



REZUMAT

Cuvinte cheie: *viță de vie, cromatografie în strat subțire (CSS), descriptor biochimic, dimensiune fractală, analiza cluster*

Teza de doctorat cu titlul ***Caracterizarea morfo-genetică a soiurilor din sortogrupul Galbenă de Odobești prin determinarea aminoacizilor liberi***, reprezintă primul studiu asupra profilului aminoacizilor liberi din frunzele tinere la soiurile autohtone de viță de vie din cadrul sortogrupului Galbenă de Odobești.

Cercetările au vizat cinci soiuri autohtone vechi de viță de vie considerate a aparține sortogrupului Galbenă, aflate în conservare în Colecția ampelografică a S.C.D.V.V. Odobești. Determinările aferente cercetărilor au fost efectuate în perioada anilor 2009 – 2012 în cadrul Laboratoarelor Sectorului de Cercetare din cadrul S.C.D.V.V. Odobești. Pentru inițierea în deprinderea tehnicilor de extracție și separare a aminoacizilor prin CSS, am colaborat cu Laboaratoarele Centrului de Cercetare în Biochimie și Biologie moleculară (CCBBM), din cadrul Departamentului de Biochimie și Biologie Moleculară al Facultății de Biologie - Universitatea București.

Structura tezei. Teza însumează un număr de 183 pagini și este structurată în două părți și șase capitole:

- Partea I STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII. Include capitolele I-III în care se prezintă: studiu documentar privind metodele de determinare a înrudirii filogenetice a soiurilor de viță de vie, o prezentare generală a sortogrupului Galbenă de Odobești și evoluția cercetărilor privind sortogrupul Galbenă de Odobești, precum și un studiu documentar privind caracterizarea materialului genetic la viță de vie pe baza profilului de aminoacizi liberi.
- Partea II-a CONTRIBUȚII PERSONALE. Include capitolele IV-VI în care sunt prezentate: obiectivele cercetărilor, materialul biologic și metodele folosite, rezultate experimentale privind profilul aminoacizilor liberi din frunzele tinere și descriptorii biochimici la cinci soiuri de viță de vie prezumate a aparține sortogrupului Galbenă de Odobești, similitudinea arhitecturii frunzei determinată prin analiza cluster pe baza măsurărilor ampelometrice, dimensiunea fractală a frunzelor,

prelucrarea și interpretarea statistică a rezultatelor experimentale, concluziile generale.

Capitolul I - *Considerații despre înrudirea filogenetică a soiurilor de viță de vie.*

Înșușirile soiului sunt determinate genetic, fiind caracteristice pentru specia din care provine, și modificate prin acțiunea antropică conștientă astfel încât unele însușiri au fost amplificate, sau dimpotrivă, diminuate. Stabilitatea soiului sub aspect morfologic și de producție este relativă, fiind puternic influențată de o serie de factori biologici: mutațiile spontane, încrucișările naturale, segregarea caracterelor în cazul soiurilor sintetice obținute prin hibridare.

Soiurile care se aseamănă prin însușirile lor morfologice (fenotipice), constituie așa numitele *ecotipuri de soiuri (sortogrupuri)*.

De-a lungul timpului au existat numeroase preocupări și încercări pentru descrierea, recunoașterea și diferențierea soiurilor de viță de vie bazate atât pe ampelometria frunzei, dar și pe baza însușirilor morfologice, agrobiologice și tehnologice ale soiurilor, materializate în metode care au evoluat și s-au perfecționat în timp: metoda ampelometrică, metoda determinatoarelor ampelografice, metoda descriptorilor ampelografici. În anul 1984, în vederea unificării metodologiei de descriere ampelografică, OIV, UPOV și IPGRI au elaborat norme comune de lucru prin care au fost stabilite trei categorii de descriptori: descriptori pentru caracterele ampelografice ale soiurilor (96), descriptori pentru însușirile agrobiologice (25), și descriptori pentru însușirile tehnologice (5).

Variabilitatea genetică dintre organisme aparținând diferitelor specii sau unități taxonomice poate fi pusă în evidență prin studiul produșilor chimici ai genelor, deci a enzimelor, Analiza izoenzimatică și-a găsit astfel aplicația și în cercetările cu privire la originea soiurilor la plantele cultivate și în special la soiurile de viță de vie.

O etapă superioară în identificarea originii genetice a soiurilor a constituit-o analiza genomului la nivel de ADN și ARN, ca urmare a progreselor înregistrate în biologia moleculară (markeri moleculari). Cele mai utilizate tehnici moleculare pentru identificarea speciilor, soiurilor de *Vitis* și a varietăților somatoclonale sunt: metoda PCR, RFLP, AFLP, RAPD și analiza microsateliților ISSR.

Capitolul II - *Considerații generale asupra sortogrupului Galbenă de Odobești.* În acest capitol sunt prezentate considerații și aspecte generale privind grupul de soiuri de viță de vie considerate a aparține sortogrupului Galbenă de Odobești.

Pornind și de la referirile lui Constantinescu (1971), sortogrupul Galbenă de Odobești cuprinde soiurile autohtone de viță de vie, cu însușiri morfologice/ampelografice asemănătoare soiului Galbenă de Odobești, considerat ca fiind soiul sintetic, din care au rezultat soiurile Zghișă de Huși și Bătută neagră. Din raționamente care au avut la bază

elemente de asemănare cu soiul Galbenă de Odobești pentru unele caractere morfologice și însușiri, au fost asociate acestui grup și alte soiuri autohtone vechi de viță de vie, precum soiurile Alb românesc, Cruciuliță și Galbenă verde (Constantinescu și colab., 1962) și soiul Galbenă uriașă care a fost considerat o variație a soiului Galbenă de Odobești (Nicoleanu, 1900).

Prezența în arealul pontic de cultură a viței de vie și a altor soiuri cu caractere ampelografice mai mult sau mai puțin asemănătoare cu cele ale soiului Galbenă de Odobești, a constituit rațiunea pentru care au fost asociate acestui grup soiurile Cabasma albă, Cabasma neagră, Negru vârtos și Negru moale. Însușiri comune cu ale soiurilor Galbenă de Odobești și Cruciuliță s-a semnalat și la soiul Berbecel a cărui denumire cu toate sinonimele sale, pare să fie în legătură cu culoarea galbenă a boabelor, ca și în cazul soiului Galbenă de Odobești (Bădițescu, 1974). Cu excepția soiului Galbenă de Odobești, originea celorlalte soiuri considerate ca făcând parte din acest sortogrup este încă incertă, în literatura de specialitate neexistând date precise asupra provenienței lor.

De asemenea, în acest capitol este prezentată evoluția și stadiul actual al cercetărilor privind caracterizarea soiurilor de viță de vie din sortogrupul Galbenă de Odobești, prin care este argumentată abordarea în continuare a cercetărilor privind sortogrupul Galbenă.

Capitolul III – Studiu bibliografic privind caracterizarea materialului genetic la vița de vie prin determinarea profilului de aminoacizi. Problematika caracterizării germoplasmei viticole pe baza spectrului aminoacizilor liberi din organele vegetative și struguri este expusă într-un număr de patru subcapitole, în care sunt prezentate considerații generale asupra aminoacizilor identificați la vița de vie, aspecte privind metabolismul aminoacizilor la vița de vie, metode de determinare a aminoacizilor liberi precum și stadiul actual al cercetărilor privind caracterizarea germoplasmei viticole pe baza profilului aminoacizilor liberi din organele vegetative și struguri.

Documentarea bibliografică a evidențiat faptul că peste 30 de aminoacizi, din care 20 aminoacizi proteinogeni specificați prin codul genetic, au fost identificați și la *Vitis vinifera* L. în diferite faze de creștere și dezvoltare. La vița de vie, cantitatea totală de aminoacizi crește pe parcursul procesului de maturare ajungând la valori cuprinse între 200 și 6500 mg/l, cu variații ale fiecărui aminoacid de la un an la altul, dar și de la un soi la altul (Țârdea, 2007).

Calea de formare a aminoacizilor în struguri o constituie aminarea *acizilor cetonici* în prezența enzimelor numite *transaminaze*. Principali cetoacizi care stau la baza formării aminoacizilor din struguri sunt: *acidul piruvic*, *acidul α -cetoglutaric* și *acidul oxalil-acetic*. În preajma maturării strugurilor, are loc o acumulare masivă a aminoacizilor liberi, ca urmare a încetării creșterii boabelor și a sintezei proteinelor, mai ales în anii răcoroși, cu puține precipitații în perioada de maturare. În timpul fermentației alcoolice are loc o metabolizare

rapidă a aminoacizilor din must de către levuri, cu excepția prolinei, argininei, alaninei, ornitinei și citrulinei (Ough *et. al.*, 1991).

Subcapitolul trei cuprinde o prezentare succintă a principalelor metode de determinare a aminoacizilor: metode chimice, metode cromatografice, metode electroforetice.

Ultimul subcapitol prezintă evoluția și stadiul actual al cercetărilor privind profilul aminoacizilor în cadrul genului *Vitis*. Documentarea bibliografică bazată pe cercetări asupra profilului aminoacizilor liberi în special la nivelul strugurilor și mustului, a evidențiat o mare variabilitate a acestuia, sugerând importanța deosebită a implicării geneticului în această diversitate, și totodată necesitatea continuării cercetărilor în acest domeniu.

Capitolul IV - Obiectivele, materialul biologic și metode de cercetare. În acest capitol sunt prezentate obiectivele cercetărilor, materialul biologic folosit și metodele de cercetare.

Principalele obiective de cercetare:

- Stabilirea protocolului de extracție, separare și vizualizare a aminoacizilor liberi din țesuturile vegetale tinere, la soiurile de viță de vie din sortogrupul Galbenă de Odobești luate în studiu, prin tehnica cromatografiei în strat subțire (CSS).
- Stabilirea protocolului de identificare și determinare cantitativă a aminoacizilor liberi din frunzele tinere la soiurile de viță de vie analizate.
- Evaluarea posibilităților cu privire la utilizarea profilului de aminoacizi liberi din frunze ca descriptor biochimic, în scopul stabilirii polimorfismului și filiației genetice existente între soiurile de viță de vie ce alcătuiesc sortogrupul Galbenă de Odobești.
- Compararea și coroborarea datelor obținute privind profilul de aminoacizi liberi din frunze, ca descriptor biochimic, cu date obținute prin alte metode și tehnici utilizate pentru caracterizarea morfogenetică a soiurilor de viță de vie (analiza cluster, analiza fractală).

Materialul biologic folosit: cinci soiuri autohtone vechi, prezumate a aparține sortogrupului Galbenă de Odobești (Galbenă de Odobești, Zghișă de Huși, Bătută neagră, Negru Vârtos și Negru moale). În acest subcapitol este prezentată de asemenea și o scurtă caracterizare ampelografică a soiurilor de viță de vie prezumate a aparține sortogrupului Galbenă.

Ultima parte a acestui capitol este cea mai amplă și prezintă metodele de cercetare: metoda de determinare a aminoacizilor prin cromatografia în strat subțire (CSS), analiza cluster pe baza măsurătorilor ampelometrice și analiza fractală – metoda Box-Counting (Programul HarFa) pentru determinarea dimensiunii fractale a conturului frunzelor. Sunt prezentați în mod detaliat pașii de lucru, măsurătorile, analizele și determinările efectuate. În cazul metodei de determinare a aminoacizilor liberi prin cromatografia în strat subțire sunt prezentate:

- protocolul de extracție, separare și vizualizare a aminoacizilor liberi din frunzele și rădăcinile tinere. Cel mai eficient sistem de dezvoltare s-a dovedit a fi cel pe bază de n – butanol / acid acetic glacial / apă (4:1:1 v/v/v), care a permis o separare mai bună a aminoacizilor liberi din frunzele tinere de viță de vie.
- algoritmul matematic de identificare (factorul de retenție – R_f);
- algoritmul matematic pentru determinarea cantitativă a aminoacizilor liberi - programul de analiză a imaginilor ImageJ – ver. 1.46r.

Capitolul V – Rezultatele experimentale. În acest capitol structurat pe trei subcapitole sunt prezentate rezultatele cercetărilor referitoare la: profilul aminoacizilor liberi din organele vegetative tinere la soiurile de viță de vie și rapoartele dintre aminoacizii predominanți (descriptori biochimici), stabilirea similarității sau asemănării fenotipice dintre cele cinci soiuri de viță de vie luate în studiu pe baza arhitecturii frunzei, dimensiunea fractală a conturului frunzelor și gradul de sectare a acestora.

Pentru determinarea profilului aminoacizilor liberi din frunzele și rădăcinile tinere la soiurile de viță de vie luate în studiu, au fost testați 17 aminoacizi, 14 aminoacizi fiind identificați în probele de material biologic (frunze tinere) la toate soiurile analizate. Analizele privind extracția și separarea aminoacizilor din rădăcinile tinere s-a dovedit a fi nereproductibilă pentru toate soiurile de viță de vie analizate.

Identificarea celor 14 aminoacizi separați s-a realizat pe baza valorii factorului de retenție (R_f), care a avut valori cuprinse între 0,02 și 0,50. Evaluarea cantitativă a aminoacizilor identificați în frunzele tinere s-a realizat pe baza profilelor sau cromatogramelor obținute prin programul de analiză a imaginilor ImageJ ver.1.46r., raportate la probele standard de aminoacizi cu un conținut cunoscut în aminoacid.

Conținutul total al aminoacizilor prezenți în frunzele la soiurile de viță de vie analizate a variat între 14,33 $\mu\text{g}/\text{mg}$ material vegetal la soiul Negru moale și 18,76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ material vegetal la soiul Galbenă de Odobești, cu valori intermediare pentru soiurile Zghiha de Huși (14,54 $\mu\text{g}/\text{mg}$), Bătută neagră (15,20 $\mu\text{g}/\text{mg}$) și Negru vârtos (17,74 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Aminoacizi predominanți prezenți la toate cele cinci soiuri de viță de vie luate în studiu au fost: acidul aspartic (Asp), acidul glutamic (Glu), serina (Ser) și treonina (Thr), acidul aspartic reprezentând între 25,3% (Bătută neagră) și 31,5% (Zghiha de Huși).

Rapoartele dintre aminoacizii predominanți, considerați parametri constanți care diferă semnificativ de la un soi/cultivar la altul (Hernández-Orte, Guitart și Cacho, 1990), pot fi folosiți ca parametri de diferențiere a soiurilor de viță de vie din punct de vedere genetic (descriptori biochimici). În acest sens au fost calculate rapoartele (Asp/Glu, Asp/Ser, Asp/Thr, Ser/Thr, Glu/Ser, Glu/Thr, Glu/Thr), dar și raportul Pro/Arg și raportul γ .

Pentru stabilirea similarității privind asemănarea fenotipică din punct de vedere al arhitecturii frunzei dintre cele cinci soiuri analizate, a fost folosită analiza statistică multidimensională de tip Cluster, prin care au fost elaborate: dendrograma clasificării ierarhizate a soiurilor, nivelurile de înlănțuire a soiurilor și histograma clasificării ierarhizate a soiurilor. Dendrograma elaborată pe baza măsurătorilor ampelometrice grupează cele cinci soiuri de viță de vie în două grupuri sau ramuri principale: Grupul A alcătuit din înlănțuirea soiurilor: Negru vârtos, Zghihară de Huși și Galbenă de Odobești și Grupul B rezultat în urma agregării soiurilor Bătută neagră și Negru moale. Din punct de vedere al similarității Grupul A are cea mai ridicată omogenitate deoarece valoarea indicelui de înlănțuire sau disimilaritate este mai mică (17,369), comparativ cu Grupul B (31,443).

Dimensiunea fractală a conturului frunzelor pentru soiurile de viță de vie analizate, calculate prin Programul HarFA, a arătat valori medii cuprinse între 1,1923 la soiul Negru moale și 1,2730 la soiul Negru vârtos, cu valori intermediare pentru soiurile Bătută neagră (1,2404), Galbenă de Odobești (1,2247) și Zghihară de Huși (1,2067). Valorile ampelometrice medii ale raportului d_1/N_2 care arată gradul de sectare a frunzelor la cele cinci soiuri de viță de vie luate în observație au variat între 0,7012 la soiul Negru moale și 0,7516 la soiul Bătută neagră, cu valori intermediare pentru soiurile Zghihară de Huși (0,7493), Galbenă de Odobești (0,7281) și Negru vârtos (0,7262).

Capitolul VI - Prelucrarea și interpretarea statistică a datelor experimentale. Statistic, cantitatea totală de aminoacizi liberi nu diferențiază semnificativ cele cinci soiuri autohtone de viță de vie analizate, deoarece valoarea calculată a lui P (0,93885) este mai mare decât valoarea critică a lui P 0,05.

În schimb rapoartele dintre aminoacizi predominanți (Asp/Glu, Asp/Ser, Asp/Thr, Ser/Thr și Glu/Thr), diferențiază statistic cele cinci soiuri de viță de vie, considerate a aparține sortogrupului Galbenă de Odobești, cu un interval de încredere de 95% și pot fi folosiți ca descriptori biochimici. Și raportul prolină/arginină (Pro/Arg) arată diferențe semnificative între cele cinci soiuri autohtone de viță de vie luate în studiu.

Determinările efectuate s-au dovedit necesare și utile, dar nu și suficiente pentru a soluționa pe deplin tema abordată. Ca urmare, s-a procedat la coroborarea rezultatelor experimentale și la analiza relațiilor de interdependență dintre rapoartele aminoacizilor predominanți (descriptori biochimici). Pentru interpretarea rezultatelor au fost calculate valorile coeficienților de corelație (r). Interpretarea coeficienților de corelație, arată o asociere foarte bună între următorii descriptori biochimici:

- raportul Asp/Glu și rapoartele Asp/Ser (corelație pozitivă) și Glu/Ser (corelație negativă);
- raportul Asp/Ser și raportul Pro/Arg (corelație negativă);

- raportul Asp/Thr și rapoartele Ser/Thr (corelație pozitivă) și γ (corelație negativă);

Analiza varianței pentru dimensiunea fractală a frunzelor arată faptul că între cele cinci soiuri de viță de vie luate în studiu există diferențe cu semnificație statistică (0,010896). Testul Student a arătat diferențe semnificative între soiul Negru moale și soiurile Bătută neagră (0,01847) și Negru vârtos (0,01627). Diferențe semnificative există și între soiul Zghișă de Huși comparativ cu soiul Negru vârtos (0,03825).

Între valorile individuale ale dimensiunii fractale ale frunzelor și a gradului de sectare a limbului (raportul ampelometric d_1/N_2), există o corelație negativă moderată spre bună la soiul Zghișă de Huși (- 0,5469). La nivelul sortogrupului pe baza valorilor medii obținute pentru dimensiunea fractală a frunzelor și gradul de sectare al limbului există un grad slab de asociere.

În finalul tezei sunt prezentate **concluziile generale** și **bibliografia** consultată.