost supuse unui proces de denaturare la o temperatură de 95^{0}C timp de 5 minute după care au fost răcite imediat pe gheaţă.

“Încărcarea” probelor s-a făcut de la stânga la dreapta, probele fiind dispuse în ordinea stabilită, care a fost aceeaşi pentru toate gelurile. După încărcarea tuturor probelor, la capetele gelului s-a utilizat standardul (o soluţie care determina formarea de benzi clare de dimensiuni cunoscute).

Soluţia standard utilizată de noi a determinat formarea de benzi distincte şi clare formate din ADN cu dimensiunile: 50, 100, 145, 200, 204, 255, 300, 350, 364, 400, 460, 495, 500, 530, 565, 600, 650, 700 perechi de baze.

După terminarea gelului de încărcat s-a pornit electroforeza, iar după aproximativ 2 ore fragmentele s-au vizualizat pe calculator (figura 5.9). Un gel poate fi încărcat de maxim 4 ori. Fişierele rezultate în urma migrărilor se salvează în format „tiff” pe calculator.

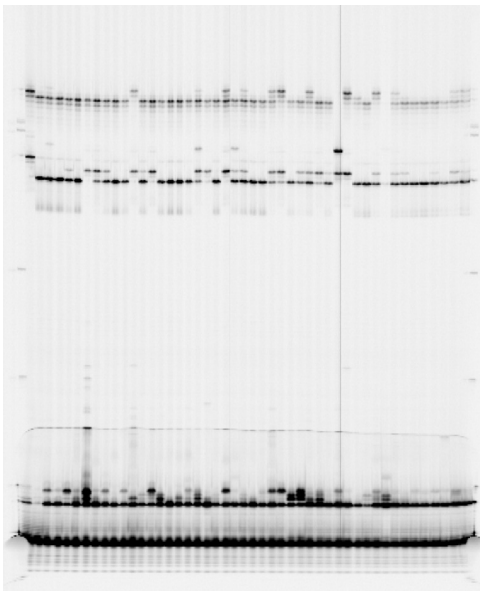


Figura 5.9 Imagine SSR obţinută în urma migrării primerului CB 10536 în gel de poliacrilamidă

- **Analiza imaginilor rezultate**

Analiza imaginilor rezultate s-a făcut cu ajutorul programul SAGA generation software versiunea 3. Interpretarea fragmentelor s-a făcut manual, luându-se doar în considerare acele fragmente clare şi care nu ridicau nici un semn de întrebare în ceea ce priveşte prezen a sau absen a lor.

Pentru cartarea fragmentelor s-a pronit de la premiza că fiecare bandă reprezintă un locus. Astfel, fiecare bandă prezentă s-a notat cu „1”, iar lipsa benzii s-a notat cu „0”. Datele au fost centralizate în programul Excel, iar pentru realizarea hărţii genetice şi calcularea QTL s-a utilizat programul JOINMAP versiunea 3.

5.5. Metoda de lucru utilizată pentru realizarea infecţiei artificiale a rapiţei cu *Verticillium longisporum*

5.5.1 Pregătirea materialului vegetal

Identificarea cultivarelor de rapiţă rezistente/tolerante la atacul agentului patogen, s-a realizat prin infectarea acestora în mod artificial cu agentul patogen *Verticillium longisporum*.

Cercetările privind testarea celor 130 de cultivare luate în studiu, s-au realizat în cadrul Laboratorului de Fitopatologie şi Protecţia Plantelor de la Universitatea Georg August din Goettingen, Germania.

Pentru realizarea infecţiei artificiale, am utilizat protocolul descris de Eynck în anul 2007.

Deoarece materialul biologic folosit era alcătuit dintr-un număr mare de cultivare, iar spaţiul în seră era limitat, infecţia s-a realizat eşalonat în trei etape, în fiecare etapă utilizându-se aproximativ 40 de cultivare. Condiţiile de infecţie au fost aceleaşi în fiecare etapă în parte.

Pentru testarea liniilor în ceea ce priveşte rezistenţa la atacul agentului patogen *V. longisporum* s-au utilizat plăntuţe de rapiţă, în faza de creştere dicotiledonală (10 zile de la răsărire).

Pentru obţinerea materialului vegetal s-a procedat astfel:

· La fiecare linie în parte s-au luat aproximativ 40 de seminţe care au fost sterilizate în prealabil timp de 2 minute în soluţie de etanol 70% şi cătite apoi în apă distilată sterilă.

Sterilizarea acestora s-a realizat în laborator (figura 5.10), cu scopul de a se elimina posibilii agenţi patogeni existenţi la suprafaţa seminţei.

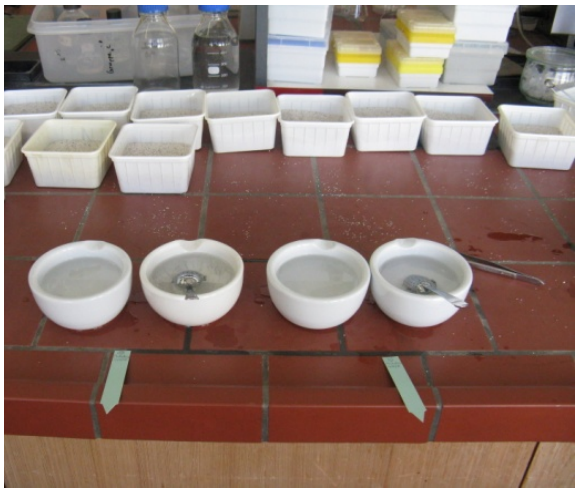


Figura 5.10 Aspecte privind sterilizarea seminţelor de rapiţă

· ***Semănatul*** – s-a realizat în tăviţe de plastic de dimensiuni 10x10 cm, în nisip de quarţ care a fost sterilizat în prealabil timp de 60 min la o temperatură de 121^0C (figura 5.11).

După efectuarea semnănatului, tăviţele s-au dus în seră, unde au fost ţinute la o temperatură constantă de 23^0 cu o fotoperioadă de 14/10 h. Răsărirea plantelor a avut loc în toate cazurile la aproximativ 2-3 zile de la semănat. După răsărire, plăntuţele au fost menţinute timp de 10 zile în acelaşi condiţii.

Figura 5.11 Semănatul rapiţei

5.5.2 Pregătirea inoculului pentru infecţie

Pentru realizarea infecţiei artificiale a plantelor de rapiţă cu *V. longisporum* am utilizat izolatul VL43. Acest izolat a fost ales pe baza rezultatelor obţinute de către Zeise şi von Tiedemann (2002a) în urma unor teste de virulenţă a mai multor izolate de *V. longisporum*.

Păstrarea ciupercii pe termen lung s-a făcut la o temperatură de -80 ^{0} C în suspensie de spori cu o concentraţie de 3 x 10^{6} spori în mediu PDB (Potato Dextrose Broth) suplimentat cu 25% glicerol.

Pregătirea mediului de cultură pentru *V. longisporum*.

Pentru cultura de *V. longisporum* s-a utilizat mediu PDB lichid. Pentru realizarea acestuia, s-a utilizat praf PDB gata preparat de la firma ROTH. Astfel, într-un pahar Erlenmayer s-au cântărit 5,3 grame de PDB peste care s-a adăugat 200 ml de apă distilată. Amestecul s-a omogenizat pe un agitator magnetic 5 minute după care s-a sterilizat la o temperatură de 121^{0}C timp de 30 minute.

Realizarea culturii de *V. longisporum*

După răcirea mediului de cultură, inocularea cu agentul patogen s-a realizat într-o hotă cu flux laminar, prin adăugarea unei cantităţi de 1000 de µl de soluţie stoc cu spori.

După inoculare, cultura a fost incubată pe un shaker rotativ, timp de 10 zile, la o temperatură de 22^{0}C şi 100 rotaţii pe minut (figura 5.12).

Figura 5.12 Incubarea culturii de *V .longisporum* pe shaker rotativ

5.5.3 Realizarea infec iei artificiale cu *Verticillium longisporum*

Pregătirea suspensiei cu *V. longisporum*

După aproximativ 10 zile de incubare, în mediu de cultură, se formează miceliu şi spori de *V. longisporum*. Conform protocolului de infecţie utilizat, pentru realizarea infecţiei artificiale este necesară o soluţie de spori cu o concentraţie de 1x10^{6} spori/mL^{-1}.

Pentru obţinerea acestei concentraţii, în primă fază se determină numărul de spori din mediul PDB utilizat de noi, folosind o lamă Thoma.

Determinarea concentra iei de spori din mediul lichid s-a realizat astfel: cu ajutorul unei pipete de 1000 µl, pe lama Thoma se pipetează un volum 500 µl de mediu cu spori (figura 5.13). La microscop, se numă cel pu in 600 de celule după care se face un calcul matematic aplicând formula[7]:

[7] C=concentra ia celulară, n= media numărului de celule pe mm^{2} şi V= volumul de probă

$$c = \frac{n}{v}$$

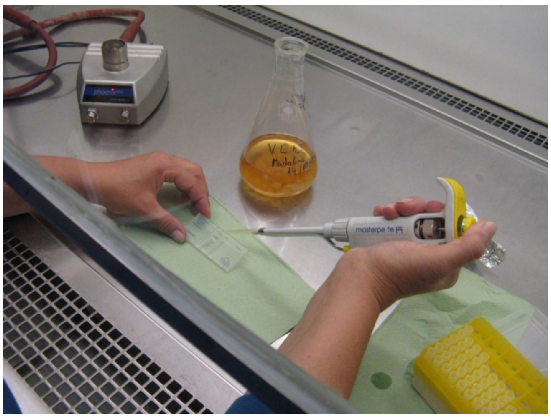


Figura 5.13. Determinarea numărului de spori din cultura de *V .longisporum*

După determinarea numărului de spori din cultură, s-a realizat dilu ia pentru inoculul care a fost utilizat în infec ia artificială a plantelor de rapi ă. Pentru realizarea acestui lucru, s-a înlăturat mai întâi miceliul de *V. longisporum* din soluţie cu ajutorul unei site (figura 5.14), după care, într-un vas nou s-a luat cantitatea necesară de soluţie cu spori peste care s-a adăugat apă până când s-a ajuns la concentraţia de $1x10^6$ spori pe ml^{-1}.

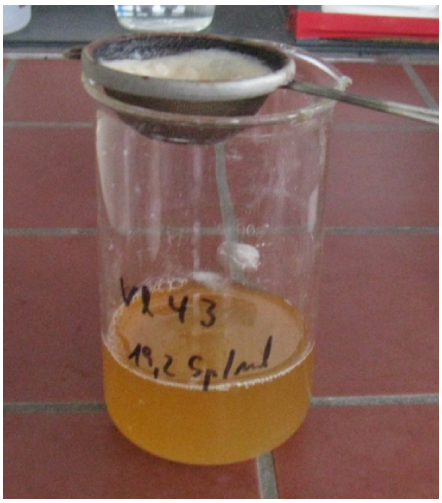


Figura 5.14. Pregătirea inoculului de *V. longisporum*

Procedeul realizării infecţiei artificiale

Pentru realizarea infec iei artificiale a plantelor de rapi ă cu agentul patogen *V. longisporum* s-au utilizat plăntu e de rapi ă având 10 zile de la răsărire.

Ca plante martor s-a utilizat cultivarul „Falcon” care este cunoscut în literatura de specialitate ca fiind foarte sensibil la boală şi cultivarul „Express” care este tolerant la atacul patogenului (Eynck şi colab., 2007).

Figura. 5.15. Infec ia artificială a plantelor de rapi ă cu *V. longisporum*

Pentru fiecare linie în parte s-au utilizat 10 plante infectate şi 10 plante martor. Plantele de rapiţă s-au îndepărtat cu grijă din nisipul de cuarţ, iar rădăcinile au fost spălate foarte bine sub jet de apă (figura 5.15).

După spălarea rădăcinilor, cu un foarfece s-au tăiat de la fiecare plantă aproximativ 2 cm din vârful rădăcinii (figura 5.16).

Figura 5.16. Infec ia artificială a plantelor de rapi ă cu *V.longisporum*

Pentru a nu se face confuzie între plantele infectate şi cele martor s-au utilizat etichete de diferite culori, roşu pentru martor şi galben pentru cele infectate.

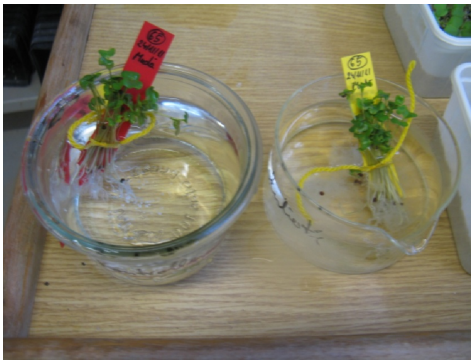


Fig. 5.17. Inocularea plantelor cu *V.longisporum*

Pentru realizarea infecţiei, plantele s-au imersat cu rădăcinile în suspensie de soluţie cu spori de *V. longisporum*, iar cele martor în apă (figura 5.17) unde au fost ţinute timp de 30 de minute.

După cele 30 de minute, plantele au fost transferate în ghivece de 10 x10 cm într-un amestec de sol, compost şi turbă în raport de 2:1:1.

Ulterior acestea au fost crescute în seră, timp de 4 săptămâni la o temperatură de 23^0C şi un regim de lumină de 14/10 ore (lumină/întuneric).

În timpul experimentelor, plantele nu au fost fertilizate. Săptămânal, s-a realizat bonitarea infec iei folosind o scară de bonitare (tabelul 5.7) a lui Zeise (1992).

Tabelul 5.7

Scara de bonitare a plantelor infectate cu *V. longisporum*

Nota	Simptom
1	Fără simptome
2	Simptome uşoare pe frunzele mai bătrâne (îngălbeniri)
3	Simptome uşoare pe următoarele frunze tinere
4	Aproape 50 % din frunze prezintă simptome
5	Peste 50% din frunze prezintă simptome
6	Aproape 50% din frunze sunt uscate
7	Mai mult de 50% din frunze sunt uscate
8	Doar meristemul apical este verde
9	Toată planta este uscată

În urma bonitărilor efectuate săptămânal, pentru fiecare cultivar s-a calculat valoarea AUDPC (area under disease progress curve) după formula lui Campbel şi Madden (1990):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n} (y_i + y_{i+1}/2) * (t_{i+1} - t_i)$$

Unde:

Y_i - nota acordată pentru observa ia i;

T_i – numărul de zile după infec ie la momentul în care a fost acordată nota i;

n- este numărul de observa ii făcute.

Deoarece la debutul bolii, simptomele de *Verticillium longisporum* pot fi confundate cu îmbătrânirea normală a plantelor de rapi ă, pentru a înlătura simptomele produse de îmbătrânire, s-a calculat valoarea AUDPC şi pentru plantele control. Această valoare a fost scăzută din valoarea AUDPC a plantelor inoculate pentru a ob ine valoarea net AUDPC ($AUDPC_{net}$):

$AUDPC_{net} = AUDPC (X_{inoc}) – AUDPC (X_{contr})$

Pentru a compensa fluctua ia nivelelor de infec ie între cultivare, valoarea AUDPC pentru fiecare cultivar a fost normalizată prin utilizarea valorilor ob inute de controalele folosite şi anume cultivarele Falcon şi Express după cum urmează:

$$AUDPC_{norm} = \frac{AUDPCnet(X)}{(AUDPCnetExpress + AUDPCnetFalcon)/2}$$

CAPITOLUL VI
REZULTATE ŞI DISCUŢII

6.1 Rezultate privind caracterele morfologice studiate la cele 130 de cultivare de rapiţă

Pentru caracterizarea materialului biologic iniţial, s-au făcut măsuratori în câmp, în lotul experimental, la 10 plante de la fiecare cultivar şi repetiţie, date biometrice care au fost prelucrate prin analiza varianţei.

Datele obţinute au fost sintetizate şi interpretate cu ajutorul metodei de valorificare a experienţelor aşezate în blocuri randomizate, prin analiza varianţei şi a diferenţelor limită.

În urma observaţiilor efectuate în anul agricol 2010-2011 în condiţiile de la SCDA Secuieni înălţimea medie a plantelor a variat în cadrul celor 130 de cultivare luate în studiu. Ce mai mare înălţime a plantelor a înregistrat-o cultivarul „Maras” cu o valoare medie de 144, 97 cm. Cea mai mică înălţime a fost observată la cultivarul „Mansholts Hamburger” cu o valoare medie de 59,99 cm, media experienţei fiind de 113,82 cm considerată martor al experienţei.

Caracterul „înălţimea plantelor” la cele 130 de cultivare analizate a înregistrat o amplitudine de variaţie de 84,98 cm.

În urma rezultatelor obţinute, s-a remarcat un număr de 30 de cultivare care au înregistrat valori ale înălţimii plantelor mai mari decât martorul (media experienţei), cu diferenţe pozitive foarte semnificative (figura 6.1 şi 6.2). Diferenţe distinct semnificative pozitive au fost observate la 17 cultivare şi doar la 5 cultivare s-au observat diferenţe semnificative pozitive faţă de martor (figura 6.1 şi 6.2).

O serie de cultivare au înregistrat valori ale înălţimii plantelor mai mici decât martorul (media experienţei). Astfel 27 de cultivare au avut diferenţe foarte semnificative negative faţă de martor, 6 cultivare au înregistrat diferenţe distinct semnificative negative şi 5 cultivare au avut diferenţe semnificative negative faţă de martor (figura 6.1 şi 6.2). Cu valori nesemnificative fată de martor s-a evidenţiat un număr de 38 de cultivare.

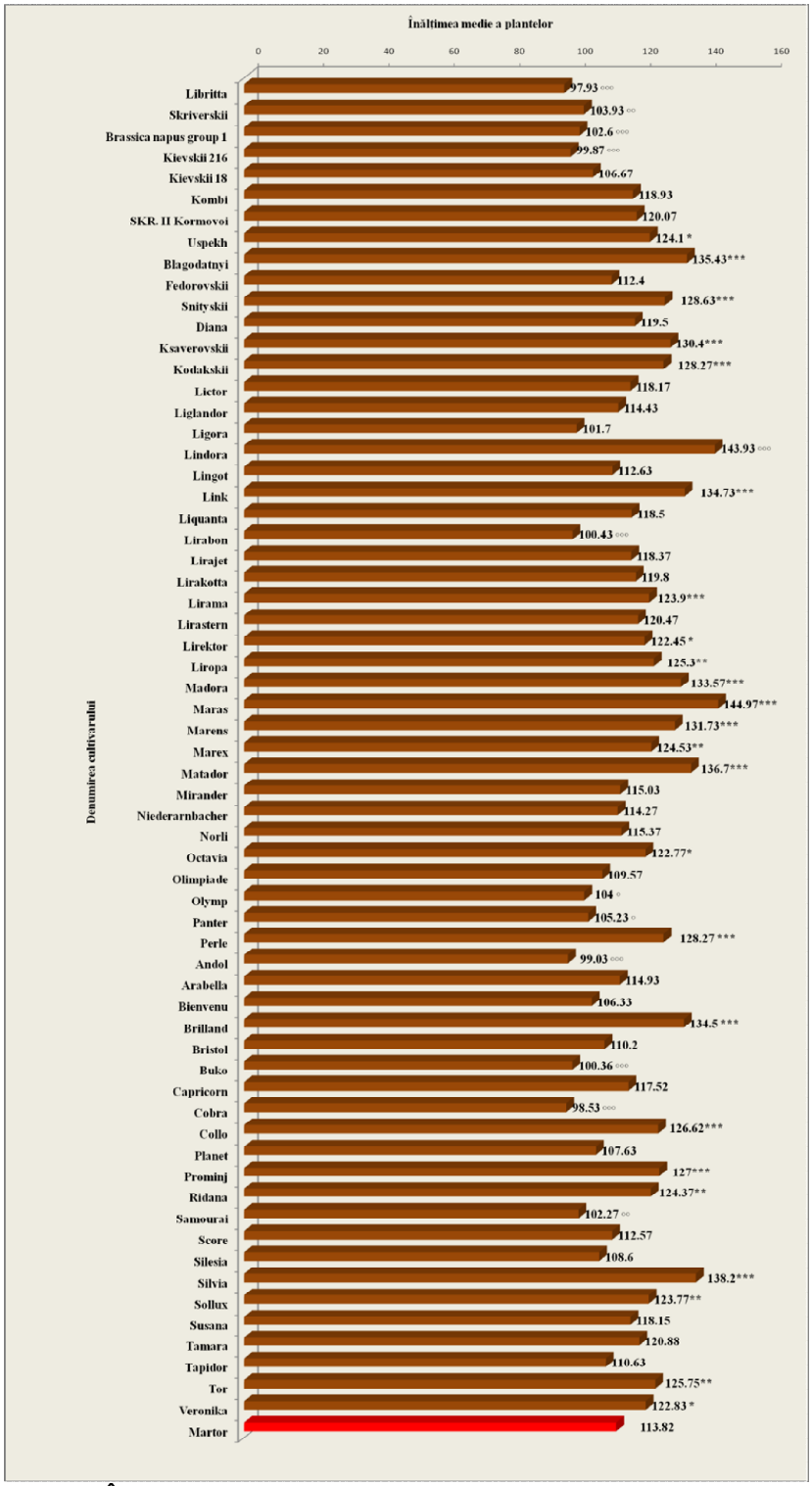


Figura 6.1 Înălţimea plantelor plantelor la primele 65 de cultivare de rapiţă

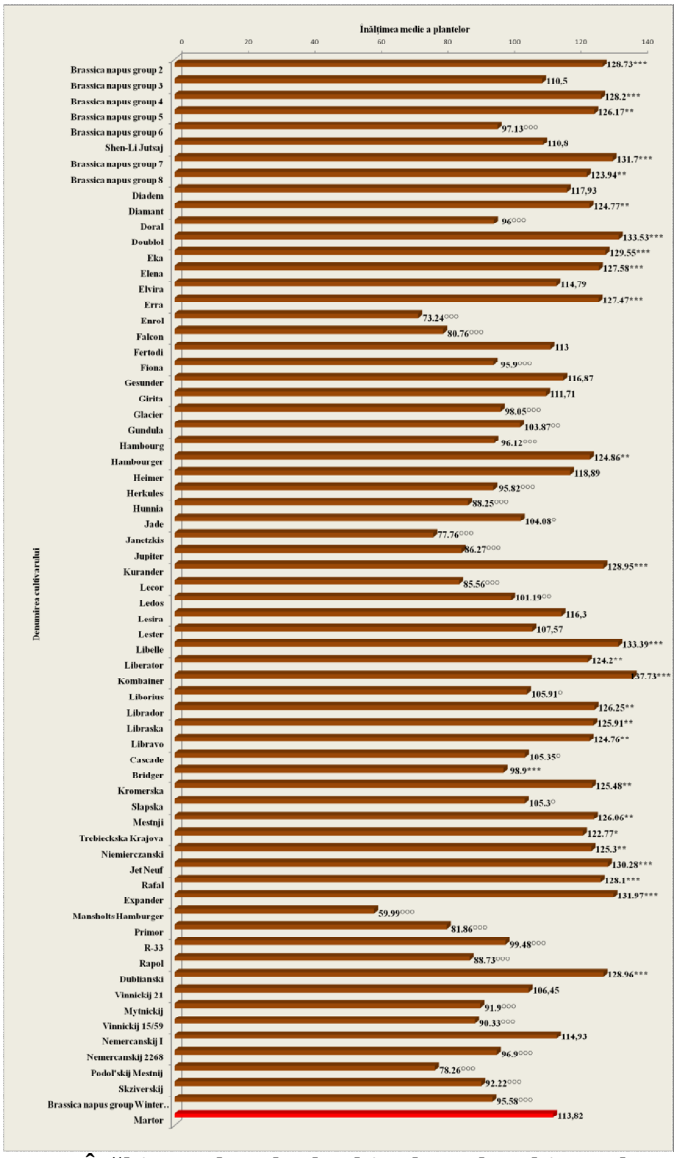


Figura 6.2 Înălţimea plantelor la ultimele 65 de cultivare de rapiţă

În urma observaţiilor efectuate în anul agricol 2010-2011 în condiţiile de la SCDA Secuieni, numărul mediu de silicve pe plantă a variat în cadrul celor 130 de cultivare luate în studiu. Cel mai mare număr de silicve s-a înregistrat la cultivarul „Libraska” cu valoarea medie de 1283 silicve/plantă, iar cel mai mic număr de silicve a fost înregistrat la cultivarul „*Brassica napus* group 9” cu o valoare medie de 115 silicve pe plantă. Media experienţei a fost de 394 silicve pe plantă fiind considerată martorul experienţei.

Caracterul „numărul de silicve pe plantă” la cele 130 de cultivare de rapiţă analizate a înregistrat o amplitudine de variaţie de 1168 silicve pe plantă.

În urma rezultatelor obţinute, s-a remarcat un număr de 33 de cultivare care au înregistrat valori medii a numărului de silicve pe plantă mai mari decât martorul (media

experienţei), cu diferenţe foarte semnificative pozitive (figura 6.3 şi 6.4). Diferenţe distinct semnificative pozitive au fost observate la 3 cultivare şi doar două cultivare au înregistrat o diferenţă semnificativă pozitivă faţă de martor (figura 6.3 şi 6.4).

O serie de cultivare au înregistrat valori mai mici ale numărului mediu de slicve pe plantă, astfel 64 de cultivare au avut diferenţe foarte semnificative negative faţă de martor, 7 cultivare au înregistrat diferenţe distinct semnificative negative şi 4 cultivare au avut diferenţe semnificative negative faţă de martor (figura 6.3 şi 6.4).

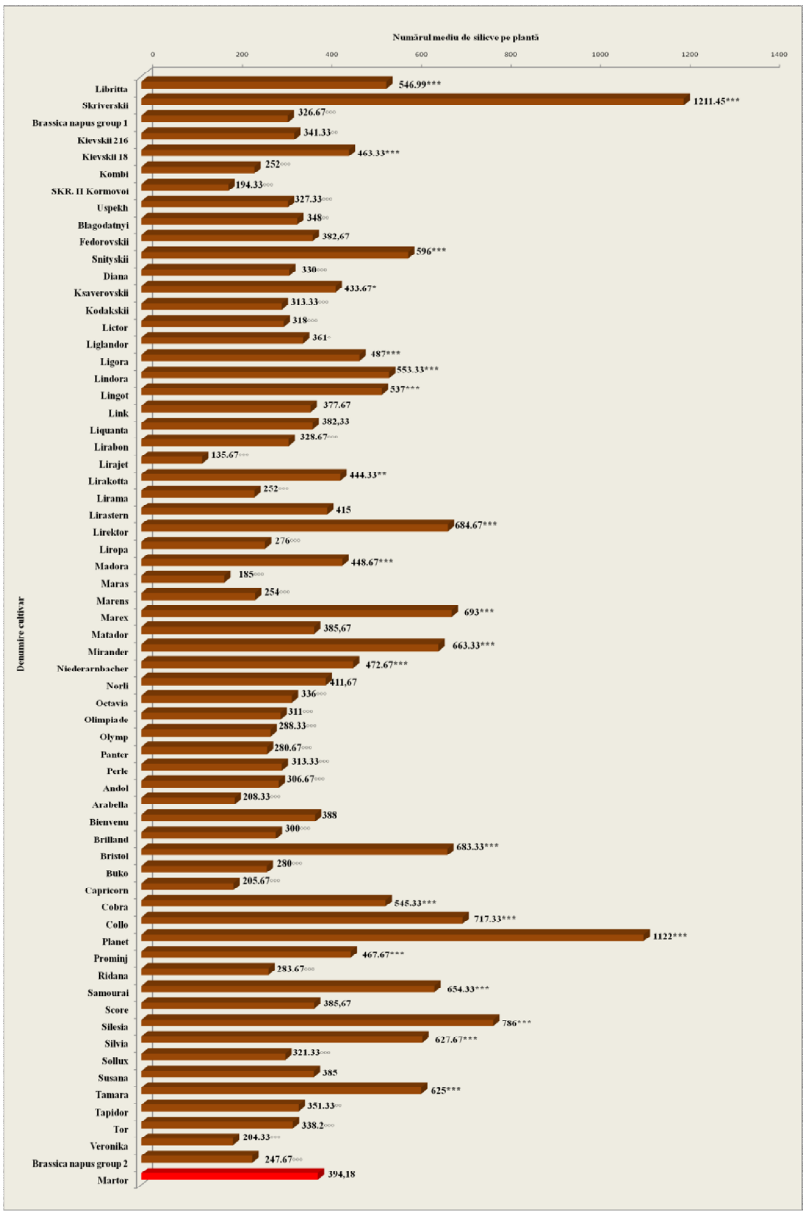


Figura 6.3 Numărul mediu de silicve pe plantă a primelor 65 de cultivare luate în studiu

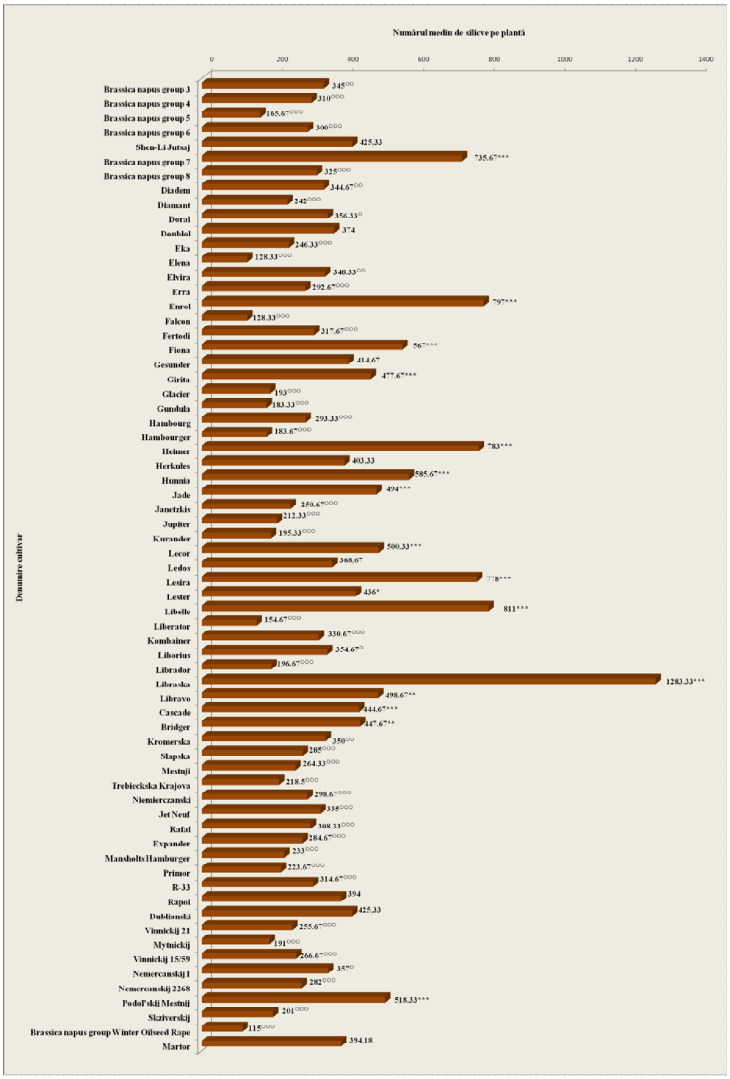


Figura 6.4 Numărul mediu de silicve pe plantă a ultimelor 65 de cultivare luate în studiu

În urma observaţiilor efectuate în anul agricol 2010-2011 în condiţiile de la SCDA Secuieni, numărul mediu ramificaţii pe plantă a variat în cadrul celor 130 de cultivare luate în studiu. Cel mai mare număr de ramificaţii s-a înregistrat la cultivarul „Lesira” cu valoarea medie 13,67 ramificaţii/plantă, iar cel mai mic număr ramificaţii a fost înregistrat la cultivarul „Olimpiade” cu o valoare medie de 4 ramificaţii pe plantă, cu o medie a experienţei de 8,49 ramificaţii fiind considerată martorul experienţei.

Caracterul „numărul de ramificaţii pe plantă” la cele 130 de cultivare luate în studiu a avut o amplitudine de variaţie de 9,67 ramificaţii.

În urma rezultatelor obţinute, s-a remarcat un număr de 4 de cultivare care au înregistrat valori medii ale numărului de ramificaţii pe plantă mai mari decât martorul,

cu diferenţe foarte semnificative pozitive (figura 6.5 şi 6.6). Diferenţe distinct semnificative pozitive au fost observate la 4 cultivare şi doar 8 cultivare au înregistrat diferenţe semnificative pozitive faţă de martor (figura 6.5 şi 6.6).

O serie de cultivare au înregistrat valori ale înălţimii plantelor mai mici decât martorul (media experienţei), astfel un singur cultivar a înregistrat diferenţe foarte semnificative negative, 2 cultivare au înregistrat diferenţe distinct semnificative negative şi 5 cultivare au avut diferenţe semnificative negative faţă de martor (figura 6.5 şi 6.6).

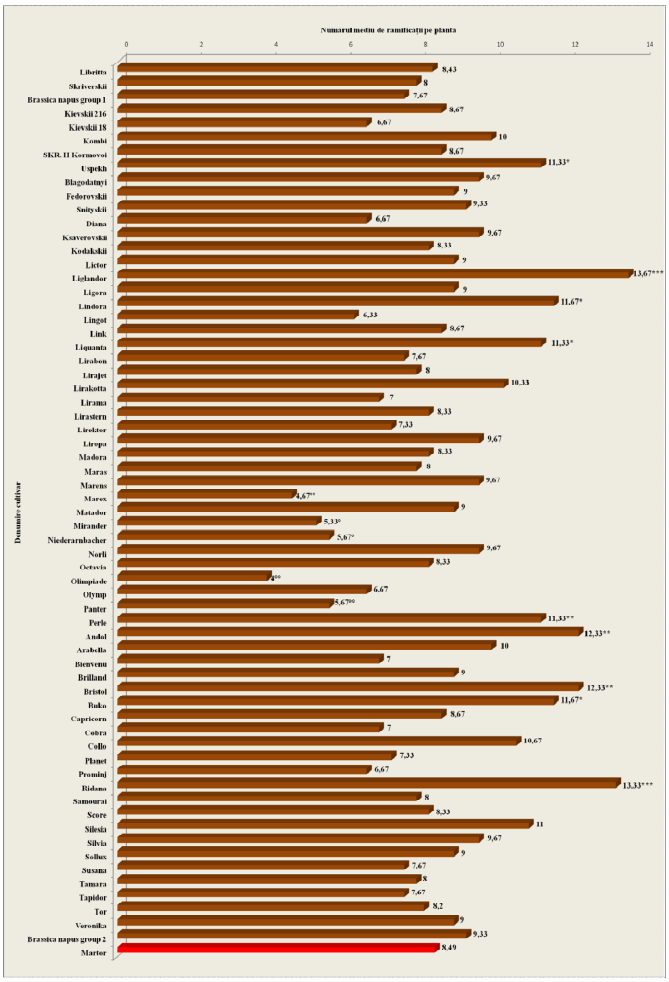


Figura 6.5 Numărul mediu de ramificaţii pe plantă a primelor 65 de cultivare studiate

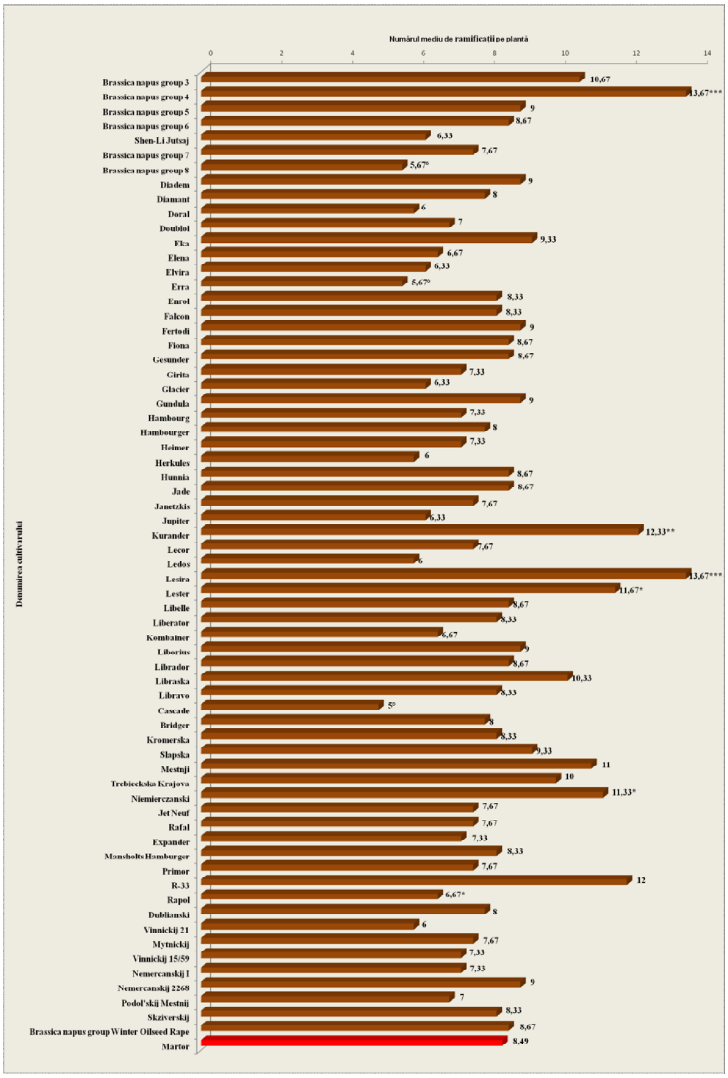


Figura 6.6. Numărul mediu de ramificaţii pe plantă a ultimelor 65 de cultivare luate în studiu

În urma observaţiilor efectuate în anul agricol 2010-2011 în condiţiile de la SCDA Secuieni, masa a 1000 de boabe a variat în cadrul celor 130 de cultivare luate în studiu. Cel mai mare MMB s-a înregistrat la cultivarul „Silesia” cu valoarea medie 7.29 grame, iar cel mai mic s-a observat la cultivarul „Janetkis” cu o valoare medie de 3,24 grame, cu o medie a experienţei de 4,95 grame, această valoare fiind şi martorul experienţei.

Caracterul „MMB” la cele 130 de cultivare studiate a înregistrat o amplitudine de variaţie de 4,05 grame.

În urma rezultatelor obţinute, s-a remarcat un număr de 9 de cultivare care au înregistrat valori ale MMB mai mari decât martorul, cu diferenţe foarte semnificative pozitive (figura 6.7 şi 6.8). Diferenţe distinct semnificative pozitive au fost observate la

5 cultivare şi doar 7 cultivare au înregistrat diferenţe semnificative pozitive faţă de martor (figura 6.7 şi 6.8).

O serie de cultivare au înregistrat valori MMB mai mici, astfel 8 cultivare au avut diferenţe foarte semnificativ negative faţă de martor, 9 cultivare au înregistrat diferenţe distinct semnificative negative şi 2 cultivare au avut diferenţe semnificativ negative faţă de martor (figura 6.7 şi 6.8).

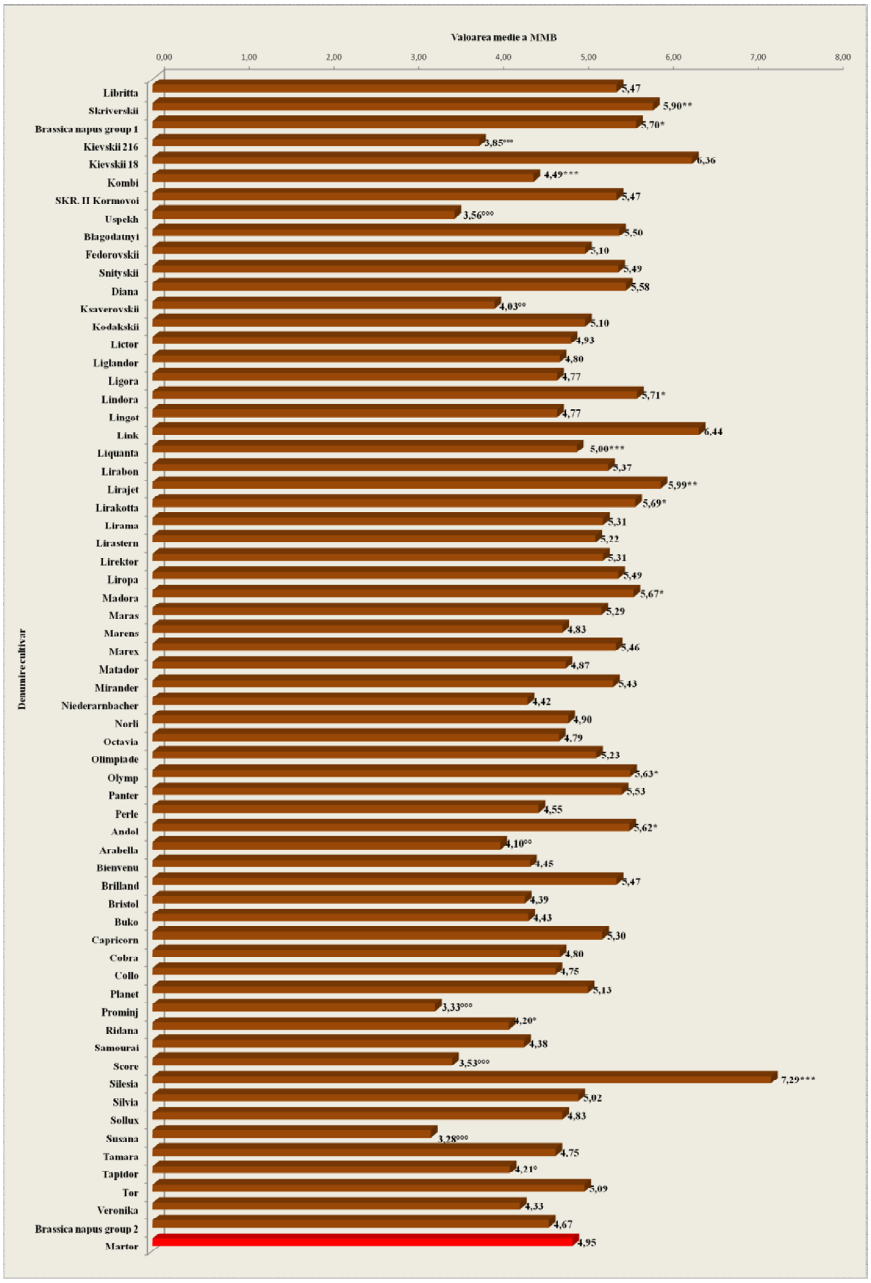


Figura 6.7 MMB primelor 65 de cultivare luate în studiu

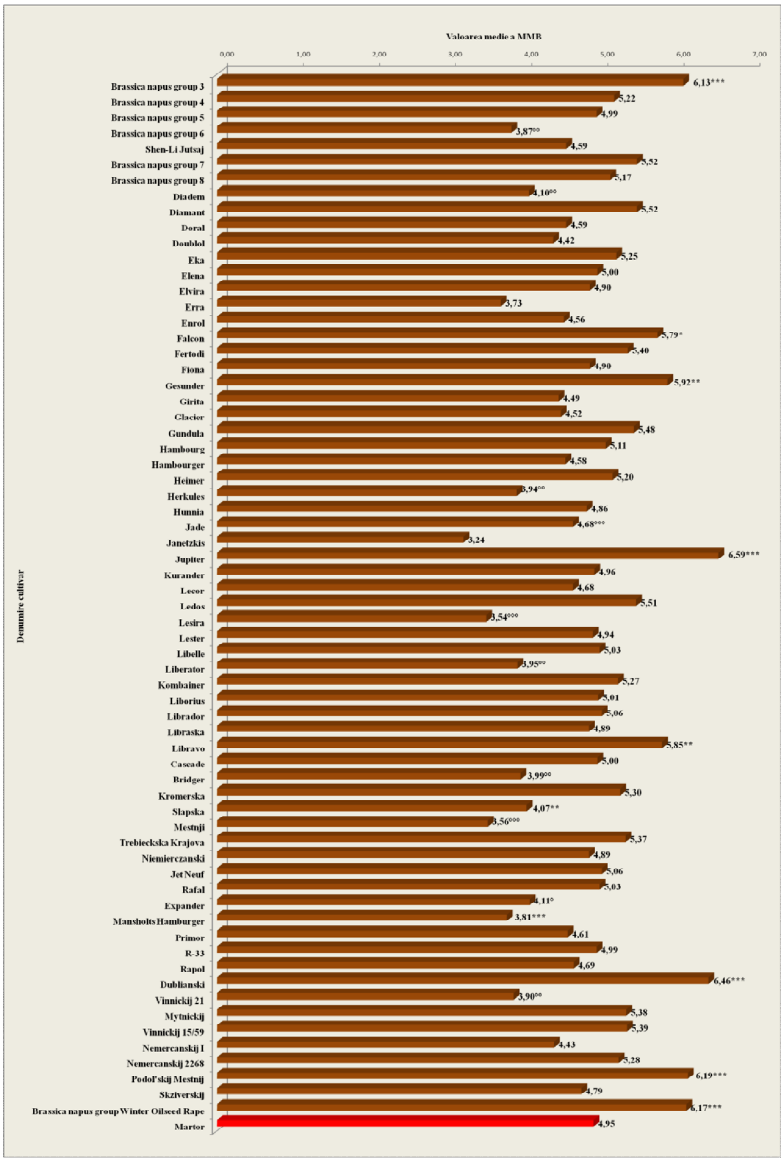


Figura 6.8 MMB ultimelor 65 de cultivare luate în studiu

6.2. Determinarea diversităţii genetice a cultivarelor de rapiţă luate în studiu

6.2.1. Determinarea diversităţii genetice prin tehnica RAPD

Pentru determinarea diversităţii genetice dintre cultivarele de rapi ă luate în studiu, s-au utilizat atât datele moleculare obţinute în urma amplificării RAPD cât şi datele obţinute în urma amplificării SSR.

Pe baza datelor obţinute de la fiecare metodă s-a calculat similaritatea genetică (GS) dintre genotipurile analizate care s-a concretizat în două matrici care au stat la baza generării dendrogramelor. Aceste două matrici ob inute, s-au corelat ulterior folosind testul Mantel (Mantel, 1967).

Prelucrarea datelor a constat în calcularea similarităţii genetice dintre fiecare două variante, lucru care s-a realizat utilizând coeficientului Dice (1945), atât în cazul RAPD cât şi în cazul SSR. Acest coeficient a fost folosit pentru prima dată în date provenite din analize moleculare de *Nei şi Li – 1979*.

$$GS_{xy} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$$

unde: GS_{xy} reprezintă similaritatea genetică dintre două forme biologice x şi y;

n_{xy} reprezintă numărul fragmentelor comune celor două forme;

n_x şi n_y reprezintă numărul total de fragmente existente la forma x şi respectiv y ;

Pentru a putea fi utilizate în continuare rezultatele astfel obţinute au fost ordonate într-o formă matriceală şi salvate sub formă de fişier txt. Prelucrarea ambelor matrici s-a făcut cu ajutorul programului NTSYS-pc 1.7.

Denumirea programul **NTSYS-pc 1.7** (Rohlf, 1992) provine de la **N**umerical **T**axonomy **S**ystem. Acest program poate fi utilizat atât în prelucrarea informaţiilor legate de morfologia unor grupuri de indivizi cât şi în studiile de filogenie.

Gruparea variantelor pe grupe înrudite genetic (cluster analysis) a fost realizată utilizând acest program folosind ca variabile **coeficientul de similaritate genetică** şi **UPGMA** (unweighted pair-group method arithmetic average). Metoda UPGMA (SAHN clustering) a fost aleasă deoarece dintre toate celelalte metode similare evidenţiază cel mai bine grupările (clusters) existente (Milligan G.W., 1980).

Rezultatul acestor grupări a fost concretizat în realizarea celor trei dendrograme. Deoarece numărul de indivizi a fost foarte mare, cele trei dendrograme au fost împărţite şi prezentate pe clustere pentru a se putea observa cu uşurinţă cum s-au grupat indivizii din punct de vedere genetic.

Pentru determinarea similarită ii genetice a celor 130 de linii de rapi ă cu ajutorul markerilor RAPD s-au utilizat un număr de 20 primeri decamerici.

În urma analizei datelor ob inute în urma RAPD, s-au ob inut un număr de 301 de fragmente amplificate între 288 şi 961 perechi de baze din care 215 de fragmente au fost polimorfice (tabelul 6.1).

Nivelul de polimorfism a fost între 29 şi 90%, iar numărul de fragmente polimorfice a oscilat între 5 (primerul A07) şi 18 (primerul C06).

Tabelul 6.1

Date ob inute din analiza RAPD

Primer	Număr fragmente amplificate	Fragmente polimorfice	Mărimea fragmentelor (bp)	Procent polimorfism (%)
0	1	2	3	4
ROTH A07	9	6	288-760	66%
ROTH A08	12	7	322-777	58%
ROTH A09	10	9	353-900	90%
ROTH A10	15	11	436-961	73%
ROTH A13	8	6	337-831	75%

Continuare tabel 6.1

0	1	2	3	4
ROTH A17	10	8	355-828	80%
ROTH A18	11	6	265-918	54%
ROTH B04	21	19	238 -939	90%
ROTH B06	20	17	289-765	85%
ROTH B07	18	15	352-781	83%
ROTH B08	23	16	363-953	69%
ROTH B10	17	10	485-961	58%
ROTH B11	9	5	335-837	29%
ROTH B18	15	8	312-828	53%
ROTH C07	20	11	268-929	55%
ROTH C10	7	6	298 -939	85%
ROTH C12	12	9	299-781	60%
ROTH C14	15	7	385-779	46%
ROTH C18	19	14	395-950	73%
ROTH C20	9	7	485-961	77%
ROTH C06	21	18	349-836	85%

În urma analizei RAPD folosind metoda UPGMA, cele 130 genotipuri de rapiţă luate în studiu s-au grupat în 6 clustere majore A, B, C, D, E şi F (figurile 6.9, 6.10, 6.11, 6.12). Cultivarele de rapiţă s-au grupat, în general, după ţara de origine.

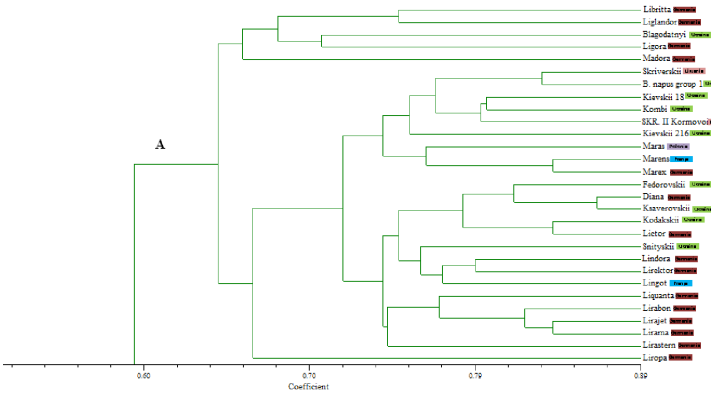


Figura 6.9 Dendrograma UPGMA rezultată în urma analizei RAPD (clusterul A)

Clusterul A (figura 6.9), cuprinde 28 de cultivare şi este format din două subclustere. După cum se poate observa, în cadrul celui de-al doilea subcluster, un grup

aparte îl formează o serie de cultivare ce au provenit din Germania: „Linquanta”, „Lirabon”, „Lirajet”, „Lirama” şi „Lirasten”.

S-a constatat că, genotipul„Liropa”, ce provine tot din Germania s-a grupat separat de acest subcluster, având un coeficient de similaritate (CS) de 0,67.

De asemenea, „Diana” şi „Ksaverovskii” au înregistrat un CS de 0,88, primul fiind originar din Germania, iar cel de-al doilea fiind originar din Ucraina

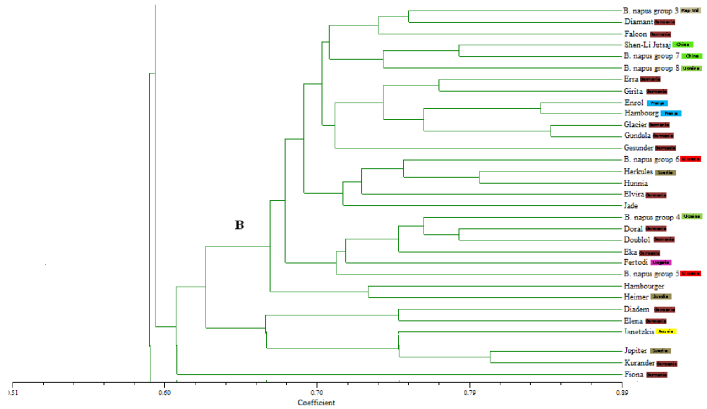


Figura 6.10 Dendrograma UPGMA rezultată în urma analizei RAPD (clusterul B)

Al doilea cluster, B (figura 6.10) cuprinde 24 de cultivare de rapiţă, fiind format 6 subclustere. În acest cluster, cel mai mare CS s-a observat la „Glacier” şi „Gundula” având o valoare de 0,85. Cultivarul „Fiona” originar din Germania s-a grupat separat, cu un CS de 0,52.

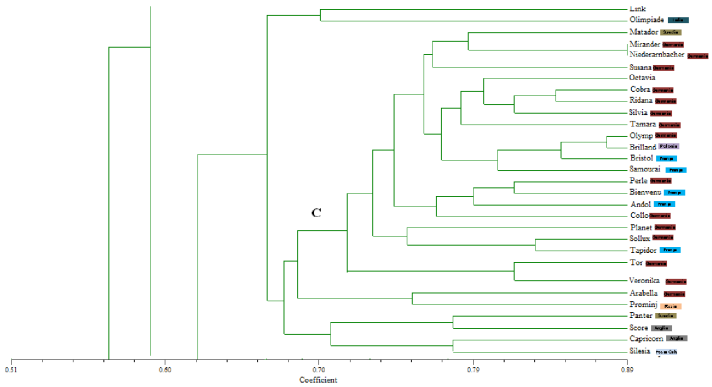


Figura 6.11 Dendrograma UPGMA rezultată în urma analizei RAPD (clusterul C)

Clusterul C (figura 6.11), a grupat un număr de 30 de cultivare de rapiţă diverse din punct de vedere genetic, fiind cel mai mare cluster. În acest grup, se poate observa că primul subcluster cuprinde genotipurile „Link” şi „Olimpiade”, ambele având valoarea CS de 0,64. Tot în acest cluster se găsesc cele mai apropiate cultivare din punct de vedere genetic, „Mirander” şi „Niederarnbacher”ambele originare din Germania.

Clusterul D (figura 6.12) a grupat 28 de cultivare, având 3 subclustere. „Cascade” şi „Niemerczanki” au format un subcluster separat având un CS de 0,68. Un alt subcluster separat îl alcătuiesc şi genotipurile „Lester” şi „Liberator”, cu un CS de 0,73. Deşi este originar din Germania „Libelle” s-a grupat separat având un CS de 0,67.

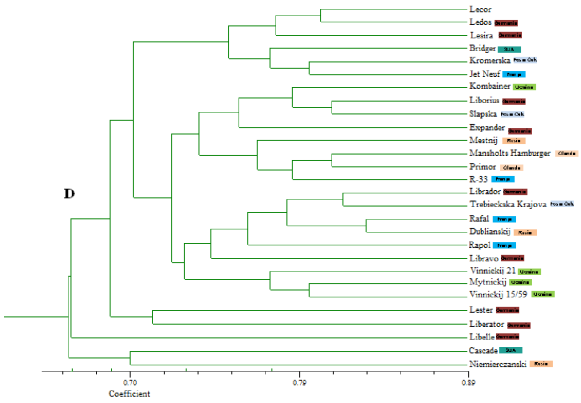


Figura 6.12 Dendrograma UPGMA rezultată în urma analizei RAPD (clusterul D)

Clusterul E (figura 6.13) a grupat doar 7 cultivare de rapiţă, fiind diferit de celelalte clustere. În cadrul acestuia, un grup separat l-a format „Libraska” şi „Niemercanki1”, primul fiind originar din Germania, iar al doilea fiind originar din Ucraina.

Cel mai mic cluster din dendrogramă este „F” (figura 6.5) care a grupat doar 4 cultivare de rapiţă. În cadrul acestuia s-au format două subclustere, unul alcătuit de cultivarele „Podol'skij Mestnij”, „Skziverskij” şi „*Brassica napus* group 9” în care primele două cultivare au acelaşi CS, iar „*Brassica napus group* 9” s-a diferenţiat separat. Cel de-al doilea subcluster este format din genotipul „Nemercanskij 2268” care este diferit de celelalte cu un CS de 0,62.

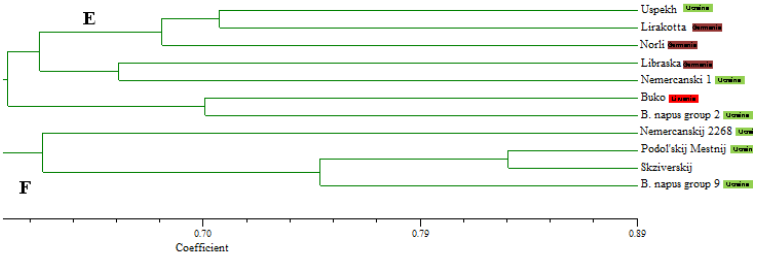


Figura 6.13 Dendrograma UPGMA rezultată în urma analizei RAPD (clusterul E şi F)

6.2.2 Dendrograma obţinută în urma analizei SSR

Pentru realizarea dendrogramei SSR, s-au utilizat un număr de 51 de markeri specifici pentru SSR care au amplificat un număr de 139 de fragmente polimorfice.

Nivelul de polimorfism în acest caz a fost de 100 %.

În urma analizei UPGMA a datelor obţinute în urma amplificării SSR, cele 130 de cultivare de rapiţă s-au grupat în 10 clustere. Şi în acest caz, s-a constatat că, genotipurile studiate s-au grupat după ţara de origine.

Clusterul A (figura 6.14) este alcătuit din 37 de cultivare şi conţine 3 subclustere.

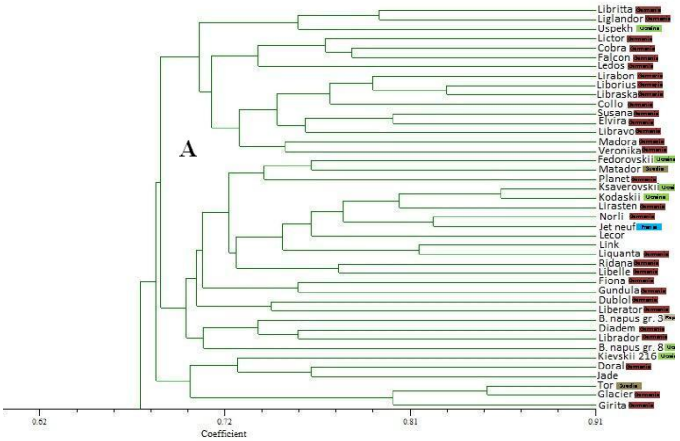


Figura 6.14 Dendrograma UPGMA obţinută în urma analizei SSR (Clusterul A)

Primul subcluster (figura 6.14) cuprinde 17 cultivare majoritatea originare din Germania, excepţie făcând „Uspekh” care provinde din Ucraina. S-a constatat că, genotipurile „Libritta” şi „Liglandor” care provin din Germania s-au grupat împreună atât în dendrograma RAPD unde au un CS de 0,74 cât şi în cazul de fa ă unde au un CS de 0,80.

De asemenea „Ksaverovskii” şi „Kodaskii” s-au grupat tot după ara de origine, ambele fiind din Ucraina şi având un CS de 0,87.

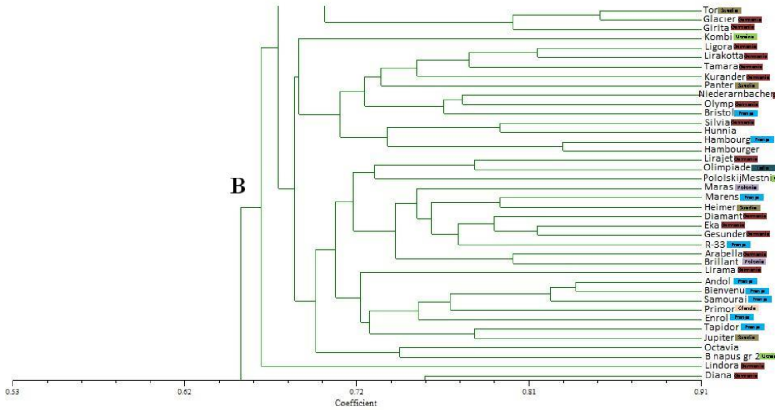


Figura 6.15 Dendrograma UPGMA obţinută în urma analizei SSR (Clusterul B)

Clusterul B (figura 6.15) a grupat un număr de 36 de cultivare, acesta fiind împărţit în mai multe subclustere. Şi în acest caz se constată o gupare după ara de provenien ă. Genotipurile „Andol” şi „Bienvenu”, provin din Fran a, au un CS de 0,85 şi formează un grup aparte. Mai diferit din punct de vedere genetic pare a fi „Lindora” originar din Germania care s-a grupat separat de celelalte cultivare, având un CS de 0,66.

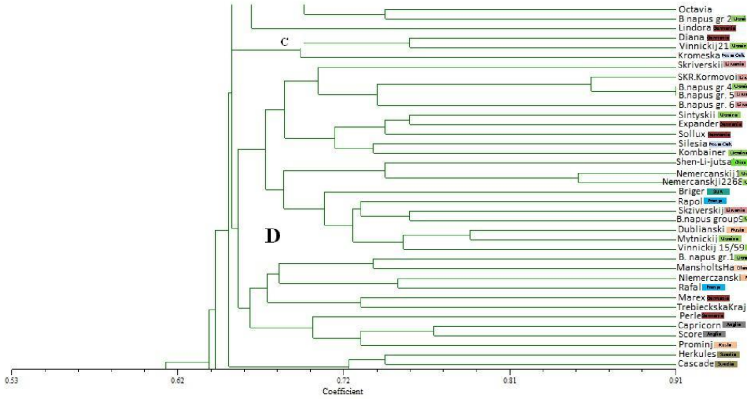


Figura 6.16 Dendrograma UPGMA obţinută în urma analizei SSR (Clusterul C,D)

Clusterul C (figura 6.16) a grupat un număr de 3 cultivare de origini diferite. În cadrul acestuia s-a constatat că, genotipurile grupate provin din ări diferite.

Clusterul D cuprinde un număr de 32 de soiuri care s-au grupat şi acestea în general după ţara de origine. În cadrul acestuia, genotipurile „*Brassica napus* group 4” şi „*Brassica napus* group5” apar împreună cu un CS de 0,91. De asemenea şi cultivarele „Nemercanskij” şi „Nemercanskij 2268” apar grupate împreună având un CS de 0,85, această grupare fiind datorată fondului genetic comun al acestor genotipuri.

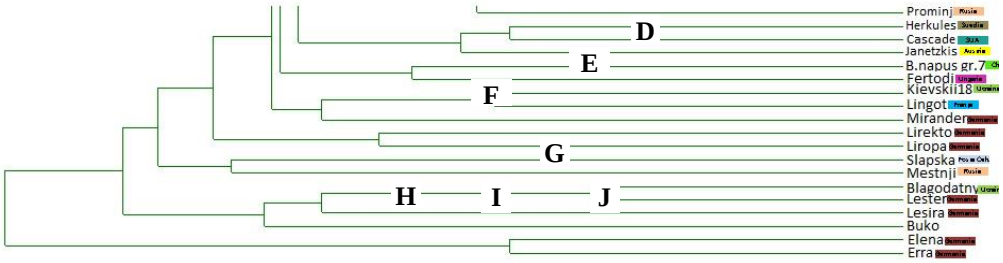


Figura 6.17 Dendrograma UPGMA obţinută în urma analizei SSR (Clusterul D, E, F, G, H, I, J)

În figura 6.17 se poate observa că ultimele 6 clustere sunt mai mici fiind alcătuite în medie din două sau trei cultivare de rapiţă. După cum se poate observa în cadrul acestor mici clustere cultivarele care s-au grupat sunt diferite din punct de vedere genetic, coeficientul de similaritate fiind între 0,60 şi 0,79.

6.2.3 Dendrograma obţinută în urma combinării datelor RAPD şi SSR

În urma corelării matricelor RAPD şi SSR, folosind metoda UPGMA s-a obţinut o a treia dendrogramă în care cele 130 de cultivare s-au grupat în funcţie de cele două tipuri de fragmente RAPD şi SSR, fiind alcătuită din patru clustere: A, B, C şi D (figurile 6.18, 6.19, 6.20, 6.21).

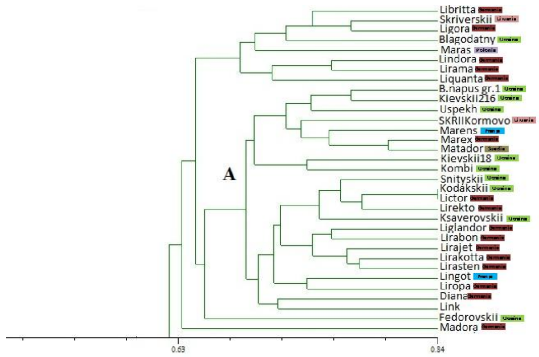


Figura 6.18 Dendrograma UPGMA obţinută cu datele RAPD+SSR (Clusterul A)

În cadrul acestei dendrograme, clusterul A (figura 6.18) a grupat un număr de 33 de cultivare, fiind alcătuit din trei subclustere. Genotipurile „Kodaskii" şi „Lictor" au prezentat un CS de 0,84 fiind cele mai apropiate din punct de vedere genetic. Acestea s-au grupat în acelaşi fel şi în cadrul dendrogramei RAPD, unde CS a fost de 0,83.

Tot în cadrul acestui cluster s-a constatat că „Lirajet", „Lirakotta" şi „Lirasten" formează un grup separat, aspect similar fiind întâlnit şi în cadrul dendrogramei RAPD.

În cazul de fa ă „Fedorovskii" şi „Madora" s-au grupat separat, iar în dendrograma SSR acestea au apărut grupate având acelaşi CS.

De subliniat este faptul că, în urma cumulării datelor RAPD şi SSR, cultivarele care au dovedit o rezistenţă mai mare la boala produsă de agentul patogen *Verticillium longisporum* s-au grupat în acelaşi cluster.

Un grup aparte este format din „Libritta", „Skriverskii", „Lingora" şi „Blagodatny" care, în urma infecţiei artificiale cu *V. longisporum*, au dovedit o rezistenţă mai mare decât cultivarul tolerant „Express". Cultivarele din acest grup pot fi utilizate, în studiile viitoare, în programele de ameliorare ca surse de gene pentru obţinerea unor soiuri rezistente la această boală.

„*Brassica napus* group 1" şi „Kievskii 216" formează un grup separat, acestea dovedind rezistenţă mai ridicată la atacul agentului patogen decât martorul „Express".

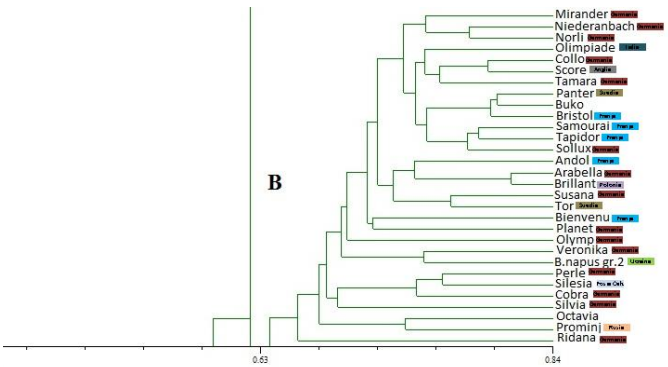


Figura 6.19 Dendrograma UPGMA obţinută cu datele RAPD+SSR (Clusterul B)

Al doilea cluster din dendrograma RAPD+SSR a grupat 30 de genotipuri (figura 6.19). În cadrul acestuia „Arabella” şi „Brillant” au un CS de 0,84 fiind mai apropiate din punct de vedere genetic. Aceste cultivare s-au grupat împreună şi în cazul dendrogramei SSR având un coeficient de similaritate de 0,79.

De asemenea, cultivarele „Tapidor”, „Buko”, „Planet” şi „Mytnickij au dovedit o rezistenţă mai ridicată la atacul agentului patogen decât cultivarul tolerant „Express”, ceea ce demonstrează că aceste cultivare sunt valoroase, putând fi folosite în studiile viitoare pentru obţinerea de soiuri şi hibrizi cu rezistenţă genetică la boală.

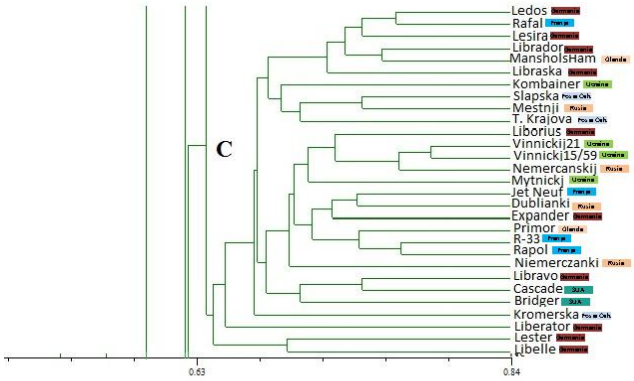


Figura 6.20 Dendrograma UPGMA obţinută cu datele RAPD+SSR (Clusterul C)

Clusterul C (figura 6.20), din cadrul acestei dendrograme cuprinde 30 de cultivare de rapi ă. Și în acest caz, acestea s-au grupat în principal după ţara de origine. Cele mai apropiate cultivare sunt „Vinnickij21” şi „Vinnickij15/59”, care au CS de 0,84.

„Kromeska” şi „Briger” sunt mai rezistente decât cultivarul „Express”, acestea făcând parte din grupa cultivarelor cu toleran ă bună.

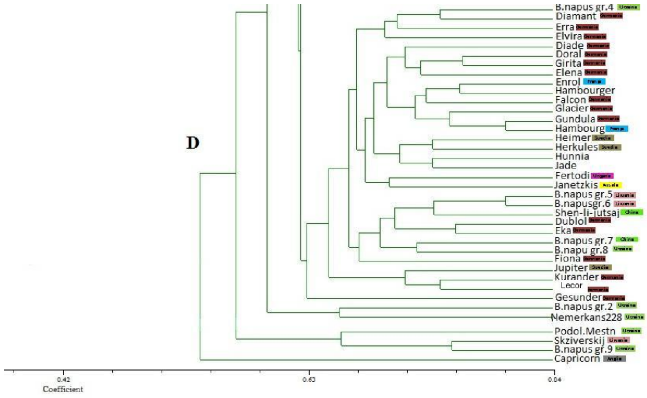


Figura 6.21 Dendrograma UPGMA obţinută cu datele RAPD+SSR (Clusterul D)

Ultimul cluster (figura 6.21) a grupat un număr de 38 de cultivare în patru sub clustere. Cele mai apropiate cultivare sunt „*Brassica napus* group 5” şi „*Brassica napus*

group 6” cu CS de 0,82 acestea grupându-se în acelaşi subcluster şi în cazul dendrogramei SSR.

Cunoaşterea diversităţii genetice este o unealtă utilă în programele de ameliorare a plantelor deoarece, cu ajutorul acesteia se pot identifica genotipuri care prezintă caractere de interes. Acestea pot fi utilizate ulterior ca surse de germoplasmă cu scopul de a îmbunătăţi anumite caractere agronomice (Diers şi Osborn, 1996).

În urma analizării celor trei dendrograme se poate observa o variaţie genetică mare a celor 130 de cultivare de rapiţă, fapt ce demonstrează utilitatea aplicării acestor tehnici pentru determinarea relaţiilor genetice între cultivare de acelaşi gen.

Aceste două tehnici au mai fost folosite cu succes şi pentru determinarea relaţiilor genetice în cadrul mai multor specii din genul *Brassica* cum ar fi broccoli şi conopidă (Hu şi colab., 1991; Li şi colab., 1997; Hasan şi colab., 2005).

Pentru determinarea diversităţii genetice a celor 130 de cultivare de rapiţă prin metoda RAPD, s-au utilizat 20 de primeri decamerici care au amplificat un număr de 301 fragmente din care 215 au fost polimorfice. Numărul de fragmente polimorfice în cazul unui singur primer a oscilat între 5 şi 19, iar nivelul de polimorfism a fost de 71 %.

În cazul utilizării tehnicii SSR, s-au utilizat un număr de 51 de markeri care au amplificat în total 139 de fragmente. Numărul de fragmente polimorfice în cazul unui singur primer a oscilat între 1-6, iar nivelul de polimorfism în acest caz a fost de 100%.

În ambele cazuri s-a ob inut un nivel mare de polimorfism ceea ce indică o variabilitate ridicată a cultivarelor luate în studiu. Nivelul ridicat de polimorfism în cazul nostru poate fi explicat de fondul genetic şi originea diferită.

În alte studii realizate la rapiţă pentru determinarea diversităţiii genetice s-au obţinut niveluri de polimorfism de 76% (Hallden şi colab.,1994), 14 % (Santos şi colab., 1994) şi 6% (Mailer şi colab., 1997).

Coeficientul de similaritate genetică pentru cele 130 de cultivare studiate în cazul tehnicii RAPD a oscilat între 0,51 şi 0,89, iar la SSR între 0,61 şi 0,91. În ambele situa ii, coeficienţii de similaritate au avut valori mai mici de 1, ceea ce demonstrează că nu există două cultivare identice din punct de vedere genetic, în cadrul materialului biologic studiat.

Rezultate asemănătoare au mai fost obţinute la rapiţă de către Hasan şi colaboratorii săi (2005), în determinarea relaţiilor genetice între câteva varietăţi de rapiţă de toamnă şi primăvară, prin tehnica SSR, unde coeficientul de similaritate genetică s-a situat între 0,38 şi 0,92.

Similaritatea genetică determinată de markeri pentru RAPD a fost studiată şi la alte specii a genului *Brassica*, cum ar fi *B. juncea* (Rabbani şi colab., 1998) unde s-au obţinut valori ale coeficientului între 0,76 şi 0,98 şi la *B. carinata* (Adefris şi colab., 2006) unde valorile CS a oscilat între 0,42 şi 0,73.

Această grupare după ţara de origine era de aşteptat în ambele cazuri, deoarece nu avem date privitoare la genealogia liniilor luate în studiu, iar în majoritatea studiilor referitoare la diversitatea genetică la genul *Brassica*, acestea se grupează după regiune. Aceste rezultate sunt asemănătoare cu cele obţinute de Yuan şi colaboratorii săi (2004), care au utilizat markerii RAPD pentru determinarea similarităţii genetice la câteva genotipuri de rapiţă cu origine diferită, iar în urma realizării dendrogramei, acestea s-au grupat după ţara de origine.

Shengwu şi colaboratorii (2003) au utilizat markerii pentru RAPD în determinarea diversităţii genetice între câteva cultivare provenite din China, Anglia, Germania, Franţa şi Cehia. În urma grupării UPGMA, cultivarele analizate s-au grupat în funcţie de ţara de origine.

Pe lângă markerii pentru RAPD, în determinarea relaţiilor genetice între cultivare, au fost utilizaţi cu succes şi markeri pentru AFLP şi SSR. Folosind aceste două tehnici în dendrogramele realizate, unii autori (Seys şi colab., 2004; Hasan şi colab., 2006), au constatat că genotipurile s-au grupat în primul rând după varietate (primăvară vs. toamnă), urmată de originea geografică.

6.3. Rezultate obţinute în urma testării cultivarelor de rapiţă la infecţia cu agentul patogen *V. longisporum*

Pentru identificarea cultivarelor rezistente/tolerante la atacul agentului patogen *Verticillium longisporum*, acestea au fost infectate în mod artificial în laborator. Cercetările privind infecţia artificială au fost efectuate în cadrul Institutului de Fitopatologie şi Protecţia Plantelor de la Universitatea Georg August din Goettingen, Germania în timpul stagiului de mobilitate.

Infecţia s-a realizat în laborator, prin metoda tăierii vârfului rădăcinii plăntuţelor de rapiţă şi imersarea acestora într-o suspensie de spori de *V. longisporum*, conform protocolului descris de Enyck (2007). După infecţie, plantele au fost crescute în seră timp de o lună, iar săptămânal s-a făcut bonitarea bolii, prin acordarea de note de la 1 la 9 în funcţie de simptomele apărute.

a

b

c

Figura 6.22. Figure 6.22 Simptome de V. longisporum
a-Cloroze specifice pe frunzele mai bătrâne
b-Simtome caracteristice pe n stadiu mai avansat de atac
c- Simptom de piticire a plantelor de rapiţă (stânga – planta martor; dreapta – plantă infectată)/

În cele patru săptămâni de bonitare, la plantele infectate au putut fi observate simptome specifice bolii produse de *V. longisporum*, cum ar fi cloroze apărute pe frunzele mai bătrâne (figura 6.22a) în primele stadii ale bolii, cloroze laterale ale frunzei asociate cu ofilirea marginilor frunzei (figura 6.22b) în stadii mai avansate ale bolii, precum şi fenomenul de piticire a plantelor (figura 6.22c).

În urma testării rezistenţei celor 130 de cultivare la boala produsă de agentul patogen *Verticillium longisporum*, s-a observat o variaţie mare a rezistenţei cultivarelor

la atac, unele cultivare arătând o rezistenţă mai ridicată decât cea a cultivarului tolerant „Express” (figura 6.23), altele având o rezistenţă moderată şi unele cultivare care au demonstrat o sesibilitate mai mare decât cultivarul sensibil „Falcon” (figura 6.24).

Figura 6.23. Cultivar de rapiţă rezistent la atacul cu *V. longisporum* decât martorul „Express” - stanga- plantele control, iar în partea dreaptă se pot observa plantele infectate

După cum se poate observa în figura 6.23, un exemplu de cultivar cu rezistenţă mai mare la boala produsă de *V. longisporum*, este cultivarul „Skriveskii” , care în urma infecţiei artificiale, la 28 de zile de la infecţie a înregistrat valori AUDPC mai mici decât cultivarul „Express”.

Figura 6.24. Cultivar de rapiţă mai sensibil la atacul cu *V. longisporum* decât martorul „Falcon” - stanga- plantele infectate, iar în partea dreaptă –plantele control

Contrar acestuia, în figura 6.24 se poate observa un exemplu de cultivar cu rezistenţă scăzută, la care la 28 de zile de la infecţie 50% din plante s-au uscat.

6.3.1 Rezultate privind infecţia cultivarelor de rapiţă 1-39

Din cauza numărului mare de cultivare luate în studiu, infec ia s-a realizat în trei tranşe. La prima tranşă s-a realizat infec ia primelor 39 de cultivare.

Timp de o lună, plantele au fost bonitate săptămânal, prima bonitare fiind la 7 zile de la inoculare, iar următoarele la 14, 21 şi 28 de zile de la infecţie.

Datele obţinute în urma bonitărilor au fost analizate şi prelucrate cu ajutorul componentei EXCEL a pachetului Microsoft office, calculându-se pentru fiecare cultivar în parte valoarea AUDPC (Area Under Disease Progress Curve).

În cele patru săptămâni de bonitare, s-a observat o varia ie mare a nivelului de rezisten ă a cultivarelor testate la inocularea cu *V. longisporum*. Valorile AUDPC a cultivarelor martor „Express" şi „Falcon" au fost 0,79 şi respectiv 1,21.

Valorile AUDPC au fost cuprinse între 0,10 („*Brassica napus* Group 1") şi 2,83 („Norli"). Cele mai rezistente s-au dovedit a fi „*Brassica napus* Group 1", „Skriveskii", „Blagodatny", „Link"," Kievskii 216", „Libritta" şi „Lingot", cu valori ale AUDPC mai mici decât cultivarul „Express" (figura 6.25).

Rezisten ă medie la atacul *V. longisporum* a fost înregistrată la 12 de cultivare, acestea prezentând valori AUDPC situate între „Express" şi „Falcon". Din figura 6.25 se poate observa că 20 de cultivare au ob inut valori AUDPC mai mari decât cultivarul „Falcon", acestea dovedindu-se a fi foarte sensibile.

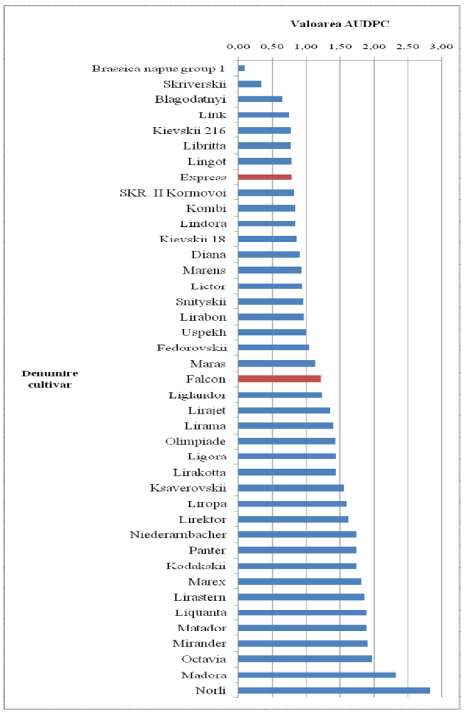


Figura 6.25 Rezistenţa cultivarelor 1-39 la inocularea cu *V. longisporum* comparativ cu martorii „Express" şi „Falcon" măsurate cu ajutorul AUDPC

Înăl imea medie a plantelor a variat şi ea la cele 39 de cultivare inoculate. Aceasta a întregistrat valori medii cuprinse 0,45 cm la cultivarul „Norli" care a fost cel mai sensibil la boală şi 18,25 cm, la cultivarul „Blagodatnyi", care se numără printre cele mai rezistente cultivare din această tranşă.

După cum se poate observa (figura 6.26.) înăl imea plantelor a fost invers propor ională cu valoarea AUDPC.

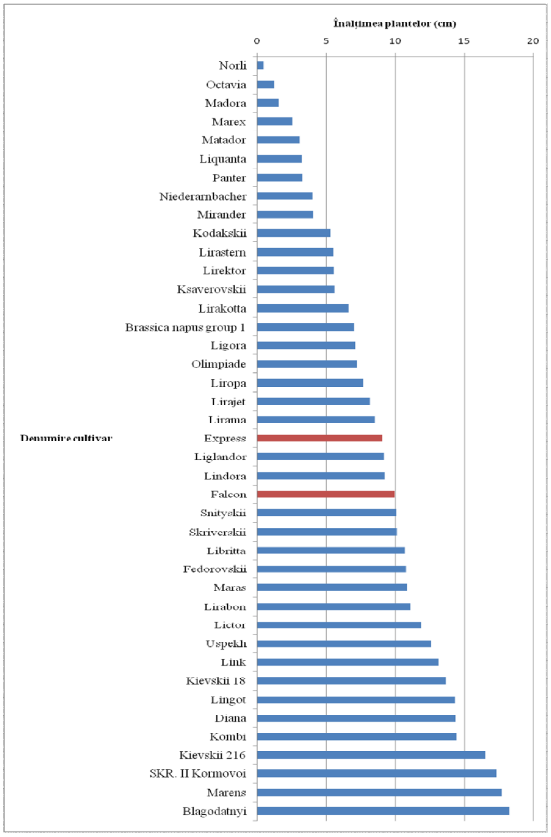


Figura 6.26 Înăl imea cultivarelor 1-39 infectate artificial, *comparativ cu martorii* Express şi Falcon

Unul din simptomele bolii este fenomenul de piticire a plantelor (Eynck Christina, 2008). Pentru a eviden ia influenţa atacului ciupercii asupra caracterelor morfologice a plantei, s-a calculat coeficientul de corela ie (figura. 6.21) dintre valoarea AUDPC şi înăl imea plantelor.

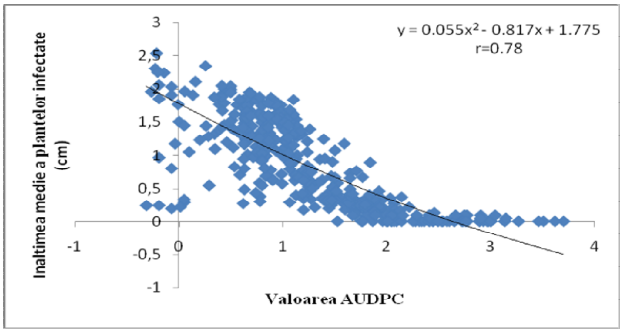


Figura 6.27 Corela ia între valoarea AUDPC calculată şi înăl imea plantelor la cultivarele de rapi ă 1-39

Coeficientul ob inut în cazul primelor 39 de linii are valoarea r =0,78, acesta indicând o corelaţie semnificativă, deci cu cât planta este mai atacată cu atât înălţimea acesteia va fi mai mică.

6.3.2. Rezultate privind infecţia cultivarelor de rapiţă 41-86

A două tranşă a infec iei a cuprins cultivarele 41-86. Condi iile pentru inoculare au fost identice cu cele folosite în prima tranşă.

Şi pentru această tranşă de infecţie am utilizat ca martor cultivarele „Falcon” (foarte sensibil) şi „Express” (tolerant). Cel mai rezistent la boala produsă de patogen a fost cultivarul „Tapidor” a cărui valoare AUDPC a fost de 0,38, iar cel mai sensibil a fost „*Brassica napus* group 2” înregistrând cea mai mare valoare AUDPC, de 1,87 (figura 6.28).

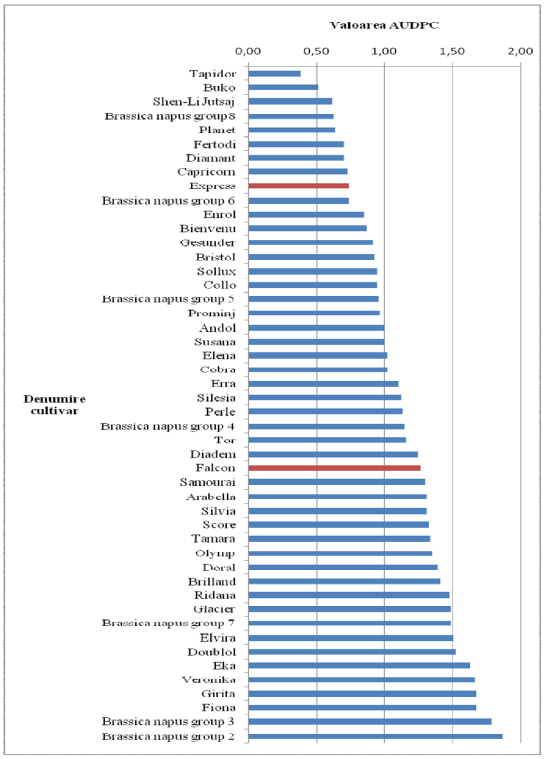


Figura 6.28 Rezistenţa cultivarelor 41-86 la inocularea cu *V. longisporum* comparativ cu martorii „Express” şi „Falcon” măsurate cu ajutorul AUDPC

În acest caz, 8 cultivare au fost considerate ca fiind mai rezistente decât martorul „Express”, acestea înregistrând valori AUDPC mai mici. Rezisten ă medie a fost înregistrată la 19 cultivare, cu valori AUDPC situate între valorile martorilor „Express” şi „Falcon” (figura 6.28), iar celelate 19 cultivare s-au dovedit a fi foarte sensibile înregistrând valori AUDPC mai mari decât „Falcon”.

Înăl imea medie a plantelor a variat între 0,71 cm la „Glacier” care s-a încadrat printre cele mai sesibile şi 14,5 cm la „Shen-Li Jutsaj” care s-a încadrat printre

cultivarele rezistente la atacul patogenului. În figura 6.29 se observă că la un nivel de atac ridicat, înăltimea plantei este mai mică.

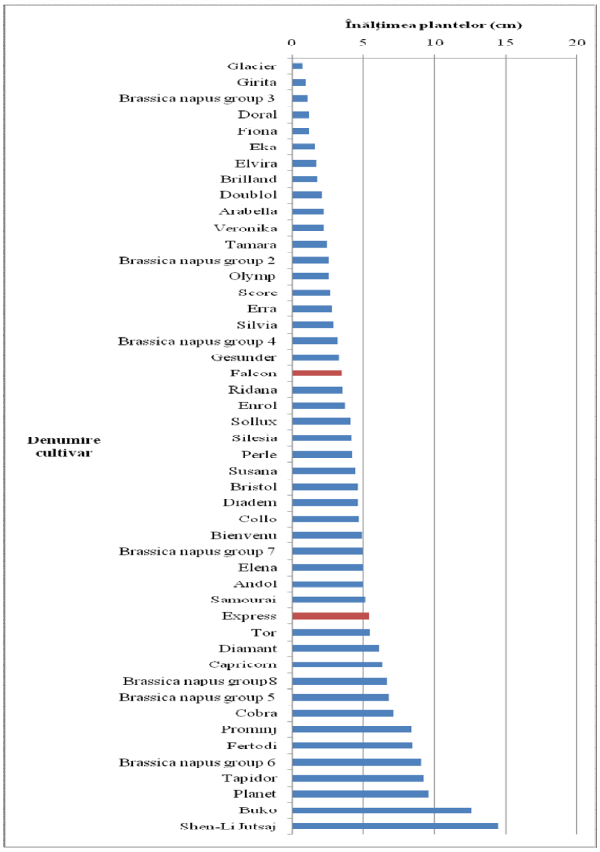


Figura 6.29 Înăl imea cultivarelor 41-86 infectate artificial, comparativ cu martorii „Express” şi „Falcon”

Pentru a eviden ia efectul bolii asupra caracterelor morfologice a plantei s-a calculat coeficientul de corela ie (figura 6.30) între valoarea AUDPC calculată şi înăl imea plantelor măsurată la 28 zile de la infec ie.

La cultivarele 41-86, coeficientul de corelaţie are valoarea r =0,789 ceea ce arată că şi în acest caz înăl imea plantelor este influenţată de gradul de atac al patogenului. Astfel, cu cât atacul va fi mai puternic, cu atât înălţimea plantelor va fi mai mică.

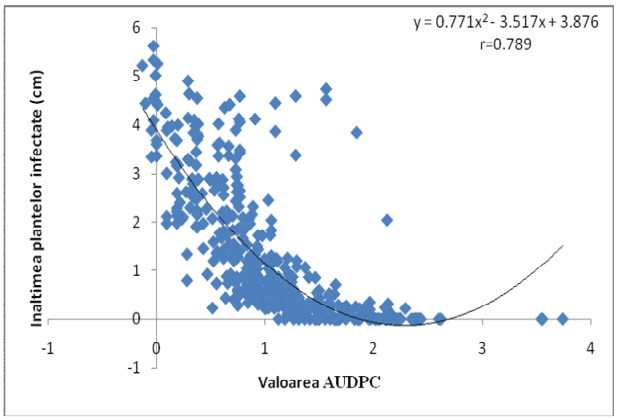


Figura 6.30 Corela ia între valoarea AUDPC calculată şi înăl imea plantelor la cultivarele 41-86

6.3.3. Rezultate privind infecţia cultivarelor de rapiţă 87-130

În ultima tranşă s-au infectat ultimele 41 de cultivare de rapi ă, condiţiile de experimentare fiind identice cu cele anterioare.

În urma realizării infec iei s-au ob inut valori AUDPC între 0,39 şi 2.78 (figura 6.31). În acest caz, un număr de şase cultivare au dovedit o rezistenţă mai ridicată la atacul agentului patogen, înregistrând valori ale AUDPC mai mici decât a martorului „Express" (tolerant). Astfel cele mai rezistente s-au dovedit a fi: „Kromerska", „Mansholts Hamburger", „Mytnickij", „Podol'skij Mestnij", „Nemercanskij 2268" şi „Bridger".

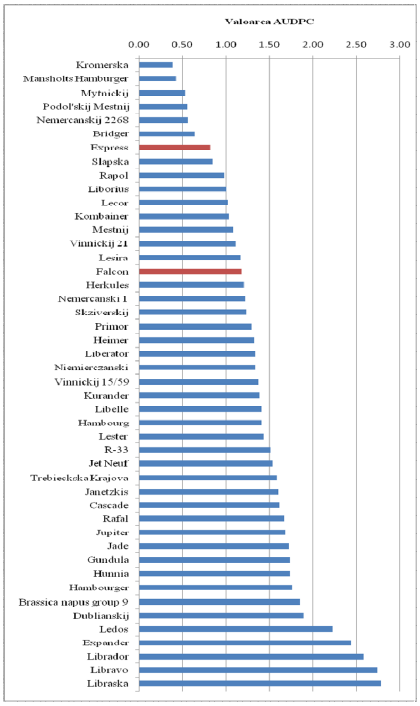


Figura 6.31 Rezistenţa cultivarelor 87-130 la inocularea cu *V. longisporum* comparativ cu martorii „Express" şi „Falcon" măsurate cu ajutorul AUDPC

Cu rezisten ă medie la atacul ciupercii s-au remarcat opt cultivare cu valori AUDPC cuprinse între „Express” şi „Falcon”. Cele mai multe cultivare (30) s-au dovedit a fi foarte sensibile, cu valori AUDPC mai mari decît în cazul cultivarului foarte sensibil „Falcon” (figura 6.31).

Înăl imea medie a plantelor a variat între 0,45 şi 13,60 cm (tabelul 6.11). Ca şi în celelalte cazuri, înăl imea a variat în funcţie de nivelul de atac al patogenului. Plantele mai puternic infestate au avut o înăl ime mai mică (fig. 6.32).

În cazul ultimei tranşe de infec ie, la cultivarele 87-130, coeficientul de corela ie ob inut are valoarea r =0,811 ceea ce arată că înăl imea plantelor este foarte mult infuen ată de nivelul de atac (figura 6.33).

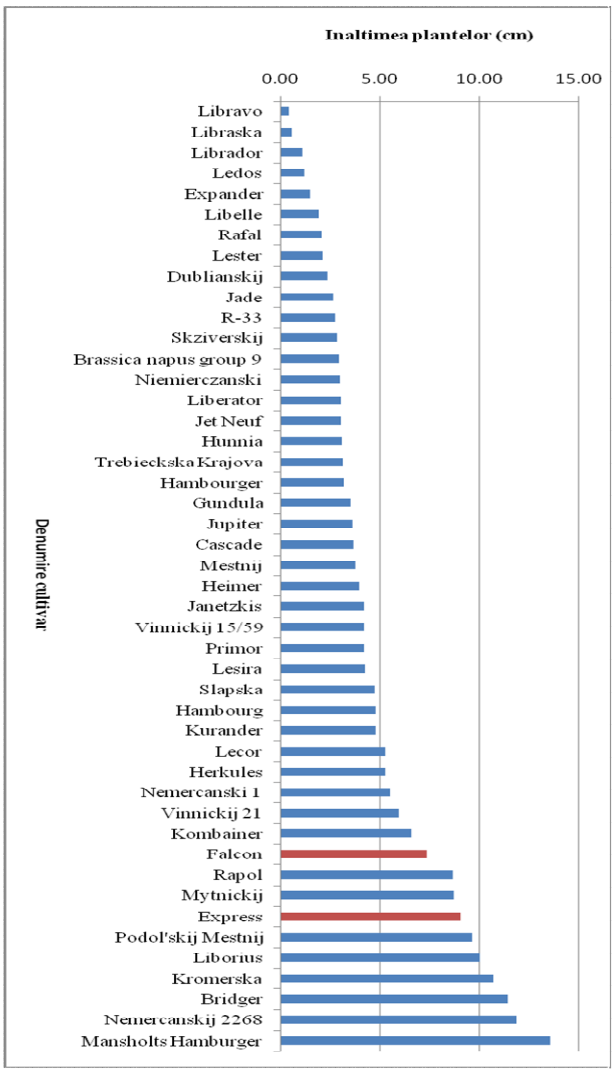


Figura 6.32 Înăl imea cultivarelor 87-130 infectate artificial, *comparativ cu martorii* „Express” şi „Falcon”

În cazul ultimei tranşe de infec ie, la cultivarele 87-130, coeficientul de corela ie ob inut are valoarea r =0,811 ceea ce arată că înăl imea plantelor este foarte mult infuen ată de nivelul de atac (figura 6.33).

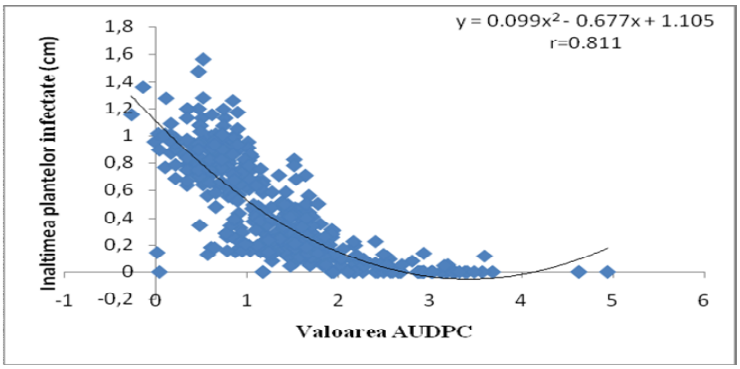


Figura 6.33 Corela ia între valoarea AUDPC calculată şi înăl imea plantelor la cultivarele 87-130

În urma realizării infecţiei artificiale a celor 130 de cultivare de rapiţă cu agentul patogen *Verticillium longisporum*, s-au identificat 21 de cultivare cu rezistenţă mai ridicată decât cultivarul tolerant„Express”.

Tabelul 6.2

Cultivarele cu rezisten ă mai mare la *V. longisporum*

Nr. Crt	Cultivar	Valoarea AUDPC (media)
-0-	-1-	-2-
1.	*Brassica napus* group 1	0.10
2.	Skriverskii	0.34
3	Blagodatnyi	0.64
4.	Link	0.75
5.	Kievskii 216	0.77
6.	Libritta	0.77
7.	Lingot	0.79
8.	Tapidor	0.38
9.	Buko	0.51
10.	Shen-Li Jutsaj	0.62
11.	Brassica napus group 8	0.63
12.	Planet	0.64
13.	Fertodi	0.70
14.	Diamant	0.70
15.	Capricorn	0.73
16.	Kromerska	0.39
17.	Mansholts Hamburger	0.42
18.	Mytnickij	0.53
19.	Podol'skij Mestnij	0.55
20.	Nemercanskij 2268	0.56
21.	Bridger	0.64

Evaluarea rezistenţei plantelor la atacul agentului patogen *V. longisporum* poate fi realizată, prin infecţie artificială în laborator sau în câmp.

În general, în studiile de specialitate, pentru infecţia artificială s-a utilizat fie metoda tăierii vârfului rădăcinii plantelor, urmată de imersia acestora în suspensie de conidii (Zeise, 1992; Koike şi colab., 1994; Subbarao şi colab., 1995; Zeise şi Buchmuller, 1997; Steventon şi colab., 2002b; Dunker şi colab., 2006), fie semănatul direct în câmpul infestat în prealabil cu microscleroţi ai agentului patogen (Debode şi colab., 2005; Dunker şi colab., 2008).

Metoda de inoculare în laborator, folosită iniţial, era ineficientă din punct de vedere al timpului necesar, întrucât se utilizau plante semănate anterior cu 14-30 de zile, iar bonitările erau realizate la 4, 6, 7 şi 10 săptămâni de la infecţie (Happstadius şi colab., 2003; Koike şi colab., 1994; Subbabao si colab., 1995).

Pentru a elimina acest impediment, Zeise (1992) a elaborat un protocol nou de infecţie. În cadrul acestuia, se utilizează plantele la 10 zile de la răsărire, iar bonitarea este realizată la 7, 14, 21 şi 28 de zile de la infecţie. În urma testării repetate a metodei, s-a constat că aceasta este mult mai rapidă, iar rezultatele obţinute sunt concludente (Eynck, 2007). Din acest considerent, pentru evaluarea rezistenţei celor 130 de cultivare de rapiţă, am utilizat protocolul descris de acesta. De asemenea, prin rănirea rădăcinilor plantelor şi imersarea acestora în suspensie de spori, se realizează o infecţie mai uniformă, ceea ce determină o bonitare mai exactă, îmbunătăţindu-se astfel reproductibilitatea rezultatelor.

Studii din literatura de specialitate au demonstrat că între infecţia realizată în seră şi cea din câmp există o corelaţie foarte mică, simptomele manifestate de boală în seră fiind diferite de cele manifestate în câmp. Un exemplu în acest sens este studiul realizat de Eynck Christina (2007), care a testat rezistenţa mai multor specii de *Brassica* la atacul agentului patogen *V. longisporum* atât în câmp cât şi în laborator. La rezultatele obţinute în cele două tipuri de infecţie corelaţia a fost mică.

Testele realizate în laborator permit evaluarea nivelului de rezisten ă a cultivarelor încă din primele stadii de dezvoltare ale plantei, selecţia putând fi realizată mai repede decît în cazul infecţiei în câmp, când identificarea acestora se face abia la sfârşitul perioadei de vegetaţie.

În urma testelor de rezistenţă efectuate în laborator, am observat o variaţie mare a nivelului de toleran ă a cultivarelor analizate, comparativ cu „Express” (tolerant) şi „Falcon” (foarte sensibil) folosite ca martori. Rezultate asemănătoare au fost obţinute şi în Germania, într-un studiu în care mai multe specii de *Brassica* au fost testate pentru rezistenţa la *Verticillium longisporum*. Cel mai ridicat nivel de rezistenţă a fost obţinut în cazul unor cultivare sintetice de *B. napus* provenite din încrucişarea interspecifică între *B. oleracea* şi *B. rapa (*Eynck, 2007).

Surse de germoplasmă cu rezistenţă la atacul agentului patogen *Verticillium longisporum* au mai fost identificate la specii de *B. oleracea* şi *B. carinata* (Debode şi colab., 2005; Zeise şi colab., 1997), acestea fiind deja utilizate în hibridări sintetice cu scopul de a transfera genele de rezistenţă la specia *B. napus* (Rygulla şi colab., 2007).

Din totalul cultivarelor testate în cazul experimentelor noastre, 16% au dovedit un nivel de rezistenţă mai ridicat, cu valori AUDPC mai mici decât cea a cultivarului „Express” (tolerant), iar 30 % au dovedit un nivel mai moderat cu valori AUDPC situate între „Express” şi „Falcon”.

6.4. Rezultate privind identificarea markerilor pentru SSR asociaţi cu rezistenţa cultivarelor de rapiţă la *V. longisporum*

Pentru realizarea analizelor bazate pe tehnica SSR, s-au utilizat 61 de markeri specifici, din care 51 au amplificat cel puţin o bandă polimorfică. Aceşti markeri au amplificat un număr total de 132 de fragmente polimorfice, cu mărimi cuprinse între 80 şi 340 bp (perechi de baze).

Imaginile obţinute în urma migrării produşilor amplificaţi cu fiecare marker în parte s-a vizualizat cu ajutorul programului *Saga generation versiunea 2 lite*.

Benzile au fost analizate manual, fiecare alelă identificată fiind notată cu cifra „1”, iar absenţa acesteia fiind notată cu cifra „0”. Datele au fost centralizate în Excel, realizându-se o matrice binară a tuturor liniilor luate în studiu.

Pentru identificarea unor markeri moleculari asociaţi cu rezistenţa plantelor de rapiţă la boala produsă de agentul patogen *V. longisporum*, s-au corelat datele fenotipice obţinute în urma infecţiei artificiale cu datele genotipice obţinute în urma aplicării tehnicii SSR.

Pentru realizarea corelaţiilor existente între cei 51 de markeri utilizaţi, s-a folosit metoda regresiei liniare simple, care determină existen a unei asocieri între markerul analizat şi caracterul studiat (în cazul de faţă, valoarea infecţiei calculată în AUDPC). Pentru efectuarea calculului statistic s-a utilizat programul SPSS v13.

Pentru efectuarea acestei analize, pentru fiecare cultivar în parte, s-a luat în considerare media valorilor AUDPC a celor 10 plante inoculate, ce a fost corelată cu valorile binare de la fiecare marker în parte, obţinute în urma amplificării SSR.

În vederea identificării markerilor pentru SSR asociaţi cu nivelul de rezistenţă a celor 130 de cultivare de rapiţă la *Verticillium longisporum*, am utilizat metoda de analiză unifactorială ANOVA. Cu ajutorul acestei metode, am identificat markerii care sunt semnificativi la o probabilitate P<0,05 %. Valoarea lui R^2 prezentată în tabelele 6.3 şi 6.4 indică proporţia variaţiei fenotipice explicată de markerul respectiv. Dacă valoarea lui **p** obţinută este mai mică decât 0,05 %, atunci markerul respectiv este semnificativ pentru rezistenţa la agentul patogen studiat.

În urma analizei datelor fenotipice reprezentate de valorile AUDPC şi a datelor moleculare rezultate în urma amplificării SSR, am obţinut un număr de 18 markeri asociaţi semnificativ cu nivelul de rezistenţă la agentul patogen (tabelul 6.5).

Cea mai mică valoare p (p=0) a fost ob inută la markerul Na12-C01. În acest caz, valoarea lui R^2 a fost de 0,093 ceea ce demonstrează că 9% din variaţia fenotipică a valorilor AUDPC este explicată de acest marker. Un alt marker asociat cu rezistenţa la *V. longisporum* a fost markerul Na12-B07, care a obţinut valoarea p=0, însă doar 1% din variaţia fenotipică este explicată de acest marker.

Tabelul 6.5

Markeri pentru SSR care sunt semnificativi cu rezistenţa cultivarelor la *V .longisporum*

Nr. Crt	Primer	R	R Square	Adjusted R Square	p-value	Semnificaţie
-0-	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-
1	Na10-G08_310	0.176	0.031	0.023	0.045	***

2	Na10-G08_320	0.175	0.03	0.023	0.047	***
3	Na12-C01_40	0.317	0.1	0.093	0	***
4	Na10-D11_220	0.268	0.072	0.065	0.002	***
5	Ol10-E12_280	0.256	0.066	0.058	0.003	***
6	MD 60_185	0.185	0.034	0.027	0.035	***
7	Na12-D08_140	0.188	0.035	0.028	0.033	***
8	Na12-D08_145	0.194	0.038	0.03	0.027	***
9	OL10-C10_190	0.217	0.047	0.04	0.013	***
10	Ol10-D01_270	0.188	0.035	0.028	0.032	***
11	Ol13-E08_170	0.176	0.031	0.024	0.045	***
12	OL10-E05_160	0.22	0.048	0.041	0.012	***
13	OL13-F08_145	0.18	0.032	0.025	0.04	***
14	Na12-B07_136	0.235	0.055	0.048	0.007	***
15	Na12-B07_146	0.342	0.117	0.11	0	***
16	Na12-B07_147	0.191	0.036	0.029	0.03	***
17	Ra12-E12_150	0.234	0.055	0.047	0.007	***
18	Ra12-E12_240	0.173	0.03	0.022	0.049	***

La analiza SSR am utilizat markeri ce au fost men iona i în studii anterioare în realizarea hărţilor genetice la rapiţă şi în identificarea de QTL pentru rezistenţă la agentul patogen.

În urma cercetărilor efectuate, am identificat 18 markeri care s-au corelat cu rezistenţa cultivarelor luate în studiu la agentul patogen *V. longisporum.* Din aceşti 18 markeri, o atenţie deosebită trebuie acordată markerilor Na12-C01_40, Na12-B07_145, Na10-D11_220, Ol10-E12_280, Na12-B07_136 şi Ra12-E12_150, care au obţinut o variaţie fenotipică mai mare de 5% pentru valorile AUDPC calculate în urma infecţiei artificiale.

Între aceşti markeri, markerul Na12-C01_40 a fost localizat pe cromozomul C5, unde a fost identificat primul QTL pentru rezistenţa rapiţei la *V. longisporum* într-o populaţie sintetică segregantă provenită din încucişarea a două specii diferite de *Brassica* (Rygulla şi colab. 2008).

Markerul Na10-G08, care în cazul cercetărilor noastre s-a dovedit a fi asociat cu rezistenţa la agentul patogen, a fost localizat pe cromozomul C5 într-un alt QTL de

rezistenţă la *V. longisporum*, într-o populaţie segregantă rezultată din încrucişarea unei linii sintetice cu cultivarul „Express” (tolerant la boală) tot de către Rygulla şi colaboratorii săi, în 2008.

Alt marker care, în cazul cultivarelor noastre a fost asociat cu rezistenţa la *V. longisporum* este markerul Ol10-E12. Acest marker a fost, de asemenea localizat pe cromozomul C1 într-un alt QTL identificat pentru rezistenţa la agentul patogen de către Obermeier şi colaboratorii (2012).

În studii anterioare, markerii pentru SSR (Na12-C01 şi Na10-G08) au fost localizaţi pe cromozomul C5, în care s-au identificat cele mai multe QTL pentru rezistenţă în diferite populaţii segregante (Rygulla şi colab., 2008; Obermeier şi colab., 2012). Aceeaşi markeri au arătat şi în cazul cercetărilor noastre, o asociere semnificativă cu rezistenţa cultivarelor studiate la *V. longisporum.* Faptul că aceste cultivare sunt foarte diferite din punct de vedere genetic demostrează că aceşti markeri sunt corelaţi cu genele ce conferă rezistenţă la acestă boală.

6.5 Întocmirea hărţii genetice şi identificarea unui QTL pentru rezistenţa la *Verticillium longisporum*

Cu ajutorul celor 139 de fragmente amplificate cu cei 51 de markeri pentru SSR a fost realizată o hartă genetică (figura 6.34), ce cuprinde 19 grupuri linkage şi are o lungime totală de 520,3 cM.

Mărimea medie a unui cromozom este de 26 cM (centimorgani), iar distanţa medie între markerii moleculari este de 10 cM. Cel mai mare grup linkage este LG 1, format din 5 markeri pentru SSR şi are o lungime de 57.7 cM. Cel mai scurt grup linkage este LG4, cu lungime de 12,6 cM şi este format doar din 2 markeri pentru SSR.

După cum se poate observa în figura 6.34, din cele 139 de fragmente folosite la întocmirea hărţii genetice, doar 34 s-au grupat în cadrul cultivarelor studiate. Motivul pentru care s-au grupat un număr atât de mic de fragmente este determinat de diversitatea genetică mare din cadrul cultivarelor.

Makerii pentru SSR care au fost utilizaţi pentru cultivarele luate în studiu au fost aleşi pe baza altor hărţi genetice realizate la rapiţă.

În acest sens, o parte din markerii SSR au fost aleşi pe baza studiilor realizate de Radoev şi colaboratorii săi (2008), în care aceştia au realizat o hartă genetică la o populaţie segregantă de rapiţă unde au identificat 60 de QTL asociaţi cu câteva trăsături morfologice cum ar fi: producţia, numărul de seminţe în silicvă, înălţimea plantelor, data începutului înfloritului, data sfârşitului înfloritului, durata de înflorire etc.

Alţi markeri pentru SSR utilizaţi au fost aleşi pe baza hărţii genetice efectuate de Basunanda şi colaboratorii (2008) la o populaţie de indivizi dublu haploizi în care au utilizat atât markeri pentru SSR cât şi markeri pentru AFLP.

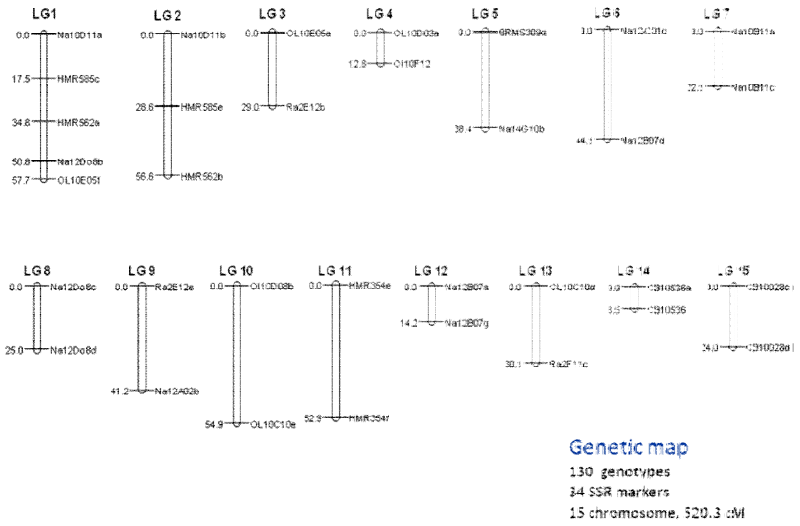


Figura 6.34 Harta genetică obţinută cu markerii pentru SSR utilizaţi

Însă, o serie de markeri, importanţi pentru obiectul nostru de studiu au fost aleşi din harta genetică realizată de Rygulla şi colaboratorii (2007) la o populaţie de linii sintetice de rapiţă, în care au identificat doi QTL asociaţi cu rezistenţa la *Verticillium longisporum*.

Pe baza acestor considerente, au fost aleşi cei 51 de markeri pentru SSR care au fost folosiţi pentru evaluarea genotipică a materialului biologic studiat.

Deşi, în harta genetică s-au grupat doar un număr mic de markeri, acesta este un prim pas în procesul de selecţie asistată de markeri în vederea obţinerii unor surse de germoplasmă cu rezistenţă la acest agent patogen.

Pentru identificarea segmentelor genomice care sunt implicate în exprimarea unor caractere cantitative, a fost efectuată analiza QTL. Localizarea QTL a fost efectuată cu ajutorul programului JOINMAP versiunea 3 având un prag de detectare (valoare LOD - *Logarithm of Odds*) de cel puţin 3,0. Rezultatele analizei QTL sunt rezumate în figura 6.35.

.

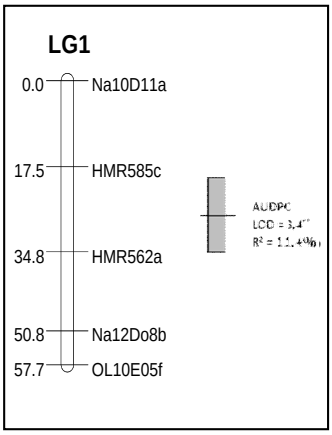


Figura 6.35 QTL identificat pentru rezistenţa la *Verticillium longisporum*

Cu ajutorul datelor genotipice obţinute prin analizarea fragmentelor SSR şi a datelor fenotipice reprezentate de valorile AUDPC rezultate în urma infecţiei pentru fiecare cultivar, s-a identificat un QTL pentru rezistenţa la *V. longisporum* poziţionat pe cromozomul 1 (LG1), având un scor LOD de 3,4 şi cu o valoare R^2 de 11,4%.

Valoarea R^2 indică faptul că prin acest QTL este explicat un procent de 11,4 % din variaţia fenotipică reprezentată de valorile AUDPC obţinute în urma infecţiei cu *V. longisporum*

Chiar dacă s-au utilizat doar 51 de markeri SSR, QTL din cercetările noastre de pe cromozomul C1 (grupul linkage 1) este localizat într-o regiune a genomului în care s-a mai identificat un QTL asociat cu rezistenţa la *V. longisporum* şi unul asociat cu conţinutul de compuşi fenolici din hipocotil ai plantelor atacate de acestă boală (Obermeier şi colab., 2012).

Aceste rezultate obţinute de Obermeier şi colaboratorii săi (2012) provin însă de la o populaţie segregantă de linii DH iar în cazul cercetărilor noastre, QTL-ul a fost identificat într-o populaţie cu indivizi diferiţi, ceea ce demnostrează că pe cromozomul 1 ar putea fi una din genele responsabile cu rezistenţa rapiţei la *V. longisporum*.

Rezistenţa plantelor de rapiţă la *V. longisporum* a mai fost studiată anterior, mulţi autori afirmând că rezistenţa ar fi controlată poligenic şi influenţată de mai mulţi factori (Happstadius şi colab., 2003; Rygulla şi colab., 2007 a,b, 2008; Enyck şi colab., 2009).

În această privinţă, au fost identificate 2 QTL majore asociate cu rezistenţa la *V. longisporum*, pe cromozomul 4 şi două OTL minore situate pe comozomul 6 şi 8, într-o populaţie de indivizi dublu haploizi ce au fost produşi din linii de rapiţă resintetizate (Rygulla şi colab., 2008).

Pentru obţinerea acestor QTL, s-au folosit cu succes datele fenotipice obţinute în urma infecţiilor artificiale din seră, ceea ce demonstrează că acest tip de testare a rezistenţei este o unealtă utilă în selecţia genotipurilor rezistente utilizate în ameliorare şi în identificarea QTL (Obermeier şi colab., 2012).

CAPITOLUL VII
CONCLUZII

Studiile efectuate în cadrul acestei teze de doctorat sunt foarte importante în vederea utilizării selecţiei asistată de markeri moleculari pentru obţinerea de soiuri şi/sau hibrizi de rapiţă cu rezistenţă genetică la boala produsă de agentul patogen *Verticillium longisporum*.

7.1 Concluzii privind evaluarea fenotipică a celor 130 de cultivare de rapiţă luate în studiu

Pentru evaluarea fenotipică a materialului biologic studiat, pentru fiecare cultivar s-au analizat o serie de caractere morfologice: înălţimea plantelor, numărul de ramificaţii, numărul de silicve pe plantă şi masa a o mie de boabe.

Ø Înălţimea plantelor a variat în limite mari între 144,97 cm la genotipul „Maras" şi 59,99 cm la „Manshlots Hambourger", cu o valoare medie de 113,82cm. S-au remarcat un număr de 29 de cultivare cu diferenţe semnificative pozitive faţă de martor (media experienţei), cum ar fi „Collo","Prominj", „Elena", etc., şi tot 29 de cultivare cu diferenţe semnificative negative faţă de martor, de exemplu: „Doral", „Herkules", „Lecor", etc.

Ø Numărul de ramificaţii pe plantă a variat între 13,67 la „Liglandor" şi 4 la „Olimpiade", valoarea medie fiind de 8,49. Aici s-au remarcat 4 de cultivare cu diferenţe foarte semnificative pozitive („Lesira", „Ridana", „*Brassica napus* group 4") faţă de martor (media), şi doar un cultivar cu diferenţe semnificative negative faţă de martor (Marex).

Ø Numărul de silicve pe plantă pentru fiecare cultivar a avut valori cuprinse între 1283 la „Libraska" şi 115 la „*Brassica napus* group 9" cu o valoare medie de 115 silicve pe plantă. În cazul acestui caracter 33 genotipuri („Collo", „Prominj", „Fiona) au înregistrat diferenţe foarte semnificative pozitive faţă de martor (media) şi 63 au avut diferenţe foarte semnificative negative faţă de martor („Diamant" , „Janetzkis" , „Kurander", etc.).

Ø Masa a o mie de boabe a fost cuprinsă între 7,89 grame la „Silesia" şi 3,24 grame la „Janetkis" cu o medie de 4,94 grame. În acest caz, 9 de cultivare („Silesia", „Jupiter", „Mansholts Hamburger", etc) au avut valori mai mari decât martorul cu diferenţe semnificative negative şi 8 au avut diferenţe foarte semnificativ negative faţă de martor („Mestnji", „Lesira", „Janetzkis", etc.).

7.2 Concluzii referitoare la determinarea diversităţii genetice a celor 130 de cultivare luate în studiu

Pentru determinarea diversităţii genetice amaterialului biologic studiat, s-au utilizat 20 de markeri pentru RAPD şi 51 de markeri pentru SSR. Folosind metoda UPGMA au generate două dendrograme, RAPD şi SSR, iar din corelaţia acestor două metode s-a generat a treia dendrograma RAPD+SSR.

Ø În cadrul dendrogramei RAPD, materialul biologic studiat s-a grupat în 6 clustere cu un coeficient de similaritate genetică cuprins între 0,51 şi 0,89;

Ø În cadrul dendrogramei SSR, genotipurile studiate s-au grupat în 10 clustere, coeficientul de similaritate fiind între 0,61 şi 0,91;

Ø În cazul dendrogramei RAPD+SSR s-au format 4 clustere cu un coeficient de similaritate între 0,61 şi 0,89. În cadrul acesteia, s-a observat că apar

grupate în acelaşi cluster o serie de cultivare care s-au dovedit a fi rezistente la atacul agentului patogen *V. longisporum* aşa cum este cazul genotipurilor „Libritta", „Skriverskii", „lingora" şi „Blagodatny".

7.3 Concluzii referitoare la testarea cultivarelor de rapiţă la infecţia cu agentul patogen *V. longisporum*

În ceea ce priveşte testarea cultivarelor de rapiţă studiate la rezistenţa atacului agentului patogen *V. longisporum*, s-au identificat 21 de cultivare cu rezistenţă mai ridicată la atacul patogenului decît cultivarul „Express" (tolerant la boală).

Aceste cultivare vor fi de interes în studiile ce vor urma, pentru identificarea genelor responsabile cu rezistenţa la atacul agentului patogen *V. longisporum*.

7.4 Concluzii referitoare la identificarea markerilor SSR asociaţi cu rezistenţa cultivarelor de rapiţă la atacul agentului patogen *V. longisporum*

În urma analizei celor 130 de cultivare de rapiţă cu 51 de markeri SSR, s-au identificat 18 markeri asociaţi cu rezistenţa acestora la atacul agentului patogen *V. longisporum*.

Dintre aceştia, markerii Na12-C01a, Na12-B07f, Na10-D11_220, Ol10-E12, Na12-B07a, Ra12-E12a, au obţinut o variaţie fenotipică mai mare de 5% pentru valorile AUDPC calculate în urma infecţiei artificiale cu *V. longisporum*.

Datorită faptului că, o parte dintre aceşti markeri s-au utilizat pentru obţinerea de QTL pentru rezistenţa la *V.longisporum* în populaţii segregante sintetice de rapiţă, iar în cazul cercetărilor din cadrul acestei lucrări s-au asociat de rezistenţa la infecţie la o populaţie diversă din punct de vedere genetic, prin acest studiu am demonstrat că, aceşti markeri sunt asociaţi cu genele de rezistenţă la *V. longisporum.*

7.5* Concluzii referitoare la identificarea unui QTL pentru rezistenţa la *V. longisporum

Folosind datele genotipice obţinute în urma aplicării tehnicii SSR s-a realizat o hartă genetică cu cuprinde 19 grupuri linkage şi are o lungime totală de 520,3 cM. Cel mai mare grup linkage este LG 1, format din 5 markeri pentru SSR şi are o lungime de 57.7 cM. Cel mai scurt grup linkage este LG4, cu lungime de 12,6 cM şi este format doar din 2 markeri pentru SSR.

În urma corelării datelor fenotipice, reprezentate de valorile AUDPC calculate în urma infecţiei şi a datelor genotipice rezultate în urma analizării fragmetelor amplificate cu markerii specifici pentru SSR, s-a obţinut un QTL pentru rezistenţa la *V. longisporum*. Acesta este poziţionat pe cromozomul 1 (LG1)şi are un scor LOD de 3,4 şi cu o valoare R^2 de 11,4%.

Acest QTL a fost localizat pe acelaşi cromozom, unde a mai fost identificat un QTL asociat cu rezistenţa la *V. longisporum* şi un QTL asociat cu conţinutul de compusi fenolici din hipocotil ai plantelor atacate de acestă boală.

BIBLIOGRAFIE

1. Adefris. T., Becker, H., 2006 - *Geographic pattern of genetic diversity among 43 Ethiopian mustard (Brassica carinata A. Braun) accessions as revealed by RAPD analysis*, Genetic Resources and Crop Evolution , nr 53, pag 1173–1185

2. Anon, 2006 - *Fungal diseases oilseed rape and turnip rape*, Swedish Board of Agriculture, pag. 48.

3. Arus, P. and Shields, C. R., 1983 - *Cole crops (Brassica oleracea L.), capitol în ''Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B''* (S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds.), pag. 339–350. Elsevier Science Publication, Amsterdam, Oxford, New York.

4. Atibalentja, N., Eastburn, D.M., 1998 - *Verticillium dahliae resistance in horseradish germ plasm from the University of Illinois collection*, Plant Disease, nr.82, pag. 176-180..

5. Axinte, M., Borcean, I., Roman, G.V., Muntean, L., 2006 – *Fitotehnie*, editura Ion Ionescu de la Brad, Iaşi.

6. Babadoost, M., Chen, W., Bratsch, A.D., Eastman, C.E., 2004 - *Verticillium longisporum and Fusarium solani: two new species in the complex of internal discoloration of horseradish roots*, Plant Pathology, nr.53, pag. 669-676.

7. Badani, AG, Snowdon, R., Baetzel, R., Horn, R., Friedt, W., 2003 - *QTL mapping for yellow seed colour in oilseed rape (Brassica napus)*, în Proc 11th Int Rapeseed Congr, July 2003, Copenhagen, Denmark, vol 1, pag. 85–87

8. Barabara, D.J., Clewes, E., 2003 - *Plant pathogenic Verticillium species: how many of them are there?*, Molecular Plant Pathology, nr.4, pag. 287-305.

9. Barabara, D.J., Morton, A., Miller, N.J., 2005 - *Isolation of micro satellite markers from an interspecific hybrid isolate of the fungal plant pathogen Verticillium dahlia*, Molecular Ecology Notes, nr.5, pag. 857-859.

10. Barret, P., Delourme, R., Foisset, N., Renard, M., 1998 - *Development of a SCAR (sequence characterisedamplified region)marker formolecular tagging of thedwarf BREIZH(Bzh) gene in Brassica napus L*, Theoretical Applied Genetics, nr.97, pag. 828–833.

11. Basunanda, P., Radoev, M., Ecke, W., Friedt, H., Becker, HC., Snowdon, RJ., 2010 - *Comparative mapping of quantitative trait loci involved in heterosis for seedling and yield traits in oilseed rape (Brassica napus L.)*, Theoretical Applied Genetics, nr. 120, pag. 271-281.

12. Basunanda, P., Spiller, TH., Hasan, M., Gehringer, A., Schondelmaier, J., Luhs, W., Friedt, W., Snowdon, R.J., 2007 – *Marker assisted increase of genetic diversity in a double-low seed quality winter oilseed rape genetic background*, Plant Breeding, nr. 126, pag. 581–587.

13. Becker, H.C., Dambaard, C., Kahrsson, B., 1992 - *Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (Brassica napus)*, Theoretical Applied Genetics, nr.84, pag. 303–306.

14. Becker, H.C., Engqvist, GM., Karlsson, B., 1995 - *Comparison of rapeseed cultivars and resynthesized lines based on allozyme and RFLP markers*, Theoretical Applied Genetics, nr.91, pag. 62–67.

15. Beckmann, C.H., 1987 - *The Nature of Wilt Diseases of Plants*, edit. St. Paul, Minisota, USA.

16. Bell, A.A., 1994 - *Mechanisms of disease resistance in Gossypium species and variation in Verticillium dahliae*, în: Constable, G.A., Forrester, N.W. (eds.) Challenging the future: Proceedings of the World Cotton Conference 1, Brisbane, Australia

17. Bishop, C.D., Cooper, R.M., 1983a - *An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases*, Physiological Plant Pathology, nr.22, pag. 15-27.

18. Bishop, C.D., Cooper, R.M., 1984 - *Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. II. Invasion of resistant cultivars*, Physiological Plant Pathology nr.24, pag. 277-289

19. Bîlteanu, Gh., Bârnaure, V., 1979 - *Fitotehnie*, Ed. Ceres Bucureşti.

20. Bîlteanu. G., 2001– *Fitotehnie*, vol.2, Ed Ceres, Bucureşti.

21. Bîrnaure, V., 1976 – *Fitotehnie*, Institutul agronomic Nicolae Bălcescu, Bucureşti.

22. Buckley, P.M., Wyllie, T.D., DeVay, J.E., 1969 - *Fine structure of conidia and conidium formation in Verticillium albo-atrum and V. nigrescens*, Mycologia, nr.61, pag. 240-250

23. **Burlacu (Arsene), Mădalina –Cristina**, Calistru, A., Leonte, C., 2011 *Evaluation of the genetic diversity among some oilseed rape Brassica napus cultivars revealed by RAPD markers compared with morphological traits evaluation*, Lucrări Şriinţifice, vol 55, Seria Argonomie.

24. **Burlacu (Arsene), Mădalina –Cristina,** Leonte, C., Lipsa, F., Lazarescu, E., 2012 - *Rezultate preliminare privind testarea virulentei unor tulpini de Verticillium longisporum la Brassica napus,* Revista "Lucrări Ştiinţifice" Seria Horticultură, vol…

25. **Burlacu (Arsene), Mădalina –Cristina,** Leonte, C., Lipsa, F., Simioniuc, D., Lazarescu, E., 2012 - *Identification of some cultivars of Brassica napus with resistance at Verticillium longisporum* Research Journal of Agricultural Science, vol.43, Timisoara.

26. **Burlacu (Arsene), Mădalina -Cristina**, Leonte, C., Morariu, A., Calistru, A., Siminoiuc, D., 2010 - *Researches regarding the analysis of the factors that influence the embryogenesis in microspore cultures of Brassica napus*, Lucrări Şriinţifice, vol 53, Seria Argonomie.

27. Campbell, C.L.; Madden, L.V., 1990 - *Introduction to Plant Disease Epidemiology*, edit. Willey, New York, USA.

28. Carşai, Crina, Vlaic, A., Coşier, V., Bîlteanu, A.V, 2009 – *Cercetări privind polimorfismul la locusul genei leptinei în scopul aplicării selecţiei asistate de markeri genetici la taurine*, edit. Online, Editura Bioflux, Cluj-Napoca.

29. Chen, B.Y.,Haneen, W.K., Jonsson, R.,1988 - *Resynthesis of Brassica napus L. through interspecific hybridization between B. Alboglabra Bailey and B. campestris L. with special emphasis on seed color*, Plant Breeding, nr.101, pag. 52–59.

30. Chen, P., Lee, B., Robb, J., 2004 - *Tolerance to a non-host isolate of Verticillium dahliae in tomato*, Physiological and Molecular Plant Pathology, nr.64, pag. 283-291.

31. Chèvre, A.M., Delourme, R., Eber, F., Powell, A., 1991a - *First results of rapeseed variety identification by isozyme electrophoresis*, Cruciferae Newsletter, nr. 14/15, pag. 70–71.

32. Clewes, E., Barbara, D.J., 2005 - *Hopeful monsters*, în Program and Book of Abstracts of the Ninth International *Verticillium* Symposium. California, USA, 17-21 June, p.18.

33. Collard, B.C.Y., Macem E., McPhail M, Wenzl P, Cakir M, Fox G, Poulsen D, Jordan D, 2009 - *How accurate are the marker orders in crop linkage maps generated from large marker datasets?,* Crop Pasture Science,nr.60, pag. 362-372.

34. Collins, A, Okoli, C A N, Morton, D, Parry, D, Edwards, S G, Barbara, D J, 2003 - *Isolates of Verticillium dahliae pathogenic to crucifers are of three different molecular types*, Phytopathology, nr.93, pag. 64-376.

35. Concibido, V.C., Secor, G.A., Jansky, S.H., 1994 - *Evaluation of resistance to Verticillium wilt in diploid, wild potato interspecific hybrids*, Euphytica, nr.76, pag. 145-152

36. Cooper, R.M., Resende, M.L.V., Flood, J., Rowan, M.G., Beale, M.H., Potter, U. , 1996 - *Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease resistant genotypes of Theobroma cacao*., Nature, nr.246, pag. 309-311.

37. Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A., Geiger, J.P., 1997 - *Early vascular defence reactions of cotton roots infected with defoliating mutant strain of Verticillium dahliae*, European Journal of Plant Pathology, nr.103, pag.125-136

38. Dakin, E.E., & Avise, J.C., 2004 - *Microsatellite null alleles in parentage Analysis*, Heredity, nr.93, pag. 504 – 509;

39. Das, S, Roscoe, T.J, Delseny, M, Srivastava, P.S, Lakshmikumaran, M., 2003 - *Cloning and molecular characterization of the fatty acid elongase 1 (FAE 1) gene from high and low erucic acid lines of Brassica campestris and Brassica oleracea*, Plant Sciences, nr.162, pag. 245–250.

40. De Lorenzo, G., D`Ovidio, R., Cervone, F., 2001 - *The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi*, Annual Review of Phytopathology, nr.39, pag. 313-335

41. Debode, J., Declercq, B., Höfte, M., 2005 - *Identification of cauliflower cultivars that differ in susceptibility to Verticillium longisporum using different inoculation methods*, Journal of Phytopathology, nr.153, pag. 257-263.

42. Demeke, T., Adams, R.P, and Chibbar, R., 1992 - *Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): A case study in Brassica*. Theoretical and Applied Genetics, nr.84, pag. 990–994.

43. Demeke, T., Adams, R.P., Chibbar, R., 1992 - *Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in Brassica*, Theoretical Applied Genetics, nr. 84, pag. 990–994.

44. Denford, K.E,. and Vaughan, J.G., 1977 - *A comparative study of certain seed isoenzyme in the ten chromosome complex of Brassica campestris and its allies*, Annals of Botany, nr. 41, pag. 411–418.

45. Dice, L.R., 1945 - *Measures of the amount of ecologic association between species*, Ecology, nr.26, pag. 297-302.

46. Diederichsen, E., Sacristan, M.D, 1996- *Disease response of resyn-thesized Brassica napus L. lines carrying different contribu-tions of resistance to Plasmodiophora brassicae*, Plant Breeding, nr.115, pag. 5–10.

47. Diers, B.W, McVetty, P.B.E., Osborn, T.C, 1996 - *Relationship between heterosis and genetic distance based on restriction fragment length polymorphism markers in oilseed rape (Brassica napus L.*), Crop Science, nr.36, pag. 79–83.

48. Dimond, A.E., 1970 - *Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome, Annual Review of Phytopathology*, nr.8, pag. 301-322.

49. Dion, Y, Gugel, R.K, Rakow, G.F.W, SeguinSwartz, G., Landry, B.S., 1995 - *RFLP mapping of resistance to the blackleg disease [causal agent, Leptosphaeria maculans (Desm) Ces, et de Not] in canola (Brassica napus L)*, Theoretical Applied Genetics, nr.91, pag. 1190–1194.

50. Dixelius, C., Happstadius, I., Berg, G., 2005 - *Verticillium wilt on Brassica oil crops – a swedish perspective*, Journal of the Swedish Seed Association, nr.115, pag.36-48.

51. Dixon, G.R., Pegg G.F.,1972 - *Changes in the amino acid content of tomato xylem sap following infection with strains of Verticillium albo-atrum*, Annals of Botany, nr. 36, pag. 147-154.

52. Downey, R.K, Röbbelen, G., 1989 - *Brassica species*, capitol în: Röbbelen, G, Downey, R, Ashri, A,- *Oil Crops of the World*, ed. McGraw-Hill, New York, pag. 339–382.

53. Downey, R.K. ,1990 - *Brassica oilseed breeding: achievements and opportunities*, Plant Breeding Abstract, nr.60, pag. 1165–1170.

54. Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1987 - *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochemical Bulletin, nr.19, pag.11-15.

55. Dreyer, F., Graichen, K., Jung, C., 2001 - *A major quantitative trait locus for resistance to Turnip Yellows Virus (TuYV, syn. beetwesternyellowsvirus,BWYV) in rapeseed,* Plant Breeding, nr.120, pag. 457–462

56. Dubery, I.A., Slater, V., 1997 - *Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from Verticillium dahliae*, Phytochemistry nr.44, pag. 1429-1434

57. Dunker, S., Keunecke, H., Steinbach, P., von Tiedemann, A., 2008 - *Impact of Verticillium longisporum on yield and morphology of winter oilseed rape (Brassica napus) in relation to systemic spread in the plant*, Journal of Phytopathology, nr. 15, pag. 698-707.

58. Eastburn, D.M., Chang, R.J., 1994 - *Verticillium dahliae: a causal agent of root discoloration of horseradish in Illinois*, Plant Disease, nr.78, pag.496-498.

59. Eastburn, D.M., Paul, V.H., 2007 - *Verticillium wilt. In: Compendium of Brassica Diseases* pag. 47-50. Eds S R Rimmer, V I Shattuck and L Buchwaldt., St Paul, MN: APS.

60. Ecke, W, Uzunova, M., Weissleder, K., 1995 - *Mapping the genome of rapeseed (Brassica napus L.). 2: Localization of genes controlling erucic acid synthesis and seed oil content*, Theoretical Applied Genetics, nr.91, pag. 972–977.

61. Eynck Christina, 2007 - *Identification of resistance sources and characterization of resistance factors in Brassica species to Verticillium longisporum*, Teza de doctorat, GeorgAugust University, Germay.

62. Eynck, C, Koopmann B, Grunewaldt-Stöcker G, Karlovsky P, von Tiedemann A., 2007 - *Differential interactions of Verticillium longisporum and Verticillium dahliae with Brassica napus detected with molecular and histological techniques*, European Journal of Plant Pathology, nr.118, pag. 259-274

63. Fahleson, J., Hu, Q., Dixelius, C., 2004 - *Phylogenetic analysis of Verticillium species based on nuclear and mitochondrial sequences*, Archives of Microbiology, nr.181,pag. 435-442.

64. Fahleson, J., Lagercrantz, U., Hu, Q., Steventon, L.A., Dixelius, C., 2003 - *Estimation of genetic variation among Verticillium isolates using AFLP analysis*, European Journal of Plant Pathology, nr.109, pag. 361-371.

65. Ferreira ME, Satagopan J, Yandell BS,Williams PH, Osborn TC., 1995b - *Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in Brassica napus*. Theoretical Applied Genetics, nr.90, pag. 727–732.

66. Ferreira, M.E, Rimmer, S.R, Williams, P.H, Osborn, T.C. 1995a - *Mapping loci controlling Brassica napus resistance to Leptosphaeria maculans under different screening conditions*, Phytopathology, nr.85, pag. 213–217.

67. Ferreira, M.E, Williams, P.H, Osborn, T.C., 1994 - *RFLP mapping of Brassica napus using doubled haploid lines*, Theoretical Applied Genetics, nr.89, pag. 615–621.

68. Foisset, N., Delourme, R., Barret, P., Hubert, N., Landry, B.S., Renard, M., 1996 - *Molecular-mapping analysis in Brassica napus using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled haploid progeny*, Theoretical Applied Genetics, nr.93, pag. 1017–1025.

69. Foisset, N., Delourme, R., Barret, P., Renard, M., 1995 - *Molecular tagging of the dwarf BREIZH (BZH) Gene in Brassica napus,* Theoretical Applied Genetics, nr.91 pag. 756–761.

70. Fourmann, M., Barret, P., Renard, M., Pelletier, G., Delourme, R., Brunel, D., 1998 - *The two genes homologous to Arabidopsis FAE1 co-segregate with the two loci governing erucic acid content in Brassica napus*, Theoretical Applied Genetics, vol.. 96, pag. 852–858

71. Fradin, E.F., Thomma, B.P.H.J., 2006 - *Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by V. dahliae and V. albo-atrum,* Molecular Plant Pathology, nr.7, pag. 71–86.

72. Friedt, W., 1997 – Oilseed rape, capitol în Vol.lman J., Rajcan I.,2009 - *Handbook of plant breeding – oil crops,* ed. Springer Dordrecht Heidelberg, New York.

73. Friedt, W., Leckband, G., Frauen, M., 2004 - *NAPUS 2000 – Research for an overall improvement in rapeseed,* Information journal, nr. 15, pag. 295–297

74. Friedt, W., Lühs, W., 1998 - *Recent developments and perspectives of industrial rapeseed breeding,* Fett/Lipid, nr.100, pag. 219–226

75. Friedt, W., Lühs, W., Müller, M., Ordon, F., 2003 - *Utility of winter oilseed rape (Brassica napus L.) cultivars and new breeding lines for low-input cropping systems,* German Journal Agronomy, nr.7, pag. 49–55

76. Gaddlers, P.,2009 - *Research Review No. 72 - Relevance of verticillium wilt (Verticillium longisporum) in winter oilseed rape in the UK,* ADAS Boxworth, Boxworth, Cambridge CB23 4NN.

77. Garber, R.H., and Houston, B.R., 1966 - *Penetration and development of Verticillium alboatrum in the cotton plant,* Phytopathology, nr.56, pag. 1121-1126.

78. Gold, J., Lee, B., Robb, J., 1996 - *Colonization of tomatoes by Verticillium dahliae: determinative phase II,* Canadian Journal of Botany, vol 74, pag.1279-1288

79. Gold, J., Lee, B., Robb, J., 1996 - *Colonization of tomatoes by Verticillium dahliae: determinative phase II,* Canadian Journal of Botany, nr. 74, pag. 1279-1288.

80. Gold, J., Robb, J., 1995 - *The role of the coating response in Craigella tomatoes infected with Verticillium dahliae, races 1 and 2,* Physiological and Molecular Plant Pathology, nr.47, pag. 141 157

81. Gordon, T.R., Kirkpatrick, S.C., Hansen, J., Shaw, D.V., 2006 - *Response of strawberry genotypes to inoculation with isolates of Verticillium dahliae differing in host origin,* Plant Pathology, nr.55, pag. 766-769.

82. Graboski, M.S., McCormick, R.L., 1998 - *Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines,* Progress in Energy and Combustion Science, nr.24, pag.125–164.

83. Green, R.J.J., 1981 – capitol în : Mace, M.E, Bell, A.A, Beckman, C.H (eds.) *Fungal Wilt Diseases of Plants,* Academic Press, New York, pag. 1-24

84. Gupta, S.K, Röbbelen, G., 1986 - *Identification of rapeseed (Brassica napus) cultivars by electrophoresis,* Zeitschrift Pflanzenzüchtg, 96:363–370

85. Gustafson, I.-B., Haglund, A. and Johannsson, L., 1993 - *The taste of rapeseedoil- based dietary fat was superior to that based on sunflower oil when used for frying and cooking,* Scandinavian Journal Nutrition, nr.37, 67 -69.

86. Hackenberg, E.M., Mündges-Christmann, H., Köhler, W., 1990 - *Enzymmarker als Selektionshilfe in der Rapszüchtung,* Vortr Pflanzenzüchtg 18:158–172

87. Hahlbrock, K, Scheel, D., 1989 - *Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism,* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, nr. 40, pag. 347-369

88. Hajkova, P., Hruby, J., Pernova, E., Curn, V. and Zaludova, J., 2005 - *Monitorig peˇstebnı´ch ploch, prˇenos a detekce transgenu° geneticky modifikovane´ rˇepky olejky (Rassica napus L. var. napus)*, Sbornı´k veˇdecky´ch pracı´ VU´ P Troubsko, nr.15, pag. 93–100.

89. Hallden, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M., Sall, T., 1994 - *Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of Brassica napus breeding lines*, Theoretical Applied Genetics, nr.*88*, pag.123–128.

90. Hansen, L. B., Siegismund, H. R. and Jorgensen, R. B. , 2001 - *Introgression between oilseed rape (Brassica napus L.) and its weedy relative B. rapa L. in a natural population*, Genetic Resources and Crop Evolution, nr.48, pag. 621–627.

91. Hansen, L. B., Siegismund, H. R. and Jorgensen, R. B., 2003 - *Progressive introgression between Brassica napus (oilseed rape) and B. rapa*, Heredity, nr.91, pag.276–283.

92. Happstadius, I., Ljungberg, A., Kristiansson, B., Dixelius, C., 2003 - *Identification of Brassica oleracea germplasm with improved resistance to Verticillium wilt*. Plant Breeding nr.122, pag. 30–34

93. Hasan, M, Lühs, W., Seyis, F., Friedt, W., Snowdon, R., 2003 - *Surveying genetic diversity in the Brassica napus gene pool using SSR markers*. In: Proc 11th Int Rapeseed Congr, Copenhagen, July, nr.2, pag 392–394

94. Hasan, M., Seyis, F., Badani, A.G., Pons-Kühnemann, J., Friedt, W., Lühs, W., Snowdon, R.J., 2006 - *Analysis of genetic diversity in the Brassica napus L. gene pool using SSR markers*, Genetic Resources and Crop Evolution, nr. 53, pag. 793-802.

95. Hastie, A.C., Heale, J.B., 1981 - *Genetics of Verticillium*. In: Crulli, M. (ed.) *Pathobiology of Verticillium species*, Mediterranean Phytopathological Union, Firenze, Italy, pag. 36-68

96. Heale, J.B., 2000 - *Diversification and speciation in Verticillium* – capitol în: Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel D.R - *Advances in Verticillium research and disease management*, ed. St. Paul, Minnesota, APS Press, pag. 175-177.

97. Heale, J.B., Karapapa, V.K., 1999 - *The Verticillium threat to Canada`s major oilseed crop: Canola*, Canadian Journal of Plant Pathology, nr.21, pag. 1-7.

98. Heinz, R., Lee, S.W., Saparno, A., Nazar, R.N., Robb, J., 1998 - *Cyclical systemic colonization in Verticillium-infected tomato*, Physiological and Molecular Plant Pathology, nr.52, pag. 385-396.

99. Hinata, K., Nishio, T., 1978 - *S-Allele specificity of stigma proteins in Brassica oleracea and B. campestris*, Heredity, vol.41, pag. 93–100.

100. Hoenecke, M., Chyi, Y.S., 1991 - *Comparison of Brassica napus and B. rapa genomes based on restriction fragment length polymorphism mapping* în Proc 8th Int Rapeseed Congress, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 4:1102–1107

101. Howell, P.M., Sharpe, A.G., Lydiate, D.J., 2003 - *Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (Brassica napus*), Genome nr.46, pag. 454–460

102. Hu, J, Li D, Struss, D, Quiros, CF., 1999 - *SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon fatty acids in rapeseed, Brassica napus, Plant Breeding*, nr.118, pag. 145–150.

103. Huisman, O.C., 1982 - *Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of rootinvading fungi*, Annual Review of Phytopathology, nr.20, pag. 303-327.

104. Isaac, I., 1957 - *Verticillium wilt of Brussels sprout*, Annals of Applied Biology, nr.45, pag. 276-283.

105. Jain, S.K., 1979 - *Estimation of outcrossing rates: some alternative procedures. Crop Sciences*, nr.19, pag. 23–27.

106. Jansky, S., 2000 - *Breeding for disease resistance in potato,* Plant Breeding Review, nr. 19, pag. 69-155.

107. Jansky, S., Rouse, D.I., 2003 - *Identification of potato interspecific hybrids resistant to Verticillium wilt and determination of criteria for resistance assessment. Potato Research*, nr. 43, pag. 239-251

108. Johannson, A., Fahleson, J., Zhou, L., Hu, Q., Dixelius, C., 2003 - *Genomic characterisation of Verticillium longisporum*, Eigth International Congress on Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, 2-7 Feb 2003, p. 347.

109. Johannson, A., Goud, J.-K., Dixelius, C., 2005 - *Plant host range of Verticillium longisporum and microsclerotia density in Swedish soils*, European Journal of Plant Pathology, nr.114, pag. 139 149

110. Johannson, Anna – 2006 - *Verticillium Longisporum, Infection, Host Range, Prevalence and Plant Defence Responses***,** Licentiate thesis Swedish University of Agricultural Sciences.

111. Johansson, Anna, Goud, J., and Dixelius, C., 2006 - *Plant Host Range of Verticillium longisporum and Microsclerotia Density in Swedish Soils*, European Journal of Plant Pathology, nr.114(2), pag. 139-149.

112. Jolivet, P., 1993 - Elemental sulfur in agriculture, In: De Kok, L., Stulen, I., Rennenberg, H.,

113. Jones, D.H., 1984 - *Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development*, Phytochemistry, nr.23, pag.1349-1351.

114. Joost, O., Bianchini, G., Bell, A.A., Benedict, C.R., Magill, C.W., 1995 - *Differential induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in two cotton species following inoculation with Verticillium*, Molecular Plant-Microbe Interactions nr.8, pag. 880-885

115. Jourdan, P.S, Earle E.D., Mutschler M.A., 1989 - *Synthesis of male sterile, triazine-resistant B. napus by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile B. oleracea and atrazineresistant B. campestris*, Theoretical Applied Genetics, nr.78, pag.445–455.

116. Jourdan, P.S, Earle, E.D, Mutschler M.A, 1989 - *Synthesis of male sterile, triazine-resistant B. napus by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile B. oleracea and atrazineresistant B. campestris*, Theoretical Applied Genetics, nr.78, pag. 445–455.

117. Jourdren, C., Barret, P., Brunel, D., Delourme, R., Renard, M., 1996 - *Specific molecular marker of the genes controlling linolenic acid content in rapeseed*, Theoretical Applied Genetics, nr.93, pag. 512–518.

118. Karapapa, V.K., Bainbridge, B.W., Heale, J.B., 2000 - *Classical and molecular characterization of the new species of Verticillium longisporum (V. dahliae var. longisporum*, capitol în: Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel D.R - *Advances in Verticillium research and disease management*, ed. St. Paul, Minnesota, APS Press, pag. 196-203.

119. Karapapa, VK, Bainbridge, BW, Heale JB, 1997 - *Morphological and molecular characterisation of Verticillium longisporum comb. nov., pathogenic to oilseed rape*, Mycological Research, nr.101, pag. 1281- 1294.

120. Kawchuk, L.M., Hachey, J., Lynch, D.R., Klcsar, F., van Rooijen, G., Waterer, D.R., Robertson, A., Kokko, E., Byers, E., Howard, R.J., Fischer, R., Prüfer, D. ,

2001 - *Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors*, Proceedings of the National Academy of Science USA 98, pag. 6511-6515

121. Kelly, AL., Sharpe, AG., Nixon, JH., Evans, EJ., Lydiate, DJ., 1997, - *Indistinguishable patterns of recombinationresulting from mate and female meioses in Brassica napus (oilseed rape)*, Genome, nr. 40, pag. 49–56.

122. Kemmochi, I., Kobayashi, I., Tsuchiya, M., Sakai, H., Shimizu, M., 2000 - Breeding materials for resistance to Verticillium wilt in Japanese cabbage (Brassica oleracea L. var. capitata), Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, nr.69, pag. 483.

123. Kerlan, M. C., Chevre, A. M. and Eber, F., 1999 - *Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (Brassica napus) and related species cytogenetical characterization and detection of the transgene*, Genome, nr. 36, pag. 1099–1106.

124. Kimber, D, McGrego,r D.I., 1995 - *Brassica Oilseeds: Production & Utilisation*, ed CAB,Wallingford, UK.

125. Koike, S.T., Subbarao, K.V., Davis, R.M., Gordon, T.R., Hubbard, J.C., 1994 – Verticillium wilt of cauliflower in California, Plant Disease, nr.78, pag. 1116-1121.

126. Kole, C., 2007 - *Genome mapping and molecular breeding in plants*, Vol.ume 2 – Oilseeds, ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pag. 55-103.

127. Kole, C., Williams, P.H., Rimmer, S.R, Osborn, T.C., 2002b - *Linkage mapping of genes controlling resistance to white rust (Albugo candida) in Brassica rapa (syn. campestris) and comparative mapping to Brassica napus and Arabidopsis thaliana*, Genome, nr.45, pag. 22–27

128. Körbitz, W., 1995 – *Utilization of oil as a biodiesel fuel*, capitol în In:Kimber, D., McGregor - *Brassica Oilseeds*, ed CAB,Wallingford, UK, pag. 339–352.

129. Kresovich, S., Szewc-McFadden, A. K., Bliek, S. M. and McFerson, J. R., 1995 - *Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolates from a size-fractionated genomic library of Brassica napus L. (rapeseed)*, Theoretical and Applied Genetics 91, 206–211.

130. Kresovich, S., Williams, J. G. K., McFerson, J. R., Routman, E. J. and Schaal, B. A. , 1992 - *Characterization of genetic identities and relationships of Brassica oleracea L. via a random amplified polymorphic DNA assay*, Theoretical and Applied Genetics nr.85, pag. 190–196.

131. Kresovich, S., Williams, J.G.K., McFerson, J.R., Routman ,E.J., Schaal, B.A., 1992 - *Characterization of genetic identities and relationships of Brassica oleracea L. via a random amplified polymorphic DNA assay*, Theoretical Applied Genetics, nr. 85, pag. 190–196.

132. Kroll, H.,1994 - *Ein archäologischer Rapsfund des 16. Jahrhunderts, entdeckt in Heide in Holstein, Norddeutschland*, Journal of Agronomy Crop Sciences, nr.173, pag. 17–21

133. Krüger, W .,1989 - *Untersuchungen zur Verbreitung von Verticillium dahliae Kleb. und anderen Krankheits- und Schaderregern bei Raps in der Bundesrepublik Deutschland*, Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, nr.41, pag.49 56.

134. Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., Pandey, B.K., 2009 - *Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology*, Plant Omics Journal, nr.2(4), pag. 141-162.

135. Landry BS, Hubert N, Etoh T, Harada JJ, Lincoln SE., 1991- *Ageneticmap for Brassica napus based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences*, Genome , nr.34, pag. 543–552.

136. Lee, S.W., Nazar, R.N., Powell, D.A., Robb, J., 1992 - *Reduced PAL gene suppression in Verticillium-infected resistant tomatoes*, Plant Molecular Biology, nr. 18, pag. 345-352

137. Leonte ,C., 1997 – Ameliorarea plantelor horticole şi tehnică experimentală, Lucrări practice, Lito, Univ. Agronomică, Iaşi.

138. Leonte, C., 2011 – Tratat de ameliorarea plantelor, edit. Academiei Române, Bucureşti.

139. Leonte, C., **Burlacu (Arsene), M**., Simioniuc, D., Vatav,u R., Calistru, A., 2010- *Evaluation of the genetic similarity of some Brassica napus cultivars using Rapd markers*, Environmental Engineering and Management Journal, nr.9.

140. Li, W.N., Wu, R.X., 1997 - *RAPD molecular markers and genetic diversity among 40 cultivars of Brassica napus in China*, Chinese Biodiversity,nr. *5*, pag. 246–250.

141. Litt, M, Luty, JA., 1989 - *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*, Am Journal of Humain Genetics, nr.44, pag. 97–401.

142. Lynch, D.R., Kawchuk, L.M., Hachey, J., Bains, P.S., Howard, R.J., 1997 - Identification of a gene conferring high levels of resistance to Verticillium wilt in Solanum chacoense. Plant Disease 81, 1011-1014

143. Mace, M.E., Stipanovic, R.D., Bell, A.A., 1990 - *Relation between sensitivity to terpenoid phytoalexins and virulence to cotton of Verticillium dahliae strains*, Pesticide Biochemistry and Physiology, nr.36, pag. 79-82.

144. MacGarvie, Q. D. and Isaac, I. 1966 - *Structure and behaviour of the nuclei of Verticillium spp,* Transactions of the British Mycological Society, nr.49, pag. 687-693

145. Mailer, R.J., Scarth, R., Fristensky, B., 1994 - *Discrimination among cultivars of rapeseed (Brassica napus L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers*, Theoretical Applied Genetics, nr. *87*, pag. 697–704.

146. Mantel, N., 1967 – *The detection of disease clustering and a generalized regression approach*, Cancer Research, nr. 27, pag 209-220.

147. Mauch-Mani, B., Slusarenko, A.J. , 1996 - *Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia lyase in the resistance of Arabidopsis to Peronospora parasitica*, Plant Cell, nr.8, pag. 203-212.

148. Milligan, G., W., 1980 – *An examination of the effects of six types of errors perturbation on fifteen clustering algoritms, Psychometrica*, vol.45, pag 325-342.

149. Mithen, R.F, Magrath, R., 1992 - *Glucosinolates and resistance to Leptosphaeria maculans in wild and cultivated Brassica species*, Plant Breeding, nr.108, pag. 60 -68

150. Mogârzan, Aglaia, 2012 - *Fitotehnie*, Ed Ion Ionescu de la Brad, Iaşi.

151. Mogârzan, Aglaia, Robu, T., Zaharia, M. ,2011 - *Fitotehnie – îndrumător pentru lucrările practice*, Ed Ion Ionescu de la Brad, Iaşi

152. Mol, L., Scholte, K., 1995 - *Formation of microsclerotia of Verticillium dahliae Kleb. On various plant parts of two potato cultivars*, Potato Research, nr.38, pag. 143-150

153. Mol, L., Scholte, K., Vos, J., 1995 - *Effects of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of Verticillium dahlia*, Plant Pathology, nr.44, pag. 1070-1074

154. Mullis, Kary, 1990 - The unusual origin of the polymerase chain reaction, Scientific American, nr. 262 (4), pag 56–6.

155. Mündges-Christmann, H, Köhler, W., 1990 - *Enzymmarker zur Bestimmung der Fremdbefruchtungsrate und der genetischen Struktur bei Winterraps*, Mitt Ges Pflanzenbauwiss, nr.3, pag. 163–166.

156. Nei, M., Li, W.H., 1979 – *Matematical model for studyng genetic variation in terms of restriction endonucleasis,* Proccesings National Academy of Science USA 76, pag 52969-5273.

157. Neumann, M.J., Dobinson, K.F., 2003 - *Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen Verticillium dahlia*, Fungal Genetics and Biology, nr.38, pag.54-62

158. Neuweiller, 1905 - *Die prähistorische Pflanzenreste Mitteleuropas*, Editat de A. Raustein, Zürich, pag. 73-76.

159. Nijenhuis, B. T. E., 1971 - *Estimation of the proportion of inbred seed in Brussels sprouts hybrid seed by acid phosphatase isoenzyme analysis*, Euphytica, nr.20, pag. 498–507.

160. Obermeier ,C., Ali Hossain, M., Snowdon, R., Knufer J., Von Tiedemann, A., Friedt ,W., 2012 - *Genetic analysis of phenylpropanoid metabolites associated with resistance against Verticillium longisporum in Brassica napus*, Molecular Breeding, published on line.

161. Parkin, I.A.P, Sharpe, A.G, Keith, D.J, Lydiate. D.J., 1995 - *Identification of the A and C genomes of amphidiploid Brassica napus (oilseed rape)*, Genome nr.38, pag. 1122–1131

162. Pegg, G.F., 1984 - *The impact of Verticillium diseases in agriculture*, Phytopathologia Mediterranea, nr.23, pag. 176-192.

163. Pegg, G.F., 1985 - *Life in a black hole – the micro-environment of the vascular pathogen*, Transactions of the British Mycological Society, nr.85, pag. 1-20.

164. Pegg, G.F., Brady, B.L., 2002 - *Verticillium Wilts*, ed CAB, Wallingford, UK.

165. Piazza, GJ, Foglia, T., 2001 - *Rapeseed oil for oleochemical usage*, European Journal of Lipid Science and Technology nr.103, pag. 450–454.

166. Pilet ML, Delourme R, Foisset N, Renard M., 1998b - *Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (Pyrenopeziza brassicae) and blackleg resistance (Leptosphaeria maculans) in winter rapeseed (Brassica napus L.),* Theoretical Applied Genetics, nr.97 pag. 398–406

167. Pilet, M.L, Duplan, G., Archipiano H., Barret, P., Baron, C., Horvais, R., Tanguy, X., Lucas, M.O, Renard, M., Delourme, R., 2001 - *Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape*, Crop Science nr.41, pag. 197–205

168. Piotrowska, A., Krymanski, J., Bartkowiak-Broda, I, Krotka, K., 2003 - *Characteristic of yellow-seeded lines of winter oilseed rape*, In: Proc 11th Int Rapeseed Congress, Copenhagen, 1:247–249

169. Portenko, L.G., 2000 - *Verticillium longisporum – Agent of Verticillium wilt of winter rape in Russia*, Mykologiya I Fitopatologiy, nr.34, pag. 52-57.

170. Prakash, S., Hinata, K., 1980 - *Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review*, Opera Botany, nr.55: pag..3-57.

171. Presley, J.T., Carns, H.R., Taylor, E.E., Schnathorst, W.C. (1966) Movement of conidia of Verticillium albo-atrum in cotton plants. Phytopathology 56, 375

172. Querci, M., Jermini, J., Van den Eede, G., 2006 – Training course on the analysis of food sample for the presence od genetically modified organisms (JRC manual), on line at http://gmotraining.jrc.it.

173. Rabbani, M.A., Aki, I., Yoshie, M., Tohru, S. and Kenji, T. 1998 - *Genetic diversity in mustard (Brassica juncea L.) germplasm from Pakistan as determined by RAPDs*, Euphytica , nr.103, pag. 235–242.

174. Radoev, M., 2007 - *Genetic Analysis of Heterosis in Rapeseed (B. napus L.) by QTL Mapping. Dissertation*, Georg August University Gottingen, Germany. http://webdoc.sub.gwdg. de/diss/2007/radoev.

175. Radoev, M., Becker, H.C., Ecke, W., 2008 - *Genetic analysis of heterosis for yield and yield components in rapeseed (Brassica napus L.) by QTL mapping*, Genetics nr. 179, pag.1547–1558.

176. Rahman, M.H ., 2003 - *Yellow-seeded Brassica napus from interspecific crosses*, In: Proc 11th Int Rapeseed Congress, Copenhagen, 1:199–201

177. Rahman, M.H., 2001 - *Production of yellow-seeded Brassica napus through interspecific crosses*, Plant Breeding, vol 120, pag. 463–472.

178. Rakow, G.,1973 - *Selektion auf linol und Linolen sauregehalt in rapssamen nach mutagener behind lung*, Zeitschrift Pflanzenzuchtg, nr.69, pag. 62–82.

179. Robb, J., Powell, D.A., Street, P.F.S., 1984 - *Time-course of wall-coating secretion in Verticillium-infected tomatoes*, Physiological and Molecular Plant Pathology , nr.31, pag. 217-226

180. Robb, J., Powell, D.A., Street, P.F.S., 1989 - *Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in Verticillium wilt of tomato*, Canadian Journal of Botany, nr. 67, pag. 600-607

181. Robbelen, G. and Nitsch, A.,1974 - *Genetische und physiologische undersuchungen and polyen-fettsaure-mutanten von Raps. I auslese und beschreibung neuer mutanten*, Zeitschrift Pflansenzuchtg , vol.75, pag. 93–105.

182. Robbelen, G., R. K Downey, and A. Ashri, 1989 - *Oil Crops of the World*, Ed. McGrawhill, New York, USA, pag.. 518–532.

183. Rohlf, F.J., 1992 – *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.7*, Applied Biostatistic, New Zork.

184. Rohlf, F.J., 1992 - *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Version 1.7 Exeter Software, Setauket, New York.

185. Rygulla, W., Seyis, F., Lühs, W., Eynck, C., von Tiedemann, A., Friedt, W, Snowdon, R.J. , 2007b - *Combination of resistance to Verticillium longisporum from zero erucic acid Brassica oleracea and oilseed Brassica rapa genotypes in resynthesized rapeseed (Brassica napus) lines*, Phytopathology, nr. 97 (11), pag. 1391-1396.

186. Rygulla, W., Snowdon, R.J., Eynck, C., Koopmann, B., von Tiedemann, A., Lühs, W., Friedt, W., 2007a - *Broadening the genetic basis of Verticillium longisporum resistance in Brassica napus by interspecific hybridization*, Plant Breeding, Online Early Article.

187. Rygulla, W., Snowdon, R.J., Friedt, W., Happstadius, I., Cheung, W.Y., Chen, D, 2008 - *Identification of quantitative trait loci for resistance against Verticillium longisporum in oilseed rape (Brassica napus L.)*, Phytopathology , nr. 98, pag. 215–221.

188. Sacristan MD, Gerdemann-Knörck M, Schieder O., 1989 - *Incorporation of hygromycin resistance in B. nigra and its transfer to B. napus through asymmetric protoplast fusions*, *Theoretical Applied Genetics*, nr.78, pag. 194–200.

189. Sakova, L. and Curn, V., 1998 - *Identifikace a klasifikace vybrany´ch odru°d brukvovity ´ch plodin a dihaploidnı´ch liniı´ r˘epky pomocı´ RAPD markeru°* , Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, nr. 34, pag. 61–67.

190. Sanchez, J.M. and Claypool, D.W., 1983 - *Canola meal as a protein supplement in dairy rations*, Journal of Dairy Science, nr.66, pag. 80-85.

191. Santos, J.B. dos, Nienhuis, J., Skroch, P., Tivang, J., Slocum, M.K., 1994 - *Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among Brassica oleracea* L. genotypes, Theoretical Applied Genetics, nr. 87, pag 909–915.

192. Săulescu, N. A., Săulescu, N.N, 1967 – Câmpul de experienţă, edit. Agrosilvică, Bucureşti.

193. Schaible, L., Cannon, O.S., Waddoups, V., 1951 - *Inheritance of resistance to Verticillium wilt in a tomato cross*, Phytopathology, nr. 41, pag. 986-990.

194. Scharmer, K. and Golbs, G., 1997 - BIODIESEL-Energie- und Umweltbilanz Rapsölmethylester, UFOP news, Bonn, Juli.

195. Schiemann, E., 1932- *Entstehung der Kulturpflazen*, Handb. Verebwis. Lfg., 15.

196. Schierholt , A., Becker, H.C, Ecke, W., 2000 - *Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (Brassica napus L.)*, Theoretical Applied Genetics, nr.101, pag. 897–901.

197. Schnathorst, W.C., 1981 - *Life cycle and epidemiology of Verticillium*. In: Mace, M.E., Bell, A.A., Beckmann, CH (editor) Fungal Wilt Diseases of Plants, ed. Academic Press, New York, 81-111.

198. Seyis, F, Friedt, W, Lühs, W., 2003b - *Resynthesised Brassica napus as a resource in rapeseed improvement for quality and agronomic performance*. In: Knüpffer H,Ochsmann J (eds) *Rudolf Mansfeld and plant genetic resources*. ZADI, Bonn. Schriftenr Genet Ressour 19:33–338

199. Seyis, F., Snowdon, R., Friedt W., Lühs W., 2004 - *Molecular gentic diversity in resynthesised and conventional spring rapeseed*, în Proc. of 11th International Rapeseed Congress, 6-10 July, Copenhagen, Denmark, pag. 382-384.

200. Seyis, F., Snowdon, R.J., Lühs, W., Friedt, W., 2003a - *Molecular characterisation of novel resynthesized rapeseed (B. napus L.) lines and analysis of their genetic diversity in comparison to spring rapeseed cultivar*, Plant Breeding, nr. 122, pag. 473–478.

201. Sharpe A.G, Parkin, I.A.P, Keith, D.J, Lydiate D.J., 1995 - *Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (Brassica napus)*, Genome nr.38, pag. 1112–1121.

202. Shengwu, H., Ovesna, J., Kucera, L., Kucera, V., Vyvadilova, M., 2003 - *Evaluation of genetic diversity of Brassica napus germplasm from China and Europe assessed by RAPD markers*, Plant Soil Enviroment, nr. 49(3), pag. 106-113.

203. Shirzagedan, M., Röbbelen, G., 1985 - *Influence of seed color and hull proportions on quality properties of seeds in Brassica napus L.*, Fette Seifen Anstrichmittel, nr.87, pag. 235–237.

204. Simioniuc, D., 2002 – *Studii şi cercetări de genetic şi ameliorare la lupinul alb, teză de doctorat*, Cluj-Napoca.

205. Simko, I., Costanzo, S., Haynes, K.G., Christ, B.J., Jones, R.W. , 2004a - *Linkage disequilibrium mapping of a Verticillium dahliae resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (Solanum tuberosum) through a candidate gene approach*, Theoretical and Applied Genetics , vol.108, pag. 217-224

206. Simko, I., Haynes, K.G., Ewing, E.E., Costanzo, S., Christ, B.J., Jones, R.W., 2004c - *Mapping genes for resistance to Verticillium albo-atrum in tetraploid and diploid potato populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis*, Molecular Genetics and Genomics, nr.271, pag. 522-531.

207. Sinskaia, E. N, 1928 - *The oleiferous plants and root crops of the family Cruciferae*, Bull Applied Botany, section Genetic and Plant Breeding, nr.9, pag. 1-648.

208. Sjödin, C, Glimelius, K., 1989 - *Transfer of resistance against Phoma lingam to Brassica napus by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection, Theoretical Applied Genetics*, nr.78, pag. 513–520.

209. Slominski BA, Simbaya J, Campbell LD, Rakow G, Guenter W., 1999 - *Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola*, Animmal Feed Science Technology, nr.78, pag 249–262

210. Slominski, B.A, Campbell, L.D, Guenter, W., 1994 - *Carbohydrates and dietary fiber components of yellow and brown-seeded canola*, Journal of Agricultural Food Chemistry, nr.42, pag. 704–707

211. Smith, D.N, Devey, M.E, 1994 - *Occurrence and inheritance of microsatellites in Pinus radia*, Genome, nr. 37, pag. 977–983.

212. Smith, D.N., King, W.J., Tooper, C.P., Boma, F., Cooper, J.F., 1995a - *Alternative techniques for the application of sulphur dust to cashew trees for the control of powdery mildew caused by the fungus Oidium anacardii in Tanzania*, Crop Protection, nr. 14, pag. 555-560.

213. Söchting, H.P., Verreet, J.-A., 2004 - *Effects of different cultivation systems (soil management, nitrogen fertilization) on the epidemics of fungal diseases in oilseed rape (Brassica napus L. var. napus)*, Journal of Plant Diseases and Protection, nr.111, pag.1-29.

214. Soesanto L., Termorshuizen A. J., 2001 - *Effects of temperature on the formation of microsclerotia of Verticillium dahlia, Journal of Phytopathology*, nr.149, pag. 685-691.

215. Somers, D. J., Rakow, G., Prabhu, V. K. and Friesen, K. R. D. ,2001 - *Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in Brassica napus*, Genome, nr. 44, pag. 1077–1082.

216. Song, K.M, Suzuki, J.Y, Slocum M,K, Williams, P.H, Osborn, T.C., 1991 - *A linkage map of Brassica rapa (syn. campestris) based on restriction fragment length polymorphisms*, Theoretical Applied Genetics, nr.82, pag. 296–304.

217. Song. G.K, Lu, P., Tang. K., Osborn, T.C., 1995 - *Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implication for polyploid evolution*, Proceedings of Natural Academy of Sciences USA, nr.92, pag. 7719–7723.

218. Stark, C., 1961 - *Das Auftreten der Verticillium-Tracheomykosen in Hamburger Gartenbau-Kulturen*, Gartenbauwissenschaft, nr.26, pag. 493-528.

219. Stefansson, B.R., Hougen, F.W., 1964 - *Selection of rape plants (Brassica napus) with seed oil practically free of erucic acid*. Can J Plant Sci 44:359–364.

220. Steventon, L.A., Fahleson, J., Hu, Q., Dixelius, C., 2002a - *Identification of the causal agent of Verticillium wilt of winter oilseed rape in Sweden, Verticillium longisporum*, Mycological Research, nr.106, pag.570-578.

221. Steventon, L.A., Happstadius, I., Okori, P., Dixelius, C., 2002b - *Development of a rapid technique for the evaluation of the response of Brassica napus to Verticillium wilt*, Plant Disease, nr.86, pag. 854-858

222. Street, P.F.S., Robb, J., Ellis, B.E., 1986 - *Secretion of vascular coating components by xylem parenchyma cell of tomatoes infected with Verticillium albo-atrum*, Protoplasma nr.132, pag. 1-11

223. Subbarao, K.V., Chassot ,A., Gordon, T.R., Hubbard, J.C, Bonello P., Mullin R.., Okamoto, D., Davis, R.M, Koike, S.T., 1995 - *Genetic relationships and cross pathogenicity of Verticillium dahliae isolates from cauliflower and other crops*, Phytopathology, nr.85, pag. 1105-1112.

224. Sundberg, E., Glimelius, K., 1991 - *Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within Brassicaceae. Theoretical Applied Genetics*, nr. 83, pag. 81–88-

225. Sundberg, E., Landgren, M., Glimelius, K., 1987 - *Fertility and chromosome stability in B. napus resynthesized by protoplast fusion*, Theoretical Applied Genetics, nr.75, pag. 96–104.

226. Svenson, C.H., Lerenius, C., 1987 - *An investigation on the effect of Verticillium wilt (Verticillium dahliae Kleb.) on oilseed rape. Working group integrated control in oilseed rape*, IOBC/WPRS Bulletin, vol X/4, pag. 30-34.

227. Talboys, P. W., 1957 - *The possible significance of toxic metabolites of Verticillium alboatrum in the development of hop wilt symptoms.*, Transactions of the British Mycological Society, nr. 40, pag. 415-427.

228. Talboys, P.W., 1958a - *Degradation of cellulose by Verticillium albo-atrum*, Transactions of the British Mycological Society, nr.41, pag. 242-248.

229. Talboys, P.W., 1958b - *Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by Verticillium albo-atrum*, Transactions of the British Mycological Society, nr.41, pag. 249-260.

230. Talboys, P.W., 1964 - *A concept of the host-parasite realtionship in Verticillium wilt diseases*, Nature, nr.202, pag. 361-362.

231. Talboys, P.W., 1984 - *Damage symptoms and crop loss caused by vascular pathogens* capitol în: *Plant Diseases: Infection, Damage, and Loss*. Wood, R.K.S., Jellis, G.J. (eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. pag. 171-187.

232. Tanhuanpaa, P., Vilkki, J., Vihinen, M., 1998 - *Mapping and cloning of FAD2 gene to develop allele-specific PCR for oleic acid in spring turnip rape (Brassica rapa ssp. oleifera)*, Molecular Breeding, nr.4, pag. 543–55.0.

233. Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. and Bonierbale, M. W. ,1989 - *RFLP mapping in plant breeding New tools for an old science*, BioTechnology, nr.7, pag. 257–264.

234. Theander, O., Aman, P., Miksche, G.E., Yasuda, S., 1977 - *Carbohydrates, polyphenols,andlignin inseedhulls of different colors from turnip rapeseed*, Journal of Agricultural Food Chemistry, nr.25, pag. 270–273

235. Tîrdea, Gh.,2002 – *Genetică vegetală*, edit. „Ion Ionescu de la Brad" Iaşi.

236. Toxopeus, H., Oost and Reuling,1984 - *Current aspects of the taxonomy of cultivated Brassica species. The use of B. rapa versus B. campestris L. and a proposal for a new intraspecific classification of Brassica rapa L.*, Cruciferae Nwesletter, nr.9, pp 55-57.

237. Trautwein, E., 1997 - *Rapsöl - ein wertvol.les Speiseöl*, Agrarforschung nr.4, pag. 381-384.

238. Trautwein, E., 2001 - *Fatty acids – physiological and technical aspects for their use in food*, European Journal of Lipid Science and Technology, nr.103, pag. 45–55.

239. Truco, M. J. and Arus, P., 1987 - *Comparative study on the isozymes of Brassica campestris, B. oleracea a B. napus, Cruciferae Newsletter*, nr.12, pag. 18–19.

240. U, N.,1935 - *Genome-analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus an pelicular mode of fertilisation*, Journal of Japanese Botany, nr 7, pag. 389-452.

241. Ulea, E., 2001 – Protecţia plantelor – fitopatologie, edit. „Ion Ionescu de la Brad" Iaşi.

242. Uzunova, M., Ecke, W., 1999 - *Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (Brassica napus L.)*, Plant Breeding nr.118, pag. 323–326.

243. Van Alfen, N.K., 1989 - *Molecular bases for virulence and avirulence of fungal wilt pathogens*, capitol în Tjamos EC, Beckman CH (eds.) *Vascular Wilt Diseases of Plants*, Springer, Berlin, 19-32

244. Vaughan, J. G. and Denford, K. E., 1968) - *An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of Brassica and Sinapis species, with special reference to their taxonomic value, Journal of Experimental Botany*, nr.19, pag. 724–732.

245. Vol.lman, J., Rajcan, I.,2009 - *Handbook of plant breeding – oil crops*, Springer Dordrecht Heidelberg London New York

246. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Homes M., Freiters, A., Pot. J, Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995 - *AFLP: a new concept for DNA fingerprinting*, Nucleic Acids Research, nr.23, pag.4407–4414.

247. Walsh, J.A, Sharpe, A.G., Jenner, C.E, Lydiate, D.J, 1999 - *Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (Brassica napus) and genetic mapping of TuRB01*, Theoretical Applied Genetics, vol 99, pag. 1149–1154.

248. Warkentin, T.D., Rashid, K.Y., Xue, A.G., 1996 - *Fungicidal control of powdery mildew in field pea*, Canadian Journal of Plant Science , vol.76, pag. 933-935.

249. Weber S, Ünker F, Friedt W., 2005 - *Improved doubled haploid production protocol for Brassica napususing microspore colchicine treatment in vitroand ploidy determination by flow cytometry*, Plant Breeding, nr.124, pag. 511–513.

250. Weiss, E. A., 1983 - *Oilseed Crops*, Ed. Longman Group Limited London, New York, pag. 402-462.

251. Welsh, J., McClelland, M., 1990 - *Fingerprinting genoms using PCR with arbitrary primers*, Nucleic Acids Research, nr.18:, pag 7213-7218.

252. Whetten, R.W, Mackay, J.J., Sederoff, R., 1998 - *Recent advances in understanding lignin biosynthesis*, Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology, nr.49, pag. 585–609.

253. Whitkus, R., Doebley, J. and Lee, M., 1992 - *Comparative genome mapping of sorghum and maize*, Genetics, nr.132, pag. 1119–1130.

254. Williams, J., Hall, S.A., Hawkesford, M.J., Beale, M.H., Cooper, R.M., 2002 - *Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen*, Plant Physiology , vol.128, pag. 150-159.

255. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R, Livak, K.J, Rafalski, J.A, Tingey, S.V, 1990 - *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*, Nucleic Acids Research, nr.18. pag. 6531–6535.

256. Witmack, L., 1904 - *Über die in Pompej gefundenen Pflanzenreste*, Englers Botanisches Jahrbuch, Vol.. 33, pag. 373-379.

257. Wood, R.K.S., 1961 - *Verticillium wilt of tomatoes and the role of pectic and cellulolytic enzymes*, Annals of Applied Biology, nr.49, pag. 120-139.

258. Xiao, C.L, Hao, J.J., Subbarao, K V, 1997 - *Spatial patterns of microscleroti of Verticillium dahliae in soil and verticillium wilt of cauliflower*, Phytopathology, nr.87, pag. 325-331,

259. Xiao, D., Liu, H.L., 1982 - *Correlation analysis of seed color and seed oil in Brassica napus L*, Acta Agronomy Sicience, nr.8, pag. 24–27.

260. Yuan, M., Zhou, Y., Liu, D, 2004 - *Genetic diversity among populations and breeding lines from recurrent selection in Brassica napus as revealed by RAPD markers*, Plant Breeding, nr. 123, pag. 9-12.

261. Zaharia, M.,2011 - *Tehnologia culturilor de câmp*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iaşi.

262. Zeise, K., 1992 - *Gewächshaustest zur Resistenzprüfung von Winterraps (Brassica napus L. var. oleifera Metzger) gegen den Erreger der Rapswelke Verticillium dahliae Kleb*, Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst, nr. 44, pag.125-128.

263. Zeise, K., von Tiedemann, A., 2001 - *Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of Verticillium dahliae in relation to V. longisporum*, Journal of Phytopathology , vol.149, pag. 469-475.

264. Zeise, K., von Tiedemann, A., 2002a - *Host specialization among vegetative compatibility groups of Verticillium dahliae in relation to Verticillium longisporum*, Journal of Phytopathology, vol.150, pag. 112-119.

265. Zeise, K., von Tiedemann, A., 2002b - *Application of RAPD-PCR for virulence type analysis within Verticillium dahliae and Verticillium longisporum*, Journal of Phytopathology, nr.150, pag. 557-563.

266. Zhao, J.W., Meng, J.L., 2003 - *Genetic analysis of loci associatedwith partial resistance to Sclerotinia sclerotiorum in rapeseed (Brassica napus L.)*, Theoretical Applied Genetics, nr.106, pag. 759–764.

267. Zhou, L., Hu, Q., Johansson, A., and Dixelius, C., 2006 - *Verticillium longisporum and V. dahliae: infection and disease in Brassica napus*, Plant Pathology, nr. 55, pag. 137–144.

268. Zielenski, D., Sadowski, C., 1995 - *A preliminary study on Verticillium dahliae Kleb. In winter oilseed rape in Poland, în Proceedings of the 9th International Rapeseed Conference*, Cambridge. 4-7 July 1995, GciRC, Cambridge, UK, 649-651.

269. Zinkernagel, V., 1982 - *Zur Entwicklung von Verticillium spp. in anfälligen und toleranten Hopfensorten nach natürlicher und künstlicher Infektion*, Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, nr.89, pag. 205-218.

270. http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?Pag.eID=567#ancor

271. http://www.agrimarvas.ro/cultura/rapita.html

272. http://www.madr.ro/pages/page.php?self=01&sub=0104&art=0406&var=010402

273. http://ro.wikipedia.org