

REZUMAT

Teza de doctorat cu tema „**CERCETĂRI PRIVIND ÎNRUDIREA FILOGENETICĂ A SOIURILOR DE VIȚĂ DE VIE AUTOHTONE PRIN ANALIZA ACIDULUI DEZOXIRIBONUCLEIC (ADN)**” are ca obiectiv principal stabilirea filiației genetice a unor soiuri autohtone de viță de vie, după criteriile științifice și moderne oferite de Biologia moleculară.

Structura lucrării. Teza este structurată în 7 capitole: partea generală, care cuprinde capitolele I-III și partea experimentală cu capitolele IV-VII. În partea generală este analizată pe scurt, situația patrimoniului genetic al soiurilor la viță de vie (cap. I); în capitolul II se face o trecere în revistă a soiurilor autohtone și sunt descrise metodele utilizate pentru stabilirea înrudirii filogenetice a soiurilor de viță de vie; în capitolul III este prezentată analiza acidului dezoxiribonucleic/descrierea ADN-ului.

În partea experimentală sunt formulate obiectivele cercetărilor (cap. IV), sunt descrise metodele de investigare a genomului la soiurile autohtone de viță de vie prin determinarea acidului dezoxiribonucleic și este prezentat materialul biologic luat în studiu (cap. V); sunt prezentate rezultatele experimentale obținute (cap. VI) și în final, interpretarea datelor experimentale (cap. VII). Lucrarea se încheie cu concluziile generale și bibliografia consultată.

Obiectivele cercetărilor:

- stabilirea profilului genetic al soiurilor autohtone de viță de vie;
- stabilirea filiației genetice a soiurilor studiate;
- alegerea celor mai corespunzătoare metode și markeri moleculari, cu ajutorul cărora se poate investiga genomul soiurilor de viță de vie.

1. Patrimoniul genetic al soiurilor la viță de vie (cap.1). Plasticitatea ecologică a speciei *Vitis vinifera* L. a condus la crearea a peste 15 mii de soiuri/cultivare, răspândite astăzi pe toate continentele globului. O variabilitate fenotipică impresionantă, care conduce de cele mai multe ori la incertitudini și confuzii asupra identității soiurilor de viță de vie, a recunoașterii lor.

Pe plan mondial, asistăm la o diminuare a diversității genetice la plantele cultivate, fenomen denumit “*eroziune genetică*”. Nici vița de vie nu a fost ocolită, fenomenul fiind întâlnit atât la soiurile de viță cultivată, cât și la formele sălbatice de viță de vie.

Principalele țări viticole, cum sunt Franța, Italia, Spania, Portugalia au cel mai bogat patrimoniu genetic viticol. Exemplu: Franța posedă aproximativ 633 soiuri autohtone de viță de vie, Boursiquot M.J. și colaboratorii prezintă soiul *Gouais* ca fiind soiul ancestral european, care a generat multitudinea soiurilor care se cultivă azi. Italia: soiul ancestral „Greci”/”Grechetti” din care au provenit numeroase soiuri italiene; Spania cu mai mult de o sută de soiuri autohtone în conservare (Gazeta de Agricultură, Arad, “Scurt istoric al viței de vie”, 2007).

Secolul XXI a adus cu sine o nouă provocare economică, mondializarea sau globalizarea comerțului, inclusiv comerțul cu vinuri. Efectele globalizării comerțului la care viticultura românească trebuie să facă față sunt, pe de o parte alinierea vinurilor românești la standardele internaționale pentru un comerț globalizat și reconsiderarea soiurilor autohtone, pe de altă parte.

România ca țară viticolă are un patrimoniu genetic restrâns, circa 53 de soiuri autohtone de viță roditoare, care s-au format prin selecție naturală, ajutată de viticultorii anonimi, (Țârdea, 2008). Puține dintre acestea sunt menținute în cultură pentru a fi valorificate.

2. Metodele pentru stabilirea înrudirii filogenetice a soiurilor (cap II).

Sunt descrise pe scurt în lucrare. Acestea sunt:

Metoda ampelometrică/botanică. Constă în examinarea caracterelor morfologice ale frunzei, ca principal organ ampelografic, exprimarea lor prin măsurători și valori numerice. Ideea aparține profesorului Herman GOETHE de la Școala Superioară de Agricultură din Viena, care la sesiunea Comisiei ampelografice internaționale din anul 1876 de la Marburg, atrăgea atenția asupra relației care există între forma limbului și unghiurile pe care le formează nervurile principale între ele (Țârdea, 1992).

Metoda descriptorilor ampelografici. Elaborată de O.I.V. împreună cu Uniunea Internațională pentru Protecția Organismelor Vegetale (UPOV), anul 1984. Scopul urmărit a fost codificarea caracterelor morfologice, însușirilor agrobiologice și tehnologice ale soiurilor, pentru prelucrarea lor pe calculator.

Metoda enzimatică. Enzimele sunt proteine specializate în cataliza reacțiilor biologice, situându-se printre cele mai remarcabile biomolecule cunoscute, datorită specificității și puterii lor catalitice extraordinare, mult mai mare decât celei a catalizatorilor chimici (LEHNINGER, 1970). Posibilitățile de separare a proteinelor între ele, se bazează pe diferențele de mărime, proprietăți de solubilitate, sarcina electrică; comportare la adsorbție și afinitatea biologică a unei

proteine pentru un ligant specific. Cele mai performante metode de separare sunt: disc electroforeza, focusarea izoelectrică, cromatografie pe schimbători de ioni. Se pot determina enzimele din struguri și din vin pentru a se stabili înrudirea genetică dintre soiuri.

Amprenta aminoacizilor liberi. Aminoacizii reprezintă formele monomere ale proteinelor. Molecula lor se caracterizează prin două funcții antagoniste: una carboxilică (acidă) și alta aminică (bazică), ambele legate de același atom de C numit carbonul α . Ponderea aminoacizilor în struguri este mare și reprezintă 20-30% din totalul compușilor azotați (Poux, Ournac, 1970).

S-a constatat că aminoacizii conținuți în struguri variază de la un an la altul, în timp ce profilul aminat nu se modifică semnificativ, raportul prolină/arginină rămânând practic același la fiecare soi (Țârdea, 2009). Pe baza determinărilor aminoacizilor liberi, se stabilește amprenta soiurilor de viță de vie.

Analiza ADN. Conform ipotezei formulate de G.W. Beadle și E.L. Tatum (1941), concepția despre genă s-a completat prin formula “*o genă = o enzimă*”. Gena controlează sinteza, funcția și specificitatea unei enzime. Faptul că genele sunt molecule complexe, alcătuite din acizi nucleici, ADN sau ARN și constituie materialul care conține informația ereditară, a dus la schimbarea vechilor teorii asupra genei. De aici, investigarea genomului la soiurile de viță de vie, prin determinările ADN-ului.

Stadiul actual al cercetărilor. Pe plan internațional există cercetări de investigare genetică a soiurilor de viță de vie, care au dus la organizarea unor baze de date cu informații despre cartarea și secvența genelor. Astfel de cercetări sunt inițiate și la noi în țară în centrele universitare Cluj, Iași, București, stațiunile de cercetare, cum ar fi Ștefănești-Argeș. Cercetările sunt îndreptate spre soiurile de viță de vie cosmopolite, cât și spre soiurile autohtone, care preocupă tot mai mult pe specialiști.

3. În ultimul capitol al părții generale (cap. III) este prezentată descrierea acidului dezoxiribonucleic, funcțiile sale precum și tipurile cunoscute și descrise de către geneticieni.

4. Urmează partea experimentală unde, în **capitolul IV** sunt formulate obiectivele de cercetare și descrise metodele de determinare a acidului dezoxiribonucleic. Cele mai cunoscute și utilizate metode sunt:

➤ Analiza polimorfismelor ADN amplificate aleator (Random amplified polymorphic DNA – RAPD), bazată pe Reacția în lanț a polimerazei (*Polymerase Chain Reaction* -PCR). Această metodă utilizează unul sau doi primeri cu o secvență arbitrară, bogată în G și C pentru a obține produși de amplificare PCR din ADN-ul genomic. Începând din anul

1990 în mai multe laboratoare s-a introdus o strategie nouă pentru amplificarea PCR a unor secvențe de ADN genomic.

➤ Analiza polimorfismelor de lungime ale fragmentelor amplificate (Amplified fragment length polymorphism – AFLP). Aceasta reprezintă o combinație între metoda RFLP și tehnica PCR (Vos și colab., 1995). După digestia ADN-ului cu enzime de restricție la capetele fragmentelor rezultate se atașează secvențe dublu catenare specifice (*adapters*) cu ajutorul ADN ligazelor. Aceste secvențe, împreună cu secvențele alăturate reprezintă situsul de restricție al enzimei și vor constitui locurile de fixare ale primerilor în vederea amplificării prin PCR.

➤ Analiza polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (*Restriction fragment length polymorphism* – RFLP). Cea mai cunoscută metodă de *fingerprinting* pentru ADN este reprezentată de polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție RFLP. RFLP reprezintă un ansamblu de fragmente specifice de ADN generat din ADN genomic prin digestie endonucleazică adecvată, ce diferă în lungime de la un individ la altul, sau la două alele ale genelor la același individ.

➤ Analiza microsateliților, care reprezintă secvențe scurte de ADN, întâlnite în numeroase fragmente de ADN și care ele însele sunt rezultatul repetiției de până la 20-30 ori a unităților de 2-3 baze. Exemplu citozina-adenina (C-A) sau guanină-adenină-timină (G-A-T). Metoda constă în amplificarea specifică prin PCR a unui microsatelit pentru un fragment dat din genom.

5. Observațiile și determinările efectuate (cap.V). Sunt prezentate datele experimentale privind daterminările cantitative și calitative a acidului dezoxiribonucleic la soiurile autohtone luate în studiu. Pentru determinarea cantitativă s-a făcut o cuantificare a probelor analizate, înregistrându-se cantitatea de ADN cu o anumită puritate. Datele au fost centralizate și au constituit punctul de plecare al cercetărilor noastre. Determinarea calitativă s-a putut face după o serie de etape de izolare și purificare a acidului dezoxiribonucleic.

În continuare este prezentat materialul biologic și descrise metodele de lucru utilizate. Materialul biologic îl constituie 12 soiuri autohtone: Bătută neagră, Busuioacă de Bohotin, Coarnă albă, Coarnă neagră, Fetească albă, Fetească neagră, Fetească regală, Furmint, Galbenă de Odobești, Grasă de Cotnari, Tămâioasă românească și Zghihară de Huși. Dintre aceste soiuri, doar zece se mai cultivă, iar două (Bătută neagră și Coarnă albă) se află în conservare în colecțiile ampelografice din țară. Materialul biologic a fost prelevat din două colecții ampelografice: Colecția ampelografică a Facultății de Horticultură din Iași și Colecția ampelografică a Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Iași.

Pentru caracterizarea soiurilor luate în studiu s-a folosit metoda ampelometrică, și analiza Cluster. Acest lucru a putut fi realizat cu sprijinul colectivului din cadrul Disciplinelor de Viticultură și Ampelografie a Facultății de Horticultură, Iași.

6. Datele experimentale (cap. VI). În vederea aplicării analizei Cluster s-au extras valorile medii pentru un număr de 30 de variabile, toți parametrii fiind centralizați și prelucrați într-un soft specific. S-au obținut datele cu privire la nivelul de înlănțuire fenotipică/morphologică a soiurilor, cu ajutorul coeficientului de afinitate sau înrudire (similaritate). În final a rezultat Histograma de ierarhizate a soiurilor, care arată apropierea dintre soiuri. S-au constatat:

- cele mai apropiate soiuri ca arhitectură a frunzei sunt Tamâioasă românească și Busuioacă de Bohotin, care au valoarea indicelui de similaritate egală cu 0, 1148;
- următoarele soiuri care se agregă și sunt deci, asemănătoare din punct de vedere arhitectural s-au dovedit a fi Furmint și Grasă de Cotnari cu valoarea indicelui de similaritate de 0, 1337;
- asemănătoare fenotipic sunt soiurile Zghihară de Huși și Bătută neagră, care au un indice de similaritate de 0,3721.

Pe baza tuturor acestor date s-a putut realiza o primă dendrogramă de grupare a soiurilor autohtone.

Elaborarea dendrogramei clasificării ierarhizate a soiurilor a fost efectuată conform *principiului pierderii minime a inerției* (criteriul Ward generalizat). Din analiza dendrogramei se constată existența a trei grupuri optime (ramuri): ramura **A** divizată în 2 subramuri **A1** și **A2** alcătuite din soiurile: Fetească regală, Fetească albă, Fetească neagră, Coarnă neagră, Furmint și Grasă de Cotnari; ramura **B** - rezultatul agregării soiurilor: Tămâioasă românească, Busuioacă de Bohotin și Coarnă albă; ramura principală **C**, alcătuită din soiurile Galbenă de Odobești, Zghihară de Huși și Bătută neagră.

Determinările ADN-ului au constat în extragerea lui din frunze tinere, după protocolul/procedeul Lodhi și colab. (1994), modificat de Pop R. și colaboratorii de la Cluj (2004). Extracția de ADN prin această metodă a dus la obținerea unor soluții de ADN incolore la aproape toate probele analizate. S-a încercat și un alt protocol de extragere, Doyle&Doyle (1990) prin care rezultatele înregistrate au fost mai mici, iar calitatea slabă a benzilor vizualizate după amplificare ne-a determinat să refacem o parte din etapele de lucru.

Analiza acidului dezoxiribonucleic s-a putut realiza în mai multe etape, cum ar fi: extragerea ADN, amplificarea cu o serie de primeri specifici sau aleși aleator și electroforeza produșilor rezultați în urma amplificărilor. Vizualizarea produșilor de amplificare s-a realizat în

lumină UV, benzile fiind detectate automat cu ajutorul unui program care stabilește mărimea fragmentelor de ADN prin compararea acestora cu un ADN standard (Ladder ADN). ADN-ul standard utilizat constă din 40 fragmente cuprinse între 100-4000 pb.

În analiza statistică s-au inclus doar benzile cu o intensitate luminoasă mare. Benzile polimorfice au fost notate cu 1, iar cele monomorfice cu 0. Prezența benzilor (notate cu 1) și absența benzilor (notate cu 0) au fost înscrise într-un tabel sub formă de matrice binară.

În total s-au amplificat 244 benzi, 163 obținute de la 24 primeri și 81 de la cei 12 primeri cu care s-au amplificat probele de ADN. Interpretare rezultatelor obținute prin RAPD în cele două procese de extragere și amplificare cu primeri diferiți este asemănător, principiul de lucru fiind practic, același. Diferența a constat în metoda de lucru, care a fost oarecum diferită, în sensul că modul de centralizare și prelucrare a informațiilor a fost specific fiecărui laborator în parte, iar coeficienții de calcul au fost de asemenea diferiți.

Gruparea variantelor pe clase înrudite genetic (cluster analyses) s-a realizat cu ajutorul programului NTSYS – pc 2.1., folosindu-se ca variabile coeficientul de similaritate genetică și UPGMA (Unweighte Pair-Group Method Arithmetic Average). A fost aleasă metoda UPGMA dintre toate celelalte metode similare pentru că evidențiază cel mai bine grupările (clusters) existente (Miligan, 1980). Rezultatul acestor grupări a fost concretizat în realizarea dendrogramei.

7. Interpretarea datelor experimentale (cap. VII). pentru stabilirea înruderii filogenetice a soiurilor.

În urma cercetărilor efectuate prin investigarea genetică a unor soiuri autohtone de viță de vie s-a putut confirma sau infirma datele existente în literatura de specialitate:

➤ Se probează existența gradului de înrudire filogenetică dintre soiurile Grasă de Cotnari și Furmint, demonstrându-se originea genetică comună a acestor soiuri, în toate cele trei dendrograme regăsindu-se în același nod/încrengătură.

➤ Se confirmă că Feteasca regală, are unul din genitorii soii Grasa de Cotnari, deoarece este foarte apropiată de aceasta prin coeficienții de similaritatea înregistrați.

➤ Soiul Fetească albă, genitorul matern al soiului Fetească regală apare în două din cele trei dendrograme la același nod și cu coeficienți de similaritatea mari, iar în cea de a treia dendrogramă Feteasca albă se agregă ceva mai îndepărtat. Rămâne ca ipoteză faptul că Feteasca albă este soiul ancestral din care au rezultat soiuri renumite.

➤ Tămâioasă românească și Busuioacă de Bohotin, citate în literatură ca fiind înrudite, confirmă acest aspect biologic doar într-o singură dendrogramă. În celelalte două apar la noduri diferite, împreună cu alte soiuri de proveniență orientală.

➤ Sortogrupul format din soiurile Bătută neagră, Galbenă de Odobești și Zghihară nu confirmă înrudirea lor. În nici o dendrogramă nu apar în aceleași noduri. Mult mai apropiate par a fi soiurile pentru vinuri roșii Bătută neagră și Fetească neagră, care apar în două din cele trei dendrograme în aceleași noduri, cu coeficienți de similaritate apropiați. Sub nici o formă soiurile care se aseamănă fenotipic Galbenă de Odobești și Zghihară de Huși cunoscut în literatură ca variație mugurală din soiul Galbenă, nu par a avea vreo legătură, genetic, ele fiind mult distanțate în arhitectura celor trei dendrograme.

➤ Sortogrupul format din soiurile Coarnă albă și Coarnă neagră, de proveniență orientală și cu asemănări fenotipice doar la struguri, nu și la celalate organe morfologice, nu par a fi înrudite ele regăsindu-se în noduri diferite în structura celor trei dendrograme.

➤ Mult mai discutabilă ar fi apropierea pe care o au, pe de o parte sortogrupul soiurilor aromate (Tămâioasă românească, Busuioacă de Bohotin) cu cel al soiurilor de masă (Coarnă albă și Coarnă neagră), a căror agregare apare deseori în arhitectura dendrogramelor.

Cercetările noastre bazate pe determinarea ADN-ului la soiurile autohtone de viță de vie, deschide drumul cercetărilor ce vor urma pe această temă.

SUMMARY

The doctoral thesis on "**PHYLOGENETIC RELATIONSHIP RESEARCH ON NATIVE VARIETIES OF VINE BY ANALYSIS OF DNA (DEOXYRIBONUCLEIC ACID)**" is mainly aimed at determining genetic parentage of indigenous varieties of vines.

Structure. The thesis is divided into seven chapters: the general part, which includes Chapters I-III and the experimental part that assembles Chapters IV-VII. In the general section the genetic heritage of the vine varieties (Chapter I) is briefly described, in Chapter II is presented an overview of indigenous varieties and the methods used to determine phylogenetic relatedness of vine varieties are described; the analysis in Chapter III is presented to deoxyribonucleic acid / DNA description.

The experimental research has objectives (Chapter IV), methods for investigating the genome native vine varieties by determining deoxyribonucleic acid, the biological material is described and presented as well as the working method (chapter V). The experimental results are presented (Chapter VI) and finally one finds the interpretation of experimental data (Chapter VII).

The research objectives were:

- genetic profiling of indigenous vine varieties under study;
- establishing genetic parentage of the studied varieties;
- choosing the most appropriate methods and molecular markers, by which we can

investigate the genome of vine varieties.

1. The genetic patrimony of the vine varieties (chapter I). Ecological plasticity of *Vitis vinifera* L. has led to thousands of varieties/cultivation spread to all continents of the world today. It has a striking phenotypic variability, which often leads to uncertainty and confusion about the identity of vine varieties.

Worldwide, we are witnessing a reduction in crop genetic diversity, a phenomenon called "genetic erosion". No vine has not been bypassed, a phenomenon seen both in the vine varieties cultivated and wild forms of vines. The major wine growing countries such as France, Italy Spain and Portugal have the richest vine gene pool. For example: France has about 633

indigenous grape varieties, MJ Boursiquot and collaborators present variety Gouais as European ancestral variety. Italy prides itself with the ancestral variety "Greeks" / "Grechetti" from which many varieties grown today originated, Spain is registered with more than one hundred native species in conservation (Gazette of Agriculture, Arad, "A Brief History of the vine", 2007).

The twenty-first century brought a new challenge with the economic globalization and the globalization of trade, including wine trade. The effects of globalization of trade which Romanian viticulture should face are the alignment of Romanian wines to international standards for a globalized trade and revaluing local grape varieties as well. Romania as a wine country, has a narrow genetic heritage, about 40-50 fruitful vine indigenous varieties, which were formed by natural selection, aided by anonymous winegrowers (Țârdea, 2008).

2. Methods for determining the phylogenetic relatedness of varieties (chapter II). They are briefly described in the paper. These are:

The ampelometric/botanical method, is to examine the morphological characteristics of the leaf, the ampelography of the main body, their expression measurements and numerical values. The idea belongs to Professor Herman Goethe, Higher School of Agriculture in Vienna, the international ampelographic Commission session in 1876, from Marburg, draws attention to the relationship between leaf shape and angles that form the main veins between them (Țârdea, 1992).

The ampelography descriptors method. The O.I.V. together with the International Plant Protection Organizations (UPOV) created it in 1984. The aim was to characterize the encoding of morphological and technological traits of agrobiological varieties for computer processing.

The enzymatic method. Enzymes are specialized proteins that catalyze biological reactions, ranking among the most remarkable biomolecules known because of their specificity and catalytic extraordinary power, far greater than that of chemical catalysts (Lehninger A.L., 1970). The possibilities of separation of proteins are based on differences in size, properties, solubility, electric charge, affinity adsorption and biological behavior of a protein for a specific liason. The best separation methods are: disc electrophoresis, isoelectric focusing, ion exchange chromatography. One can determine enzymes in grape and wine for determining the genetic relatedness between varieties.

Amino acid fingerprint. Amino acids are monomeric forms of proteins. Their molecule is characterized by two opposing functions: a carboxylic (acid) one and another amino (basic) one, both related to the same carbon atom called C α . Share amino acids in the grapes is high and represents 20-30% of the total nitrogen compounds (Poux, Ournac , 1970).

It was found that the amino acids contained in grapes varies from year to year, while not significantly changing the amino profile, but the report proline/arginine remained basically the same in each variety (Târdea, 2009).

DNA analysis. According to the hypothesis formulated by G.W. BEAD and E.L. Tatum (1941) conception of the gene was complemented by the formula "one gene = one enzyme." The gene controls the synthesis, function and specificity of the enzyme. The fact that genes are complex molecules consisting of nucleic acids, DNA or RNA (material that contains hereditary information) changing therefore the old school theory on genes.

Current state of research. Internationally there are already genetic mapping studies of vine varieties, which led to organizing databases with information about the mapping and sequence genes, which include protein databases. Such investigations take place nationally too, in Cluj, Iași, Bucharest, Craiova. Inquiries are directed mainly towards cosmopolitan vine varieties and indigenous varieties towards which specialists are growing increasingly concerned.

3. In the last chapter (III) of the general part, the description of deoxyribonucleic acid, its functions and the types known and described by geneticists are presented.

4. In chapter IV are presented **research objectives** and methods of investigation of deoxyribonucleic acid are described. The most widely used methods are:

➤ Analysis of randomly amplified DNA polymorphisms - RAPD) based on polymerase chain reaction (polymerase chain reaction - PCR). This method uses one or two primers with arbitrary sequence, rich in G and C to obtain PCR products from genomic DNA. Since 1990 several laboratories have introduced a new strategy for PCR amplification of genomic DNA sequences.

➤ Length polymorphism analysis of amplified fragment (Amplified fragment length polymorphism - AFLP). This is a combination of RFLP and PCR method (Vos et al., 1995). After DNA digestion with restriction enzyme fragments attached to the ends of double-stranded specific sequences (adapters) using DNA ligases.

➤ These sequences, together with adjacent sequences represent restriction site of the enzyme and will be placed as attachment of primers for PCR amplification.

➤ Restriction fragment length polymorphism analysis - RFLP. The best known method for DNA fingerprinting is the restriction fragment length polymorphism RFLP. RFLP is a set of specific DNA fragments generated by digestion of genomic DNA suitable endonuclease, which varies in length from one individual to another, or two alleles of genes within an individual.

➤ The microsatellite analysis, which are short sequences of DNA, found in many DNA fragments which are themselves the result of repetition times up to 20-30 units of 2-3

bases. Example: cytosine-adenine (CA) or guanine-adenine-thymine (GAT). The method involves PCR amplification of a microsatellite specific for a given fragment of the genome.

5. Observations and measurements made (chapter V). A study on quantitative and qualitative determination of deoxyribonucleic acid was conducted. For the quantitative determination made to quantify the analyzed samples, occurring with a certain amount of DNA purity. The data has been accumulated and represented the starting point of our research. Qualitative determination was made after a series of steps of isolation and purification of deoxyribonucleic acid.

The following describes the biological material and working methods addressed. The biological material was represented by 12 indigenous varieties: Bătută neagră, Busuioacă de Bohotin, Coarnă albă, Coarnă neagră, Fetească albă, Fetească neagră, Fetească regală, Furmint, Galbenă de Odobești, Grasă de Cotnari, Tămâioasă românească and Zghihară de Huși. Of these varieties, only ten still cultivated, while Coarnă albă, Coarnă neagră are in conservation ampelographic collections in the country. Biological material was taken from two ampelographic collections: ampelographic Collection of Faculty of Horticulture and ampelographic collection of Research and Development Station for viticulture and wine, Iasi.

6. Experimental data (chapter VI). For the cluster analysis were extracted mean a total of 30 variables, all parameters are centralized and processed in a specific software. Data was obtained on the chaining phenotype/morphologic varieties, with the coefficient of kinship or affinity (similarity). The final results of the hierarchical variety histogram show the relatedness of sorts. It was found:

- Nearest architecture leaf varieties were Tamaioasa romaneasca and Busuioaca de Bohotin whose similarity index value was equal to 0, 1148;
- The following varieties are aggregated and are thus similar in terms of architectural - Furmint and Grasa de Cotnari with a similarity index value of 0, 1337;
- similar phenotype were shown to be varieties of Zghihara de Husi and Batuta neagra, with a similarity index of 0,3721.

Based on all these data, one was able to achieve a classification dendrogram of first indigenous varieties.

Development of varieties hierarchical dendrogram classification was made according to the principle of minimum loss of inertia (generalized Ward criterion). By analyzing the dendrogram, three optimal groups (branches) divided into two sub-branches branch of A1 and A2 were found: Fetească regală, Fetească alba, Fetească neagra, Coarna neagra and Grasa de Cotnari and Furmint, branch B - the result of aggregation variety: Tamaioasa romaneasca, Busuioaca de

Bohotin and Coarna alba, mainline C, consisting of varieties Galbena de Odobesti, Zghihara de Husi and Batuta neagra.

The measurement of DNA extraction consisted of young leaves, where the protocol of Lodhi et al. (1994), modified by R. Pop et al. in Cluj (2004) was used. Extraction of DNA by this method yielded colorless solutions in almost all DNA samples. Doyle & Doyle (1990) tried a different extraction protocol, which recorded the results were lower and of poorer quality of the bands visualized after amplification, leading us to rebuild a part of the working stages.

Deoxyribonucleic acid analysis could be performed in several stages, such as DNA extraction, amplification with specific primers or a series of randomly chosen and electrophoresis products resulting from amplifications. View of product amplification was performed under UV light, the bands were automatically detected using a program that sets the size of DNA fragments by comparing them with a DNA standard (DNA Ladder). The used DNA standard consists of 40 fragments ranging from 100-4000 bp. In the statistical analysis were included only bands with a high luminous intensity. Polymorphic bands were scored 1, and the monomorphic 0. The presence of bands (marked with 1) and absence of bands (marked with 0) were entered in a matrix form of binary table.

A total of 244 amplified bands, 163 obtained from 24 primers and 81 of the 12 primers which have amplified DNA samples, was obtained. Interpretation of results obtained by RAPD in the two processes of extraction and amplification with different primers with similar working principle is basically the same. The difference was the working method, which was somewhat different so that the centralizing and laboratory processing was specific to each part, and calculating coefficients were also different.

Class grouping genetically related variants (cluster Analyses) was performed using the program NTSYS - pc 2.1., using as variables the coefficient of genetic similarity and UPGMA (Unweight Pair-Group Method Arithmetic Average). UPGMA method was chosen among other similar methods that best highlights the groups (clusters) existing (Miligan, 1980). The result of these groups was reflected in the achieved dendrogrames.

7. Establishing the phylogenetic relatedness of indigenous vine varieties.

Following research on the genetic analysis of grape varieties cultivated in Romania, one was able to confirm or disapprove the ideas sustained by some data in specific literature.

➤ There is evidence of the degree of phylogenetic relatedness of varieties Grasa de Cotnari and Furmint, showing the common origin of these varieties, all three being found in the same dendrogram node.

➤ Feteasca regala also confirms that its genitor Grasa de Cotnari is very close to it by registered similarity coefficients.

➤ Variety Feteasca alba of the parents Feteasca regala variety appears in two out of three at the same dendrogram node and similarity coefficients higher, and the third Feteasca alba aggregate dendrogram something beyond.

➤ Tamaioasa romaneasca and Busuioaca de Bohotin, cited in the literature as related support that view only a single biological dendrogram. The other two occur at different nodes, together with other varieties of oriental origin.

➤ The group composed of varieties Batuta neagra, Galbena de Odobești and Zghihara do not confirm relatedness between varieties. In no dendrogram do they appear at the same nodes. They seem to be much closer to red wine varieties Batuta neagra and Feteasca neagra, appearing in two of three nodes in the same dendrogram, with close similarity coefficients. Under no circumstances varieties that resemble phenotypically Galbena de Odobesti and Zghihara de Husi known in literature as bud variation of the Galbena vine variety, do not seem to have any connection, genetically, they are more spaced in the three dendrogram architecture.

➤ The varieties Coarna alba and Coarna neagra, of oriental origin and with a phenotypic similarities only seen in the grapes, but not in any of the other morphological organs, do not seem to be related, being found in three different nodes in the dendrogram structure.

➤ It is left to discussion the relatedness of aromatic varieties (Tamaioasa romaneasca, Busuioaca de Bohotin) with that of table grapes (Coarna alba and Coarna neagra), whose aggregation appears often in architectural dendrograms.

The research that has been started in this doctoral study, based on determination of DNA in local vine varieties, leads the way for further studies on the same topic.