

IDENTIFICAREA VARIABILITĂȚII GENETICE CU AJUTORUL MARKERILOR MOLECULARI RAPD LA CÂTEVA SOIURI DE VIȚĂ DE VIE AUTOHTONE

Ana Coste¹, Anca Livia Butiuc-Keul², M. Șeiculescu³

¹INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE CLUJ-NAPOCA, ²UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI FACULTATEA DE BIOLOGIE CLUJ-NAPOCA, ³STAȚIUNEA DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU VITICULTURĂ ȘI VINIFICAȚIE DRĂGĂȘANI-VÂLCEA

GENETIC VARIABILITY BY MEANS OF RAPD MARKERS IN SOME AUTOCHTHONOUS GRAPEVINE CULTIVARS

Abstract. Grapevine is a perennial crop showing a broad genetic diversity among cultivars, wild species or hybrids. Molecular markers have been used extensively due to the difficulty in distinguishing among similar groups of cultivars, to solve problems in grapevine identification and parental analysis. The objective of the present study was to determine the genetic diversity among several autochthonous grapevine cultivars by means of 6 RAPD markers. RAPD markers showed a specific genetic polymorphism in the populations we studied. Among the 6 markers studied, 3 of them: OPB-07, 4A-27 și 4A-28, showed more polymorphic DNA fragments, and discriminated all of the studied cultivars.

Key words: cultivars, molecular markers, polymorphism, RAPD

Introducere

În prezent, în spațiul românesc au mai rămas aproape 30 de soiuri autohtone, care, prin unicitatea lor, sunt un bun de preț al patrimoniului național. Intrarea României în comunitatea europeană presupune afirmarea clară a valorii soiurilor vechi românești, astfel încât țara noastră să ocupe locul ce i se cuvine în cadrul internațional al schimburilor de valori. În acest context, studiile de identificare, conservare și valorificare în primul rând a soiurilor de viță de vie autohtone sunt absolut necesare și de mare actualitate (Pușcă, 2005). Utilitatea markerilor moleculari RAPD în identificarea soiurilor este larg documentată chiar și în literatura recentă de specialitate (Siles și colab., 2000; Luo și Hep, 2001; Vlastníková și colab., 2004; Aras și colab., 2005; Gökbayrak și colab., 2006).

Lucrarea propune caracterizarea și identificarea polimorfismului genetic la câteva soiuri de viță de vie autentice românești: Crâmpoșie selecționată,

Crâmpoșie veche sau Cârlogancă, Braghină, Gordan, Tămâioasă Românească și Fetească Albă, cu ajutorul markerilor moleculari RAPD. Menționăm faptul ca o parte din soiurile analizate (Crâmpoșie selecționată, Cârloganca, Braghina și Gordanul) sunt soiuri care se găsesc în plantații numai pe teritoriul românesc (Pușcă, 2006). Crâmpoșie selecționată este considerat a fi „unul dintre puținele soiuri dacice, care au supraviețuit peste veacuri” (Martin și colab., 1974), și soiul care „reprezintă strugurele ținut în mână de copilul din medalia Dacia Felix” (Pușcă, 2006).

Material și metode

Au fost luate în studiu câteva soiuri de viță de vie din colecția Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație, Drăgășani-Vâlcea și anume: Crâmpoșie selecționată, Crâmpoșie veche sau Cârlogancă, Braghină, Gordan, Tămâioasă Românească și Fetească Albă.

Pentru caracterizarea moleculară și estimarea variabilității genetice s-a izolat

ADN-ul genomic de la 5 plante diferite din fiecare dintre soiurile luate în studiu. ADN-ul izolat a fost ulterior utilizat pentru amplificarea cu mai multe amorse arbitrare. S-au utilizat mai multe amorse, caracteristicile acestora sunt redate în Tabelul 1.

Amplificarea ADN s-a realizat pe plăci PCR de 96 de godeuri. Mixul de reacție a constat din: 2,5 mM MgCl₂, 1 μM din fiecare amorsă, 200 μM din fiecare dNTP, 1 U de DreamTaq (Fermentas) și 25 ng de ADN genomic, în volum final de 25 μl.

Tabelul 1. Caracteristicile amorselor utilizate în analiza RAPD, numărul de benzi generate și dimensiunile acestora

Numele amorsei și secvența	Nr. de nucleotide	Tm°C	Temperatura de aliniere	Nr. total de benzi amplificate	Nr. perechi de baze (pb)
OPB-04 GGA CTG GAG T	10	27,2	36°C	7	3000, 2300, 2000, 900, 800, 700, 600
OPB-07 GGT GAC GCA G	10	32,9	36°C	10	2500, 1900, 1520, 1480, 1300, 1250, 910, 900, 890, 650
4A-23 TCGCGAGCTG	10	35,9	36°C	8	3000, 2500, 2000, 1200, 1000, 800, 750, 600
4A-26 GTGATCGCAG	10	28,3	36°C	16	3500, 3000, 2500, 2250, 2000, 1800, 1700, 1500, 1250, 1200, 1050, 900, 800, 700, 600, 550
4A-27 CAATCGCCGT	10	32,1	36°C	8	3500, 2500, 1550, 1300, 1200, 1100, 620, 580
4A-28 CAAACGTCGG	10	29,5	36°C	10	3500, 2500, 2000, 1700, 1500, 1300, 1000, 800, 700, 600

Programul de amplificare a cuprins următoarele etape: 95°C 5 min, 94°C 30 sec, 36°C 45 sec, 72°C 1 min 20 sec, se repetă de la pasul 2, 59 cicluri, apoi, 72°C 8 min, se menține la 4°C indefinit.

Materialul vegetal utilizat pentru analiza RAPD a fost reprezentat de frunze recoltate pe silicagel. Extracția ADN-ului genomic total s-a realizat utilizându-se DNeasy Plant Mini Kit de la Qiagen. Materialul vegetal a constat din 40 mg frunze de viță. Soluția stoc de ADN s-a realizat prin adăugarea de 100 μl apă ultra-pură, iar estimarea concentrației s-a făcut pentru 7 μl ADN pe gel de agaroză (1%). Pentru reacția PCR s-au preparat diluții de 5% ADN din soluția stoc.

Pentru separarea electroforetică a ADN-ului genomic izolat din frunze, precum și a produșilor de amplificare s-a utilizat un aparat de electroforeză orizontală. Gelurile de agaroză (2,0 %) s-au preparat în tampon TAE, același tampon utilizându-se și pentru migrare. Migrarea s-a realizat la 120 V, timp de 50 minute, cu un aparat Consort, Belgia. Vizualizarea fragmentelor s-a realizat cu

bromură de etidiu (adăugată în gel în concentrație 0,5–1 μg/ml), în lumină UV.

Rezultate și discuții

Tehnica RAPD a fost utilizată cu succes în discriminarea soiurilor de *Vitis vinifera* L. (Büscher și colab., 1994; Ye și colab., 1998, Vidal și colab., 1999; Regner și colab., 2000). Pe baza analizei RAPD a fost posibilă detectarea polimorfismului genetic la soiurile nobile de viță de vie precum și la portaltoi (Collins și Symons 1993; Jean-Jaques și colab., 1993; Gogorcena și colab., 1993; Tschammer și Zyprian, 1994; Moreno și colab., 1995; Xu și colab., 1996; Stavrakakis și Biniari, 1998; This și colab., 1997).

Interpretarea rezultatelor s-a realizat prin analiza prezenței sau absenței benzilor corespunzătoare amplificării cu fiecare amorsă în parte. Denumirea amorselor, caracteristicile acestora, numărul de benzi generate sunt prezentate în Tabelul 1. Benzile cu dimensiuni sub 500 pb n-au fost luate în calcul. Fiecare din cele 6 amorse utilizate au evidențiat cel puțin 2 benzi polimorfe. Cel mai înalt grad de polimorfism în interiorul soiului a fost

evidențiat de amorsa 4A-26 (Fig.2), care a generat 16 benzi din care 9 polimorfe. S-au obținut de asemenea un număr de alte 45 de benzi reproductibile, reprezentând 80,35 % din totalul de benzi electroforetice generate prin această metodă la toate soiurile. Din cele 6 amorse studiate 3 pot face distincția clară dintre soiuri: OPB-07, 4A-27 și 4A-28 (Fig.1). În cazul soiului Braghină amplificarea cu amorsa 4A-28 n-a avut loc.

Analizând patternul de amplificare în cazul amorsei OPB-04 (Fig.2) se pot observa la aproape toate soiurile 2 benzi puternic reprezentate ca intensitate și constante - una de 3000 pb și una de 600 pb, cu excepția soiului Fetească Albă. Celelalte 5 benzi generate de această amorsă realizează o grupare a soiurilor după cum urmează: Tămâioasă și Crâmpoșie selecționată; Braghină, Gordan și Cârlogancă. În cazul soiului Fetească Albă, acesta se izolează clar de celelalte soiuri, ca de altfel în toate cazurile analizate.

În cazul amorsei OPB-07 (Fig.1) au fost generate în urma reacției de amplificare 10 benzi. Niciuna din aceste benzi nu se regăsește la toate soiurile, această amorsă prezentând un înalt grad de polimorfism între soiuri și contribuind astfel la diferențierea clară a acestora.

Amorsa 4A-23 a generat 2 benzi stabile la 2000 pb și respectiv 1500 pb. La

soiul Braghină banda de 2000 pb este foarte slab reprezentată. Soiul Fetească Albă este singurul care prezintă banda de 2500 pb. Restul benzilor generate de această amorsă sunt mai mult sau mai puțin polimorfe.

Ceea ce se poate observa în toate cazurile este faptul ca soiul Fetească Albă se separă clar de restul soiurilor făcând parte probabil dintr-un alt sortogrup. Soiurile Crâmpoșie selecționată, Cârlogancă sau Crâmpoșia veche, Braghină și Gordan se grupează separat. Aceste soiuri sunt foarte vechi și sunt cultivate de mii de ani împreună și n-au părăsit niciodată granițele acestei țări. De altfel, soiul Gordan este principalul polenizator în cazul soiurilor mai sus menționate-care sunt autosterile. Soiul Crâmpoșie selecționată este un soi autofertil cu flori hermafrodite și a fost obținut în 1972 de către un grup de cercetători de la Stațiunea De Cercetări Viti-Vinicole Drăgășani. Soiul Tămâioasă Românească pare să se încadreze în același sortogrup deși unii autori susțin că acest soi este de origine elenă. Soiurile Tamâiosă Românească și Fetească Albă sunt soiuri cultivate și în afara granițelor țării, originea lor fiind controversată (Pușcă, 2006).

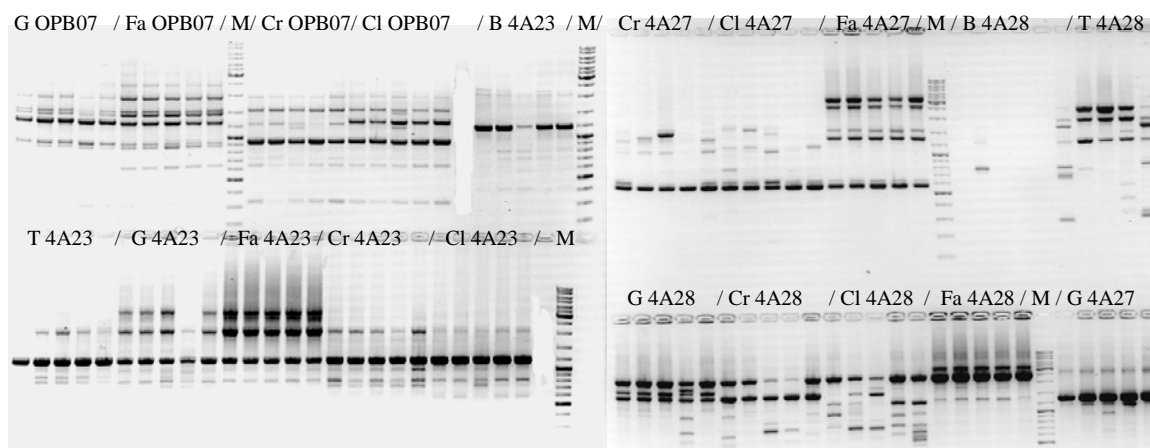


Fig. 1. Patternul de amplificare a ADN la soiurile Braghină-B, Tămâioasă Românească-T, Gordan-G, Fetească Albă-FA, Crâmpoșie selecționată-Cr, Cârlogancă-Cl, cu amorsele OPB-04, OPB-07, 4A23, 4A27 și 4A28 (M-marker de greutate moleculară).

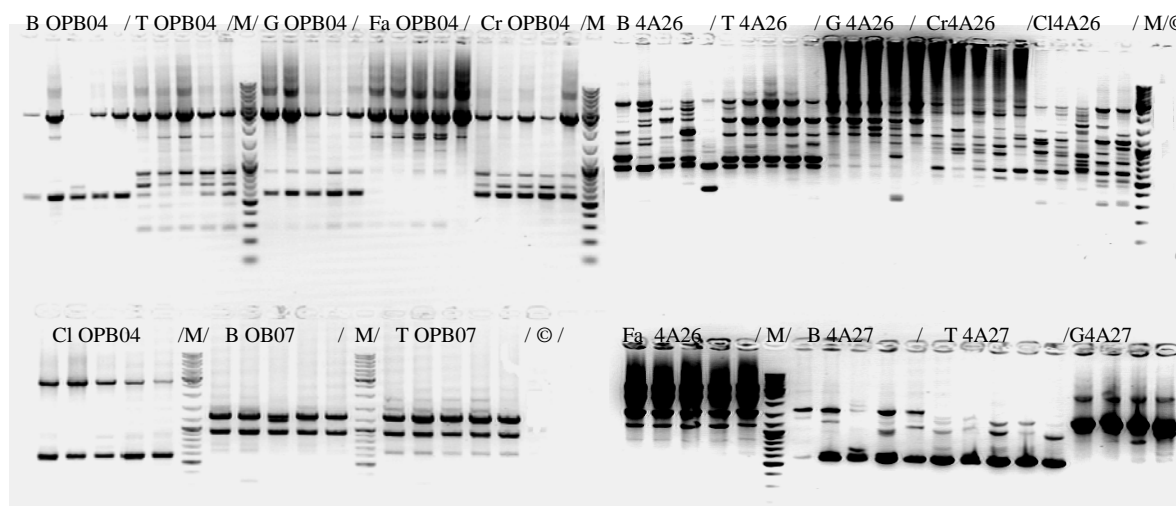


Fig. 2. Patternul de amplificare a ADN la soiurile Braghină-B, Tămâioasă Românească-T, Gordan-G, Fetească Albă-Fa, Crâmpoșie selecționată-Cr, Cârlogancă-CI, cu amorsele OPB-04, OPB-07, 4A26 și 4A27 (M-marker de greutate moleculară).

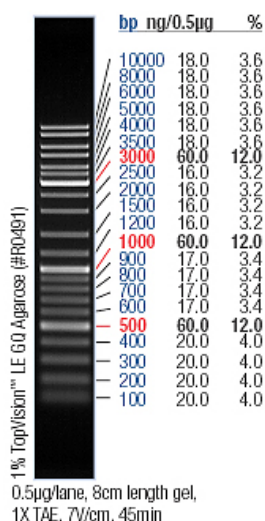


Fig. 3. Marker de greutate moleculară cunoscută, având 3 benzi de referință: 3000pb, 1000pb, 500pb.

Concluzii

S-a încercat și s-a reușit identificarea unor patternuri de amplificare specifice unora din soiurile studiate, care pot face distincția clară între soiuri. Amorsele cu cea mai mare capacitate de discriminare între soiuri au fost: OPB-07, 4A-27 și 4A-28.

S-a reușit evidențierea polimorfismului genetic din populațiile soiurilor studiate. Cea mai mare variabilitate în cadrul soiurilor a fost evidențiată de amorsa 4A-26.

Soiurile românești cultivate doar între granițele țării noastre: Crâmpoșie

selecționată, Braghină, Gordan și Cârlogancă, se grupează separat. Soiul Tămâioasă Românească pare să se încadreze în același sortogrup.

Soiul Fetească Albă se distinge clar dintre celelalte soiuri aparținând probabil unui alt sortogrup.

Bibliografie

Aras, S., Polat, J.B., Cansaran, D., Söylemezoglu, G.: RAPD analysis of genetic relations between Büzgülü grape cultivars (*Vitis vinifera*) grown in different parts of Turkey. Act. Biol. Cracov. Ser. Bot., **47**, 2, 77–82, 2005.

- Buscher, N., Zyprian, E., Bachmann, O., Blachh, R.: On the origin of the grapevine cultivar Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis* **33**, 15–17, 1994.
- Collins, G.G. Symons, R.H.: Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **11**, 105-112, 1993.
- Gökbayrak, Z., Özer, C., Söylemezolu, G.: Preliminary Results on Genome Mapping of an Italia x Mercau Grapevine Population. *Turk J. Agric. For.*, **30**, 273-280, 2006.
- Jean-Jacques, I., Defontaine, A., Hallet, J.N.: Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, **32**, 189-190, 1993.
- Luo, S, Hep, P: Discrimination of wild grapes native to China by RAPD markers. *Vitis*, **40**, 3,163-168, 2001.
- Martin, T., Oşlobeanu, M., Gorodea, Gr., Martin, D., Bălţatu, I.: Strugurii de masă. Ed. Ceres, Bucureşti, 1974, citat de Puşcă I.M.: Vechi soiuri româneşti de viţă de vie. Ed. "Tipografia INTACT", 87-91, 2006.
- Moreno, S., Gogorcena, Y., Ortiz, J.M: The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hort.*, **62**, 237-243, 1995.
- Puşcă, I.M.: Crâmpoşie selecţionată la Bruxelles. Articol publicat în Jurnalul Naţional, 2005.
- Puşcă, I.M.: Vechi soiuri româneşti de viţă de vie. Ed. "Tipografia INTACT", 87-91, 2006.
- Regner, F., Wiedeck, E., Stadlbauer, A.: Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. *Vitis*, **39**, 103–107, 2000.
- Siles, B. A., O'Neil, K.A., Fox, M. A., Anderson, D. E., Kuntz, A.F., Ranganath, S. C., Morris, A.C.: Genetic Fingerprinting of Grape Plant (*Vitis vinifera*) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis and Dynamic Size-Sieving Capillary Electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, **48**,12, 5903 -5912, 2000.
- Stavrakakis, M.N., Biniari, K.: Genetic study of grape cultivars belonging to the Muscat family by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, **37**, 119-122, 1998.
- This, P., Cuisset, C., Boursiquot, J.M.: Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships, *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 492-501, 1997.
- Tschammer, J., Zyprian, E.: Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis*, **33**, 249-250, 1994.
- Vidal, J.R, Moreno, S., Gogorcena, Y., Masa, A., Ortiz, J.M: On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 69–75, 1999.
- Vlastníková, H., Moravcová, K., Pidra, M.: The RAPD analysis of several cultivars of grapevine (*Vitis vinifera* L.) and their clones. *Hort. Sci.*, **31**, 4, 136–139, 2004.
- Xu, H., Bakalinsky, A.T.: Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *Hort. Sci.*, **32**, 267-268, 1996.
- Ye, G.N., Soylemezoglu, G., Weeden, N.F., Lamboy, W.F., Pool, R.M., Reisch, B.I.: Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis*, **37**, 33-38, 1998.