

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A  
BANATULUI TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE HORTICULTURĂ ȘI SILVICULTURĂ**

**Biol. Ing. Andreea Adriana Uzun**

**(căs. Petcov)**

**REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT**

**„STUDII COMPARATIVE MORFO – CITOLOGICE ȘI MOLECULARE PRIVIND  
EVOLUȚIA UNOR POPULAȚII LOCALE DE *Allium sativum* L.”**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,  
Prof. dr.h.c. GALLIA BUTNARU  
Membru titular al Academiei  
Oamenilor de Știință din România**

**TIMIȘOARA**

**-2011-**

## INTRODUCERE

Cultura usturoiului (*Allium sativum* L.) este la fel de veche ca și istoria rasei umane și atât de extinsă cât însăși civilizația. Trimiteri la această plantă se regăsesc și-n Biblie și Koran reflectând importanța sa atât ca și aliment cât ca și plantă horticola (**Tapsell, 2006**). Familia *Alliaceae* cuprinde una dintre cele mai importante grupuri de plante, în ceea ce privește importanța economică, inclusiv culturi de legume majore, cum ar fi usturoi (*Allium sativum* L.), praz (*A. porrum* L. syn. *A. ampeloprasum*), ceapa (*Allium cepa* L.) (**Brewster, 1994**).

Cunoștințe de cultivare a usturoiului (*Allium sativum* L.), de utilizare culinară și medicinală au fost aplicate și de vechile civilizații din Orientul Mijlociu și din Est, provenind din studii și dovezi arheologice ample. Aceste dovezi includ pictograme și alte arte antice care apar pe hârtie, sculpturi în piatră inclusiv plante intacte (**Parejo, 2002**).

Usturoiul este bogat în antioxidanți, care ajută la distrugerea radicalilor liberi - particule care pot deteriora membranele celulare, pentru a interacționa cu material genetic, și, eventual, să contribuie la procesul de îmbătrânire, precum și dezvoltarea unui număr de condiții, inclusiv boli de inimă și cancer. (**Rivlin, 2006,2001**)

Ușor de cultivat, fără să necesite condiții speciale, usturoiul (*Allium sativum* L.) poate genera producții de peste 20 – 22 tone la hectar. La nivelul anului 2009 potrivit datelor furnizate de FAO a Națiunilor Unite, producția mondială a fost de peste 18 milioane tone, din care aproape 16 milioane tone produse de primii zece producători mondiali. Lider incontestabil: China cu peste 12 milioane tone (78 % din producția mondială), urmată de alte două țări din zona asiatică: India (645000 tone) și Coreea de Sud (325000 tone). Uniunea Europeană este al patrulea producător mondial (300052 tone); în continuare lista primilor zece producători se continuă cu: Egipt (258608 tone), Rusia (254000 tone), SUA (222000 tone), Argentina (140000 tone) și Ucraina (125000 tone).

Resursele genetice vegetale reprezintă una dintre cele mai valoroase resurse (**Ramanatha si Hodgkin, 2002**), asigurând diversitatea genetică atât de necesară deopotrivă fermierilor cât și amelioratorilor care o folosesc în obținerea unor noi cultivare care fie prezintă o productivitate ridicată, calitate îmbunătățită, sau sunt mult mai adaptate la stresul abiotic sau mult mai rezistente la patogeni și dăunători. Pe de altă parte, când medicina convențională e încununată de lauri și a preluat în mod oficial controlul, medicina alternativă, cu ramurile ei și vechi, și noi, precum homeopatie, fitoterapie, sau diete macrobiotice, își arată în statistici impactul asupra oamenilor.

În acest context obiectivul major al cercetării noastre s-a îndreptat spre identificarea unor noi surse de germoplasmă ce poate fi valorificată pe diferite căi având în vedere cadrul socio-economic actual ce impune găsirea unor metode alternative de exploatare rațională a resurselor genetice. Astfel s-a urmărit analiza fenotipică și genetică a unor populații de *Allium sativum* din zona de vest a României cu scopul de a identifica populații valoroase cu potențial ridicat de utilizare.

### ▪ Impactul tematicii de cercetare urmărite în contextul European, Regional și Național

Tematica de cercetare se încadrează în strategia europeană de conservare a resurselor genetice.

1. Conservarea *ex situ* a resurselor genetice Art. 9 al Convenției privind diversitatea biologică adoptată la Rio de Janeiro, 1992 (L 58/94) <http://www.cbd.int/default.shtml>

2. Convenția privind conservarea speciilor sălbatice și a habitatelor adoptată la Berna 1979 (L13/93) [http://www.coe.int/t/dg4/cultureheritage/nature/Bern/default\\_en.asp](http://www.coe.int/t/dg4/cultureheritage/nature/Bern/default_en.asp)

3. Convenția de la Washington CITES, 1973 (69/94) <http://www.cites.org>

## Specificațiile ITGRA

- "resursele genetice sunt conservate și puse, fără restricții, la dispoziția beneficiarilor generațiilor prezente și viitoare" ca parte a "zestrei ereditare a lumii."

- principiul privind suveranitatea statelor asupra propriilor resurse genetice (FAO Rezoluție 3/91)

- principiu regăsit în textul Convenției privind diversitatea biologică un an mai târziu (1992) în 1996 –din punct de vedere oficial se recunoaște pentru prima dată în cursul Conferinței Părților relevanța cunoașterii rudelor sălbatice a speciilor care sunt utilizate în agricultură și în alte domenii. Aceste specii reprezintă o resursă extraordinară de valoroasă pentru amelioratori și pentru viitoare încercări.

### **De ce avem nevoie?**

Conform documentului ITCPR/96/3

- colecții durabile *ex situ*
- refacerea resurselor periclitate *ex situ*
- extinderea conservării *ex situ*
- concentrarea programelor de conservare *ex situ*
- monitorizarea amenințărilor legate de pierderea de biodiversitate agricolă
- îmbunătățirea educației
- promovarea conștientizării publice cu privire la importanța conservării tuturor resurselor genetice cu importanță în agricultură

## ▪ SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Tema de doctorat e propusă spre analiza variabilității și eredității caracterelor și însușirilor implicate direct în productivitatea plantelor din populațiile locale colectate din partea de Vest a țării. Selecția unor populații valoroase care să poată fi utilizate pe diferite căi în ameliorarea clasică, în industria farmaceutică sau în medicina homeopată este necesară chiar dacă specia este bine studiată și exploatată. Condițiile climatice în continuă schimbare și fluctuațiile mari de temperatură sunt principalele cauze ale pierderilor de producție la majoritatea speciilor cultivate. Astfel se impune permanent căutarea unor soluții pentru a crește productivitatea plantelor în noile condiții de mediu și a gestiona cât mai bine resursele genetice existente. Pentru a ne atinge obiectivul principal ne-am propus următoarele obiective specifice:

1. Caracterizarea genotipurilor luate în studiu ca surse de germoplasmă cu posibilitate de valorificare în ameliorare.
2. Ereditatea și variabilitatea în reproducerea vegetativă a caracterelor morfologice și fenologia plantelor.
3. Studiul ciclului celular mitotic la populațiile analizate prin metoda citometriei în flux
4. Gradul înrudirii populațiilor prin utilizarea markerilor moleculari de la nivelul ADN.
5. Variabilitatea produșilor de metabolism din bulb.

- **Material biologic folosit**

Materialul biologic a constat din 16 populatii locale de usturoi de toamnă (*Allium sativum* L.), colectate din judetele Timis, Arad si Hunedoara (Tabelul 1).

Tabelul 1. Caracteristici ale populațiilor de *Allium sativum* la momentul colectării *in situ*

Nr. Crt.	Nr. catalog (al Disciplinei de Genetică)	Locul de colectare/Adresa	Anul colectării	Observații
1	1252	Mărăuș, nr. 18, jud. AR	2003	<b>Usturoi de toamnă</b>
2	1269	Șeitin, jud. AR	2003	<b>Usturoi de toamnă</b>
3	1484	Căpâlnaș, jud. AR	2004	<b>Usturoi de toamnă</b>
4	1763	Sebiș nr. 5, jud AR	2004	Usturoi de primăvară
5	1765	Sălăjeni nr. 21, jud. AR	2004	Usturoi de primăvară
6	1768	Sebiș, nr. 18, jud AR	2004	Usturoi de primăvară
7	1770	Sebiș, nr 94, jud AR	2004	Usturoi de primăvară
8	1231	Cenad,nr.1259, jud TM	2002	Usturoi de primăvară
9	1235	Chizătău, nr. 80, jud TM	2002	Usturoi de primăvară
10	1279	Căpăt, nr. 107, jud. TM	2003	Usturoi de primăvară
11	1480	Valcani, nr. 556, jud TM	2004	Usturoi de primăvară
12	753	Curechiu, nr. 95, jud HD	2001	Usturoi de primăvară
13	750	Băcăia, nr. 75, jud.HD	2001	Usturoi de primăvară
14	754	Poiana, nr 6, jud. HD	2001	Usturoi de primăvară
15	755	Poenița, nr. 46, jud. HD	2001	Usturoi de primăvară
16	772	Oprișești, nr. 4, jud.HD	2001	Usturoi de primăvară

- **Metodologia de lucru**

- **Organizarea experimentelor de câmp în condiții *ex situ***

În mod obișnuit, usturoiul (*Allium sativum* L.) se înmulțește pe cale vegetativă, prin „căței” (bulbi adventivi), numai în lucrările de ameliorare folosindu-se înmulțirea prin semințe. Înmulțirea vegetativă se desfășoară astfel:

Cultura de usturoi (*Allium sativum* L.) s-a înființat într-un teren însorit, s-au plantat „căței”, de usturoi toamna și de primăvară în luna octombrie la Timișoara și la Cenad la o distanță de 25 cm între rânduri și 15 cm pe rând iar căței s-au introdus la cca 3 cm adâncime în pământ. În perioada de vegetație cultura a fost prășită, irigată după cum a fost cazul.

Recoltarea bulbilor de usturoi (*Allium sativum* L.) s-a efectuat când s-au observat primele semne ale coacerii – îngălbenirea totală și începutul polignirii frunzelor și anume sfârșitul lunii iunie pentru proveniențele de toamnă și începutul lunii iulie pentru proveniențele de primăvară. Nu s-a permis uscarea definitivă a frunzelor înainte de recoltare deoarece, bulbii răscopți se dezgolesc de solzi și se desfac în căței, ceea ce duce la mari pierderi de roade la recoltare și în perioada păstrării.

Recoltarea s-a efectuat pe timp uscat, bulbii scoși s-au scuturat de pământ evitând vătămarea mecanică și s-au așezat pentru a se usca la suprafața solului pentru 2 zile la soare iar după uscare s-au retezat frunzele lasând un „ciot”, de 1,5 – 2 cm de asupra umerilor bulbului iar rădăcina a fost scurtată până la 1 cm. Usturoiul (*Allium sativum* L.) s-a păstrat la o temperatură de 1 – 3 °C și o umiditate a aerului de 75%.

După, recoltare s-au efectuat măsurători pentru lungimea plantei, diametru căpățânii, înălțimea căpățânei la populațiile de usturoi (*Allium sativum* L.) și s-au numărat pentru fiecare căpățâna de

usturoi căței obținuți, după care s-au cântărit căței de usturoi (*Allium sativum* L.), pentru a cuantifica diferențele dintre populațiile locale de usturoi (*Allium sativum* L.)

▪ **Calculul statistic și interpretarea datelor rezultate în urma experiențelor**

Rezultatele obținute în urma măsurătorilor efectuate la partea practică a experimentului au fost analizate prin metoda *analiza varianței*. Pentru prelucrarea statistica s-a folosit programul Statistica7/Windows:

- Media aritmetica ± abatere standard
- Corelatii
- Analiza semnificatiei diferentiei-Testul Duncan
- Analiza variantei – ANOVA/MANOVA

▪ **Metoda extracției ADN**

Frunze proaspete de usturoi au fost colectate și păstrate la -20°C pentru valorificarea ulterioară. 50 mg de frunze au fost folosite pentru extracția ADN total folosind metoda 2xCTAB (cu câteva modificări, Saghai-Marooof, 1984). ADN-ul extras a fost apoi curățat cu kitul DNA Clean Kit de ZymoResearch (BioZyme). Calitatea și cantitatea de ADN extrasă a fost cunantificată prin spectrofotometrie, prin efectuarea raportului obținut în urma măsurătorilor la lungimile de undă 260nm și 280nm. ADN – ul extras a fost diluat ulterior la 50 ng/ μl.

☞ **Reacția PCR-RAPD**

Pentru analiza RAPD s-au utilizat 10 de primeri OP-A (Operon Technologies, Aalmeda). Amplificarea ADN a fost realizată într-o reacție PCR de 20 μl volum, ce conține următoarele componente:

- 50 ng ADN, Producții de amplificare au fost separați în gel de agaroză. Gelurile au fost fotografiate la lumina UV. Marimea fragmentelor amplificate a fot estimată în funcție de un marker ADN specific (Midle range Ruler DNA, Fermentas). Pentru asigurarea reproductibilității reacțiilor s-a procedat la repetarea experimentelor din același material ADN precum și din ADN extras dintr-o două probe de frunze.

Tabelul 2. Secvența primerilor RAPD utilizați (Biosearch Technologies, INC)

Nr. crt.	Secvența de oligonucleotide a primerilor
1	P2-5'd(GGT-GGC-CAA-G)3'
2	P5-5'd(CAC-TGG-CCC-A)3'
3	P7- 5'd(TGG-TCG-GGT-G)3'
4	P8- 5'd(CTA-AGC-GCA)3'
5	P9- 5'd(TTG-CTG-GGC-G)3'
6	P11- 5'd(CCG-CTG-GAG-C)3'
7	P12 -5'd(CGG-AGA-GCG-A)3'
8	P13- 5'd(CGA-CCA-GAG-C)3'
9	P15- 5'd(GCT-CCC-CCA-C)3'
10	P16 -5'd(TTG-CTG-GGC-G)3'

▪ **Metoda citometriei în flux**

Se recoltează aproximativ 0,5 cm<sup>2</sup> de țesut foliar se mărunțește foarte bine în 0,5 ml Nuclei Extraction Buffer timp de 30-60 secunde, urmată de incubarea probei în acest tampon pentru încă cel puțin 30-90 secunde la temperatura camerei.



Fig.1. FlowCitometrul utilizat în experimentare

(din cadrul disciplinei de Genetică, USAMVB Timișoara)

Apoi amestecul se toarnă într-un filtru Partec de 50  $\mu\text{m}$ , după care se adugă câte 2 ml/probă soluție de colorare. Probele se incubează la întuneric timp de cel puțin 1h, înainte de a se analiza la flowcitometru. Probele astfel preparate sunt stabile timp de 12 ore la 4°C. Analiza la Flowcytometru a probelor de usturoi (*Allium sativum* L.), s-a realizat pe „The Partec CyFlow SL flow cytometer complies with the European IVD Directive 98/79/EC and is therefore marked with the CE sign” (Fig. 1).

👉 Protocolul de prepararea soluției de colorare (Staining Solution):

Pentru analiza unei probe se amestecă 2 ml soluție tampon de colorare (Staining Buffer) cu 12  $\mu\text{l}$  soluție stoc PI (propidium iodide) și 6  $\mu\text{l}$  soluție stoc RNA-ză; această soluție de colorare este valabilă 24 h dacă este păstrată la 4°C.

#### ▪ Metode biochimice de determinare a conținutului și prezenței unor substanțe utile în bulbi

Bulbi de usturoi (*Allium sativum* L.) din populațiile locale luate în studiu (din cele 16 de populații locale), au fost curățați spălați cu apă deionizată. Umiditatea reziduală se evaporă la temperatura camerei prin uscare timp de 2 – 3 zile pe o hârtie curată, pentru a evita dezvoltarea microorganismelor fungice. Materialul vegetal este tăiat și triturat în laborator.

Analiză chimică pentru determinarea compoziției eșantionului a fost efectuat folosind procedura standard. Conținutul de apă a fost determinată de uscare a aerului, conținutul de grăsimi prin extracție Soxhlet, glucidele calculate prin diferență, conținutul de cenușă prin incinerare, fibră brută prin incinerare și digestie cu acid și digestie cu baze, iar proteinele prin metoda Kjeldahl. (AOAC, 1990).

Estimarea valorii energetice a fost estimată (în kcal) prin înmulțirea procentului proteină brută, lipide brute și carbohidrați, cu factorii recomandați (2,44, 8,37 și respectiv 3,57), folosiți în analiza legumelor. Valoarea calorică a fost determinată pe baza factorului Atwater (FAO, 2006a).

Pentru extracție a fost folosit ca solvent eterul de petrol în condiții supercritice, temperatura în extractor a fost de 40°C, iar presiunea și fluxul de CO<sub>2</sub> au fost 25,33 MPa și 30 g min<sup>-1</sup>, timpul de extracție a fost de 1,5 h.

Pentru înmuiere la temperatura camerei, 100 g de probă, usturoi triturat într-un recipient ermetic a fost lăsată 24 ore, utilizând solvenți care se folosesc la extracție cu Soxhlet. Pentru extracția prin metoda Soxhlet, 100 g de probă a fost utilizată, folosind ca solvenții eter de petrol și 35 – 60 etanol 99,7% 8 h. Extractele sunt filtrate și separate la temperatură joasă într-un evaporator rotativ. Amestecul separat este reluat cu apă. Înainte de utilizare extracte, închise ermetic, au fost depozitate într-un frigider.

### 🐦 Decelarea și cuantificarea alil – izotiocianatului prin tehnica GC – MS

Identificarea și cuantificarea alil – izotiocianatului s-a bazat pe adaptarea metodelor lui **Jiang și colab.** Metoda propusă s-a diferențiat prin protocolul de lucru aplicat în etapa de pregătire a probei de alil – izotiocianat (extracție lichid – lichid cu metanol), utilizarea ca standard extern a alil – izotiocianatului de puritate 99% (Sigma), precum și aplicarea unui regim de variație a temperaturii cuptorului gaz-cromatografului mai rapid.

## ▪ REZULTATE ȘI DISCUȚII

### ➤ Caracterizarea proveniențelor din colecție sub raportul caracterelor de prim interes, în folosirea ca material inițial pentru ameliorare

Se fac referiri la greutatea căpățânii a căteilor și numărului acestora cuprinși în căpățână. Ordinea de prezentare a datelor este de la aprecieri generale privind ansamblul proveniențelor la particularizări în care se evidențiază datele fiecărei proveniențe.

În tabelul 8 și reprezentările grafice (Fig. 2; 3; 4 ) se redă prin media generală a caracterelor de interes (greutatea căpățânii, și numărul căteilor ce alcătuiesc căpățâna), stabilită pe ani și în ciclul anilor de studiu ( 2005 – 2008), separația formelor usturoiului de primăvară și de toamnă. Potrivit datelor pentru greutatea căpățânii, în cultura de la Timișoara se întâlnesc cele mai ridicate valori în anul 2008, atât în ansamblul proveniențelor de primăvară cât și celor de toamnă.

Anul 2008 a excelat prin condiții climatice favorabile, temperaturi moderate și disponibilul cel mai ridicat de precipitații în special toamna, la înrădăcinarea plantelor și în luna martie, favorizând demarajul activ al creșterii plantelor. De condiții asemănătoare a beneficiat cultura în anul 2006, în care caracterele menționate au avut valori apropiate celor din anul 2008.

L a Cenad pe teren cu sol ușor, valorile de vârf au fost înregistrate în anii 2005 – 2006, sub influența aceluiași factor, umiditatea ridicată asigurată în perioada de creștere activă a plantelor în lunile de primăvară.

Numărul căteilor în căpățână variază la ambele forme de usturoi în limite mai apropiate, fiind caracterul cu cea mai mare stabilitate.

Tabelul.3 Centralizatorul valorilor medii ale ansamblului de proveniențe cultivate *ex situ* în două locații, în ciclul complet al anilor experimentali 2005 – 2008

Anii de cultivare	Usturoi de primăvară				Usturoi de toamnă			
	Timișoara		Cenad		Timișoara		Cenad	
	Greutatea căpățânii (g)	Număr căței în căpățână	Greutatea căpățânii	Număr căței în căpățână	Greutatea căpățânii (g)	Număr căței în căpățână	Greutatea căpățânii (g)	Număr căței în căpățână
2005	9,16	8,89	10,35	9,63	13,32	7,53	14,37	8,17
2006	10,15	9,81	10,06	9,81	14,32	8,47	14,27	8,60
2007	9,26	9,60	8,99	9,44	14,08	8,83	13,60	8,87
2008	10,44	9,44	9,31	9,47	15,07	8,40	14,12	8,53
<b>MEDII GENERALE</b>								
2005 - 2008	9,75	9,43	9,67	9,58	14,44	8,31	14,08	8,54

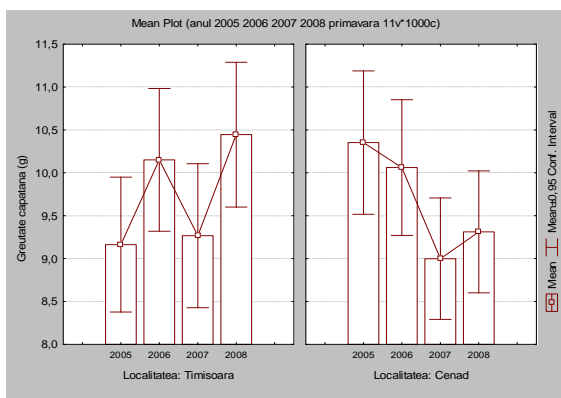


Fig 2. Diferențierea ansamblului de proveniențe în anii analizării, prin greutatea căpățanii, la cultivarea în Timișoara și Cenad

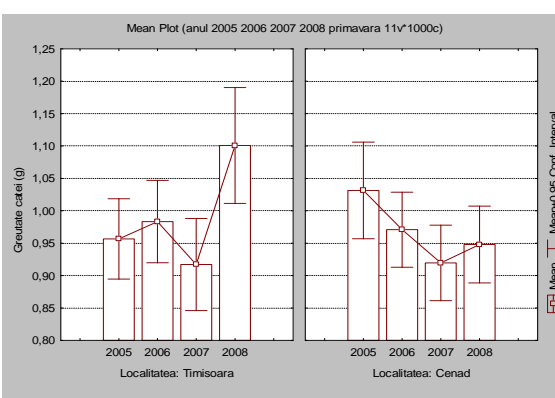


Fig 3. Diferențierea ansamblului de proveniențe în anii analizării, prin greutatea căței din căpățână (g), la cultivarea în Timișoara și Cenad

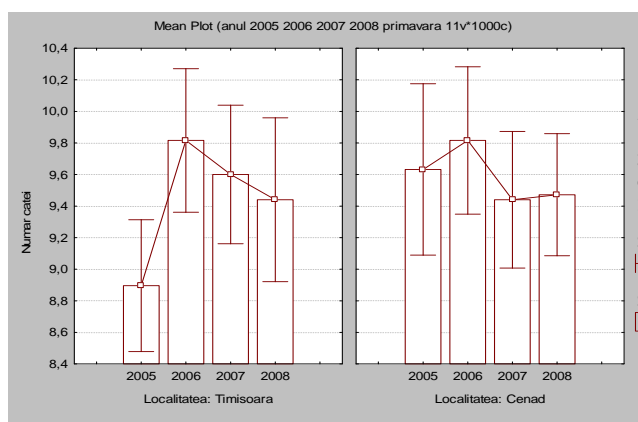


Fig. 4 Diferențierea ansamblului de proveniențe în anii analizării, prin numărul căteilor în căpățână, la cultivarea în Timișoara și Cenad

În figurile 5 – 6, ilustrăm deosebirea formelor usturoiului de toamnă și de primăvară, prin nivelurile de exprimare la nivelul plantelor aparținătoare, caracterelor implicate în productivitatea cantitativă.



Fig.5 Landraces of spring garlic Sebiș (original)



Fig. 6 Landraces of autumn garlic Mărăuș (original)

- **Caracterizarea proveniențelor usturoiului de toamnă sub raportul caracterelor implicate în productivitatea cantitativă a plantelor**

Urmărind caracterizarea proveniențelor usturoiului de toamnă sub raportul nivelului de exprimare la plante a caracterelor cu interes pentru producție. Prin aceste prime date privind numărul mai ridicat al căteilor în căpățână și cu observația potrivit căreia proveniența de Șeitin nu formează tijă florală, se confirmă manifestarea ei cu tendință de trecere în categoria formelor usturoiului de primăvară.

Tabelul 4. Diferențierea proveniențelor usturoiului de toamnă prin medii generale la caracterelor de producție la plante, stabilite în ansamblul anilor și localităților de cultivare *ex situ*

Nr. crt.	Landraces	bulb weight (g)	clove weight (g)	no of cloves/bulb
		Mean±Ab.st	Mean±Ab.st	Mean±Ab.st
1	Șeitin	15,75±3,07	1,75±0,24	8,92±2,12
2	Căpâlnaș	15,38±2,94	1,72±0,29	8,69±1,45
3	Mărăuș	11,67±2,60	1,49±0,34	7,66±1,62
MEANS		14,27±3,41	1,65±0,31	8,43±1,83

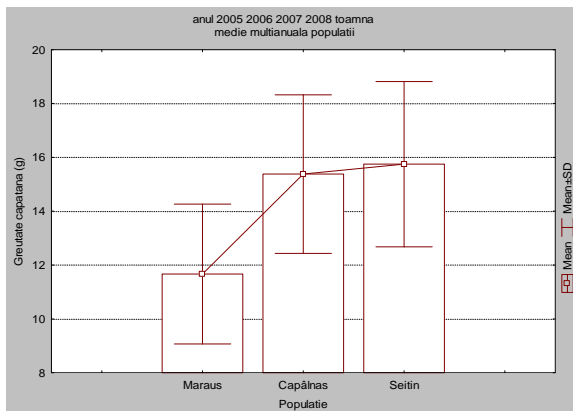


Fig. 7. Diferențierea proveniențelor prin greutatea căpățânii, în medie pentru ansamblul anilor de cultivare *ex situ*

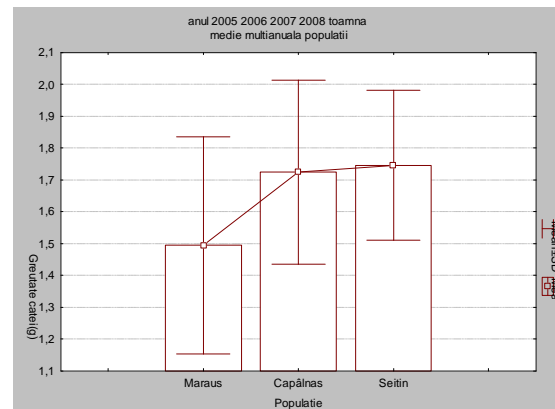


Fig. 8. Diferențierea proveniențelor prin greutatea individuală a căteilor/căpățână, în medie pentru ansamblul anilor de cultivare *ex situ*

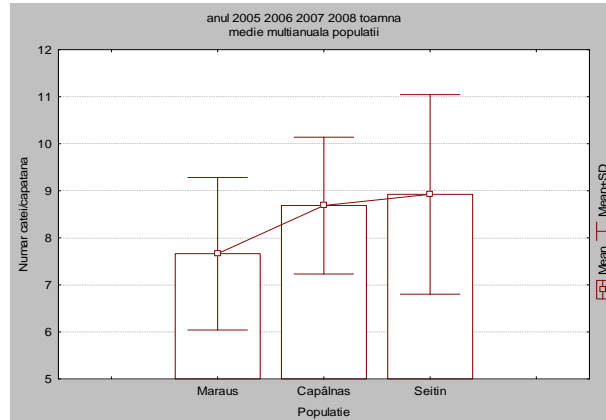


Fig.9. Diferențierea proveniențelor prin numărul căteilor din căpătână, în medie pentru ansamblul anilor de cultivare *ex situ*

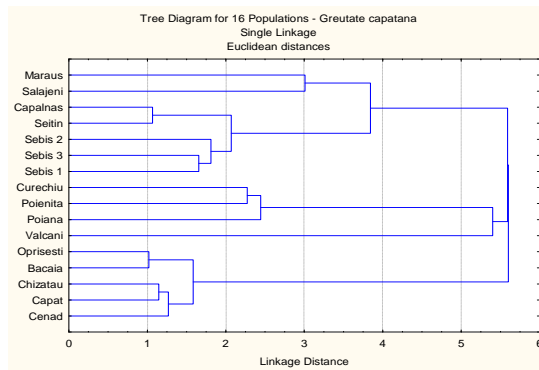


Fig. 10. Dendrograma obținută în urma analizei caracterului greutatea căpătâniei la populațiile de *Allium sativum* L.

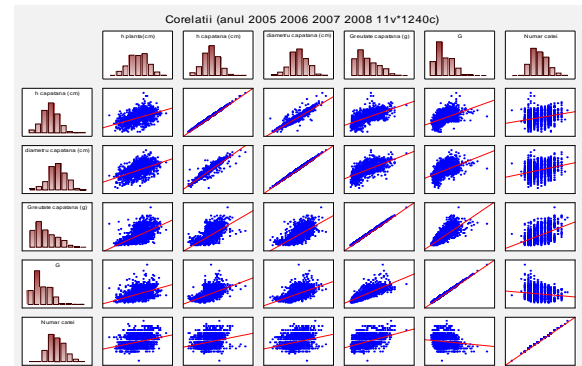


Fig. 11. Coeficientul de corelație între caracterele plantelor pe toți cei patru ani de cultivare

Toate caracterele de producție sunt corelate pozitiv între ele (Fig. 11), coeficientul de corelație fiind foarte semnificativ. Excepție este corelația negativă foarte semnificativă între greutatea medie a căteilor individuali și numărul de căței/căpătână ( $r = -0,1338$ ;  $p = 0,000$ ).

- **Analiza relațiilor filogenetice la populațiile de *Allium* prin utilizarea markerilor moleculari ADN.**

În urma extracției ADN din frunze de *Allium*, calitatea și cantitatea acestuia a fost verificată prin analiza spectrofotometrică și migrare în gel de agaroză după colorarea în prealabil cu bromură de etidiu (fig.12).

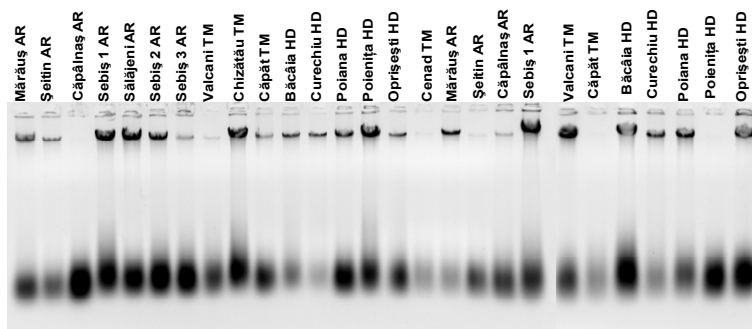


Fig. 12. Calitatea ADN extras la populațiile locale la *Allium sativum* L. prin migrarea a 10 % din cantitatea totală în gel de agaroză 1% (fara tratare cu RNAza). (1-16 reprezintă probe extrase de la fiecare populație în parte; 17-27 duplicări ale extracției acolo unde a fost posibil)

În figurile următoare (Fig.13-14) sunt prezentate rezultatele amplificării PCR cu diferiți primeri RAPD la toate cele 16 populații de *Allium* comparativ cu varianta Martor (Usturoiul de Cenad). Probele ADN de la diferitele populații au fost amplificate cu primeri RAPD. Producții de reacție au fost separați în gel de agaroză de 1.2% și vizualizați în lumină UV după colorare cu bromură de etidiu.

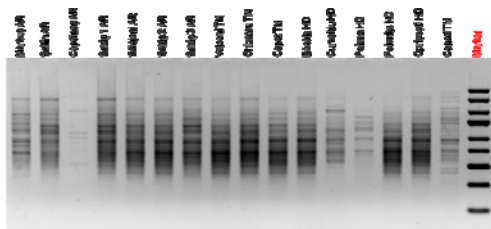


Fig. 13. Profilul RAPD la populațiile de *Allium sativum* L. cu oligomerul P5-5'd(CAC-TGG-CCC-A)3'

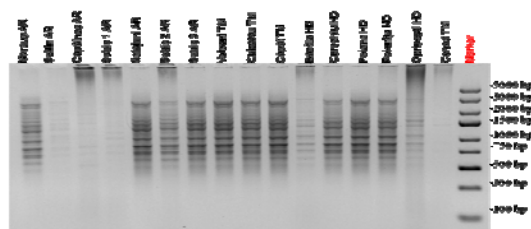


Fig. 14. Profilul RAPD la populațiile de *Allium sativum* L. cu oligomerul P9-5'd(TTG-CTG-GGC-G)3'

În cazul analizei RAPD este foarte importantă reproductibilitatea separării produșilor de RAPD, așa că s-a efectuat repetarea reacțiilor PCR de cel puțin 2 ori și s-au comparat rezultatele obținute pentru fiecare populație în parte.

Pentru analiza polimorfismului molecular la populațiile de usturoi s-au luat în considerare doar acele benzi care prezentau amplificare clară și care se regăseau la cele 2 repetiții. În scopul aprecierii obiective a electroforegramelor a fost calculat polimorfismul (P, %) fragmentelor amplificate de ADN. Pentru o mai bună cuantificare a rezultatelor producții de amplificare s-au notat cu 1 pt. benzile prezente și cu 0 pt. benzile absente. Spectrele electroforetice pot fi utilizate pentru construcția dendrogramelor, care reflectă gradul de similaritate a genotipurilor analizate. Aceasta analiză folosește în calitate de punct de reper prezența benzilor, notate prin 1, și absența lor, notate prin 0. Ulterior s-a trecut la calcularea distanțelor genetice și construirea dendrogramei filogenetice (fig.15).

La populațiile de usturoi (*Allium sativum* L.) polimorfismul genetic obținut este de 16,39 %.

Nu este un polimorfism ridicat care însă poate fi explicat prin natura provenienței populațiilor. Distanțele geografice între zonele de colectare nu sunt foarte mari de aceea și polimorfismul lor este scăzut. Mai trebuie spus că în general stabilitatea genomului la usturoi este ridicată. Numărul de benzi obținute în urma amplificării a variat între 2 (Primer RAPD 2) și 10 benzi amplificate (Primer RAPD 5). Intensitatea benzilor a fost de asemenea diferită, putând fi clasificate în benzi de intensitate scăzută, medie sau intensă. Pe baza numărului de benzi amplificate s-au calculat distanțele genetice între populații

Între populațiile analizate, distanțele genetice sunt sub 0,50 indicând o grupare foarte apropiată ca și un grad de înrudire apropiat. Analiza UPGMA relevă acest fapt și face o clasificare filogenetică a genotipurilor analizate (Fig.15). Se poate observa că atât genotipul Martor (Cenad) stă la baza clusterului cât și populația de AR se ramifică independent de restul genotipurilor ceea ce indică o evoluție separată la un moment dat dintru-un ancestor comun. De altfel din clusterul obținut se distinge prin grupare foarte apropiată pe zonele de proveniență a populațiilor.

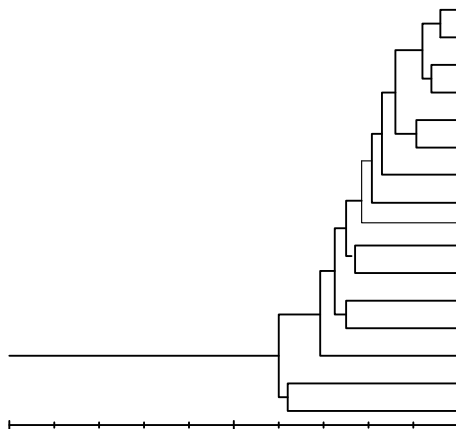


Fig.15. Dendrograma obținută în urma analizei UPGMA la populațiile de *Allium*

De asemenea se observă o diferențiere în interiorul grupurilor de proveniență zonală. În toate cazurile se observă o tendință clară de distribuție în funcție de zona geografică, ceea ce indică, că este vorba de o izolare bazată pe modelul distanței (fig.15). În general variabilitatea genetică în cazul populațiilor de usturoi este scăzută ceea ce reflectă o oarecare stabilitate conservată a genomului. Având în vedere că nu se cunoaște cu exactitate modul în care au apărut aceste populații este prematur în a ne pronunța cu privire la baza lor genetică în condițiile utilizării unei singur tip de markeri genetici. Din păcate resursele existente până la momentul experimentării ne-au permis doar analiza RAPD. De asemenea în cazul în care produșii de PCR amplificați se diferențiază prin câteva nucleotide este greu de cuantificat fiecare bandă în parte prin analiza profilelor electroforetice în gel de agaroză. Pentru a afla care este baza genetică a acestor clone se poate folosi tehnica ITS (internal transcribed sequence) a ADN ribosomal. Lungimea acestor secvențe poate evalua foarte rapid de la un genotip la altul fapt care duce la o mare variație a acestor secvențe în genom, făcându-le candidații ideali în studiile de filogenie.

▪ **Analiza rezultatelor obținute prin citometria în flux**

Citometria în flux este una din metodele cele mai utilizate în determinarea conținutului de ADN precum și în analiza distribuției celulelor în diferite faze ale ciclului celular. Se pot distinge patru faze celulare în timpul diviziunii mitotice: G1, G2, S (faza de sinteză a ADN), și M (mitoza propriu-zisă). Totuși fazele G2 și M care au același conținut de ADN nu pot fi discriminate separat doar pe baza conținutului de material genetic. Analiza citofotometrică în cazul populațiilor de usturoi s-a făcut prin utilizarea softului producătorului care a permis calcularea procentului de celule ce se află în diferite faze ale ciclului celular. De normalitatea ciclului celular depinde dezvoltarea ulterioară și toate procesele de creștere a plantei. Din acest motiv studiul ciclului celular care constituie punctul inițial al creșterii numărului de celule și implicit a organelor este foarte important. Citogramele cele mai reprezentative obținute sunt prezentate mai jos.

Analiza FCM la populația de Cenad din județul Timiș, indică o distribuție normlă a celulelor în ciclul celular fiind în concordanță cu media citogramelor ciclului celular observate la

celelalte populații. Se observă o activitate intensă în mitoză propriu – zisă, cu distribuția normală a celulelor.

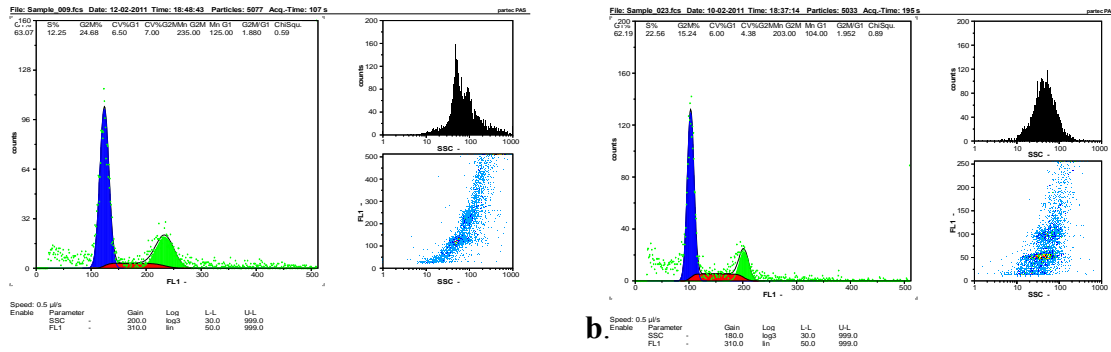


Fig. 16. Citograma distribuției celulelor în ciclul celular la populația de usturoi (a.Cenad; b.Sebiș)

În concluzie se poate observa că modificarea condițiilor de cultivare de la cele naturale la cele *ex situ* nu are nici o influență asupra ciclului mitotic la populațiile de *Allium* analizate. Datele obținute sunt în concordanță cu datele citologice privind analiza ciclului celular la plante.

▪ **Analiza evaluării din punct de vedere biochimic al populațiilor de *Allium sativum* L.**

Calitatea usturoiului este o însușire genetică determinată de un număr mare de gene și fiind o însușire extrem de complexă, determinată de caracterele morfologice, biochimice, calitative și tehnologice, fiind foarte greu de controlat. Compoziția chimică a usturoiului (*Allium sativum* L.) este determinată de genotip și de condițiile de cultură. Din greutatea totală usturoiul conține 65 – 87% apă, restul de 13 – 35 % fiind substanță uscată, din care aliina are o pondere destul de importantă. Plantele reacționează la factorii de stres abiotic, prin producerea aminoacidului prolină, aici se poate specifica, prin remarcă populației locale de Cenad din județul Timiș care s-a dovedit a fi un bun acumulator de prolina atât în condiții normale de hidratare cât și în condiții de secetă (Petcov (Uzun) și colab., 2009), în schimb determinarea cantitativă a pigmentilor clorofilieni din frunze proaspete la populația de usturoi Cenad, s-a înregistrat un conținut sub medie de 7,95mg/l pentru clorofila de tip a și 4,76mg/l pentru clorofila de tip b.(Petcov(Uzun) și colab., 2009).

Tabelul 5. Prezentarea concentrațiilor de apă, cenușă, glucide, lipide, protide, fibre, aliina prezente în populațiile locale de usturoi (*Allium sativum* L.)

Proba	Apa %	Cenușă %	Glucide %	Lipide %	Protide % (N x 6,25)	Fibre %	Valoare energy. (kcal)	Aliina (mg /g)
Cenad TM 1231	65,0	1,3	27,3	1,2	6,1	1,1	2	6,12
Chizătău TM 1235	87,0	0,6	12,1	0,1	0,5	0,6	4	7,49
Căpăt TM 1279	76,4	0,4	12,6	0,1	2,0	0,5	5	7,03
Valcani TM 1480	88,0	0,7	19,8	0,1	1,3	0,7	3	7,55
Mărăuș AR 1252	94,0	0,7	15,8	0,1	2,0	0,8	6	3,9
Șeitîn AR 1269	81,0	0,7	18,7	1,1	3,8	0,9	7	3,1
Căpălnaș AR 1484	74,0	0,9	18,3	1,4	2,9	0,4	4	4,2
Sebiș AR 1763	88,0	0,9	19,8	0,3	1,3	0,5	2	4,39
Sălăjeni AR 1765	65,0	1,1	27,3	1,2	6,1	0,9	13	2,8
Sebiș AR 1768	78,0	1,3	16,0	0,6	8,3	0,8	10	3,2
Sebiș AR 1770	79,0	0,9	22,8	0,7	8,0	0,5	8	4,0
Curechiu HD 753	76,4	0,9	19,8	1,0	6,4	0,3	6	5,1
Poiana HD 754	84,0	0,6	19,8	0,8	6,2	0,9	13	4,9
Poienița HD 755	90,0	0,5	16,0	0,3	3,0	0,3	3	5,2
Oprișești 772 HD	65,0	1,1	27,3	1,4	6,1	1,0	2	4,6
Băcăia HD 750	76,4	0,5	20,6	1,8	2,0	0,8	3	5,7

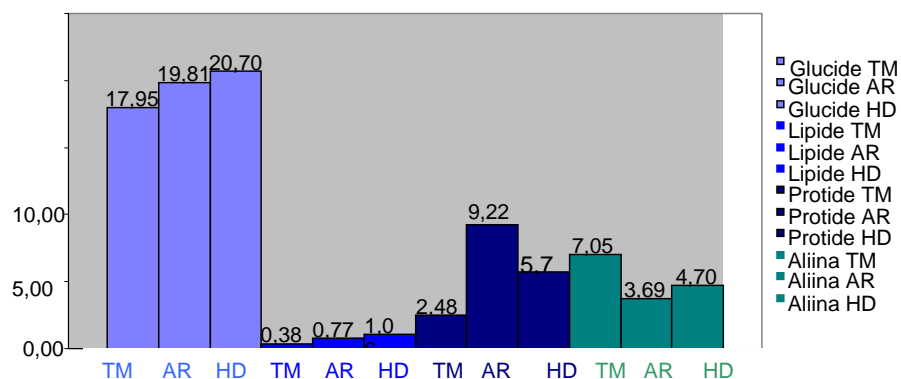


Fig.17. Reprezentarea grafică a mediilor concentrației de aliină, glucide, lipide și protide la populațiile locale de

Rezultatele obținute (Fig.17 ), evidențiază un conținut ridicat de aliină la populațiile de usturoi din județul Timiș ( $7,05 \pm 0,29$  mg/g ) (Tabelul 5) comparativ cu populațiile din județul Hunedoara ( $5,14 \pm 0,16$  mg/g ) respectiv Arad ( $3,67 \pm 0,21$  mg/g ), pe când conținutul de aliină în usturoi este de 2,8 - 7,7 mg/g, greutate în stare proaspătă, acesta putând varia între 8 – 25%, reprezentând 63 – 84% din substanța uscată, principalele componente sunt reprezentate de proteine, glucide, cenușă, etc.Ținând cont de faptul că la 100 g usturoi proaspăt conținutul de

glucide este între 20 -25 %, noi am obținut o concentrație de 20,7 % la populațiile din județul Hunedoara, urmate de populațiile din Arad (19,81%) și Timiș (17,95 %). În ceea ce privește conținutul de lipide s-a constatat că populațiile din județul Arad, cu o medie de  $0,77 \pm 0,17$  % și cele din județul Hunedoara  $1,06 \pm 0,23$  %, corespund limitei standard în analiza legumelor. Valorile obținute în urma rezultatelor la populațiile de usturoi (*Allium sativum* L.) din județul Timiș ( $0,38 \pm 0,24$ ) (Tabelul 5) au scăzut situându-se sub limita standard de 0,6 %, corespunzătoare în analiza legumelor. Conținutul de protide este cuprins în medie între 6% și 7% din substanța proaspătă, iar aminoacizii esențiali, precum și raportul echilibrat între aceștia, dau usturoiului.

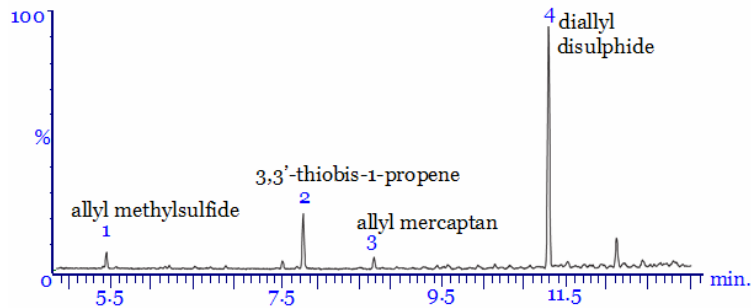


Fig. 18 Cromatograma GC – MS a extractului de usturoi (*Allium sativum* L.)

Cromatograma obținută (Fig. 18), reflectă faptul că prezența diallyldisulphide într-un timp relativ scurt este prezent în concentrație maximă urmat de allyl methylsulfide, allyl mercaptan.

#### ▪ CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

1. Toate proveniențele urmărite în studiu se impun atenției ca material inițial de ameliorare, pentru specificul subzonelor din care s-au colectat;
2. Drept criteriu expres pentru selectarea biotipurilor din cadrul proveniențelor este amplitudinea lărgită de variație a caracterelor de interes, spre valori superioare, care este evident asociată cu valorile mai ridicate, în special pentru greutatea căpășanii plantelor;
3. Analiza filogenetică bazată pe markeri moleculari indică o grupare apropiată între populațiile de usturoi (*Allium sativum* L.) analizate cu distanțe genetice mici ceea ce denotă o stabilitate ridicată a genomului;
4. Analiza ciclului celular la populațiile locale de usturoi (*Allium sativum* L.) relevă o evoluție normală a ciclului celular, deși coeficientul de variabilitate la unele populații din județul Hunedoara și Timiș, este cu 2% mai mare decât pragul de 5%; Aceste variații pot fi puse pe seama eficienței protocolului de izolare a nucleilor, care probabil în unele cazuri a fost mai puțin eficient.
5. Numărul de celule analizate la Flowcimeter au variat între 5000 și 10000, ceea ce este suficient pentru analiza distribuției celulelor în fazele de diviziune. Nu se remarcă nici o evoluție anormală la cele 16 populații de usturoi (*Allium sativum* L.) analizate ceea ce relevă din nou stabilitatea genomului, capacitatea de adaptare ridicată la condițiile de mediu;

6. Conținutul de aliină prezent în bulbii de usturoi este mai ridicat și se încadrează în limitele standard, la populațiile de usturoi din județul Timiș comparativ cu cele din județul Arad și Hunedoara;
7. Prin conservarea *in situ*, materialul vegetal este expus modificărilor genetice ca urmare a selecției naturale sau artificiale. Conservarea *ex situ* prin tehnicile tradiționale de stocare a resurselor vegetale permite conservarea plantelor și a germoplasmei, multiplicare de la an la an.

### Bibliografie selectivă

1. AOAC, Official methods of Analysis (15th Ed) Association of official Analytical chemist 1990 - Washington D. C. pg. 375 – 379;
2. Brewster J.L., 1994 - Onions and Other Vegetable *Allium* CAB International Wallingford, United Kingdom, pg. 236;
3. Jiang H, Timmermann BN and Gang DR, 2006a - Use of liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify diarylheptanoids in tumeric (*Curcuma longa* L.) rhizome. Journal of Chromatography A, PG. 21 – 31;
4. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas – Romeo A., Flerlange N., Burillo J., Codina C., 2002 – Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. J. Agric. Food Chem. 50, pg. 6882 – 6890;
5. **Uzun A.A.**, Butnaru G., 2006 – The abiotic Stress Conditions Fenotipic Effects în *Allium sativum* L., ssp. Sagitatum. Young people and Multidisciplinary Research, Proceedings of the VIII International Symposium, Ministry of Education, Research and Inovation, pg. 45 – 46;
6. **Petcov (Uzun) A.A.**, Botoș A., Corneanu M., Butnaru G., Lăzureanu A., 2008 – Studies on the environmental hazards in drinking water evaluation from Caras – Severin district by *Allium sativum* L. Anales of the University of Craiova, Vol. XXXVIII/A, Ed. Universitaria, pg. 448 – 453;
7. **Petcov (Uzun) A.A.**, Butnaru Gallia, Sărac I., 2009 –Research on proline accumulation in some local populations of garlic (*Allium sativum* L.) under drought, Anales of the University of Craiova, Vol. XXXIX/B, Ed. Universitaria, pg. 373 – 375;
8. **Petcov (Uzun) A.A.**, Boleman A., Butnaru G., Sărac I., 2009 - Determination of the chlorophyll content extracted from leaves of garlic (*Allium sativum* L.), Young people and Multidisciplinary Research, Proceedings of the XI<sup>th</sup> International Symposium, Ministry of Education, Research and Inovation, pg. 105 – 108;
9. Rivlin R.S., 2006 –Is garlic alternative medicine?, Journal of Nutrition, 136, pg. 713– 715;
10. Ramanatha R, Hodgkin T., 2002 - Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Cell Tissue Organ Cult. 68:1-19;
11. Tapsell L.C., Hemphill I., Cobiac L., Patch C.S., Sullivan D.R., Fenech M., Roodenrys S., Keogh J.B., Clifton P.M., Williams P.G., Fazio V.A., Inge K.E., 2006 – Health benefits of herbs and species: the past, the present, the future. Medical Journal Austr. 185, pg. S21 – S24;
12. Zender M.A., E. Emshwiller, B.D. Smith, and D.G. Bradley, 2006 - Documenting domestication: the intersection of genetics and archeology. Trends Genet. 22:138-155.
13. Rivlin R.S. 2001 – Historical perspective on the use of garlic Journal of Nutrition, 131, pg. 951 – 954;