

**ANALIZA RAPD UTILIZATĂ ÎN DETERMINAREA POLIMORFISMULUI
LA NIVEL MOLECULAR A CULTIVARURILOR DE VIȚĂ
DE VIE DE LA S.D.E. IAȘI**

**RAPD ANALYSIS USED FOR POLYMORPHISM DETERMINATION AT
MOLECULAR LEVEL OF GRAPEVINE CULTIVARS AT S.D.E. IAȘI**

**POP RODICA, ARDELEAN M., GABOREANU IOANA MARINA,
RAICA P., PAMFIL DORU, CORDEA MIRELA**
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca

Abstract. *In the current study we analysed the molecular polymorphism in ten cultivars of *Vitis vinifera* from the University of Agricultural Studies and Veterinary Medicine - SDE Iași. The samples were analysed using RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA). DNA isolation was performed from leaves using the protocol published by Lodhi et al. (1994) and modified by Pop Rodica et al. (2003). For the amplification of the DNA samples 39 decamer primers were tested. The amplification products were separated in agarose gel at 55 V (3.5 V/cm) for 2.5 h and then stained with ethidium bromide. Bands were visualized in UV light with AlphaImager 2200 system. Of 39 primers tested only 22 generated polymorphic bands. The size range was between 200 and 2000 bp, with the majority between 300 and 1200 bp.*

Genetic distances between cultivars were calculated based on Jaccard coefficient, and the dendrogram was constructed with RAPDistance 1.04 soft. The origin of the cultivars analysed was confirmed by the dendrogram obtained based on RAPD polymorphism.

Cercetările privind diversitatea genetică la *Vitis vinifera* sunt importante nu doar în studiile privind originea diferitelor soiuri dar și în acelea privind ameliorarea și conservarea fondului de germoplasmă la această specie.

Metodele clasice de identificare, bazate pe caracteristicile botanice și ampelografice nu sunt întotdeauna cele mai precise, datorită instabilității caracteristicilor morfologice sub influența condițiilor mediului intern și extern.

În ameliorare, identificarea soiurilor în primele stadii de dezvoltare este extrem de dificilă, elementele caracteristice apărând în mod treptat în anii următori. La prima apariție unele organe, cum ar fi cărceii și inflorescențele sunt slab dezvoltate devenind, apoi, tot mai tipice pe măsura trecerii anilor (Ardelean M., 1986). De asemenea, în cazul portaltoilor metodele ampelografice de identificare nu pot fi folosite decât în plantațiile de portaltoi, nu și după altoire.

În ultimii ani, odată cu apariția markerilor moleculari, identificarea cultivarelor s-a realizat la nivel de proteine cu ajutorul izoenzimelor și la nivel de ADN prin metode RAPD, RFLP, AFLP și SSR.

Identificarea cultivarelor cu ajutorul polimorfismului la nivel de ADN este extrem de utilă, datorită faptului că rezultatul obținut reflectă direct genotipul și nu este influențat de condițiile de mediu. De asemenea, sunt disponibile un număr

foarte mare de secvențe ADN, care pot releva polimorfism, iar ADN-ul poate fi izolat din aproape orice țesut.

Datorită simplității metodei RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA, (Williams și colab., 1990), a faptului că necesită cantități extrem de mici de ADN și a capacității ei de a releva un grad înalt de polimorfism, ea a fost aplicată cu succes la diferite specii de plante, inclusiv la *Vitis vinifera* (Wolf și colab., 2001; Ryan și colab., 2001; Tessier și colab., 1999, Fanizza și colab., 1999; Bohm și Zyprian, 1998; Pamfil, 1999).

În acest studiu s-a urmărit realizarea unei dendrograme pe baza metodei RAPD, care să releve distanța genetică între zece cultivare de viță de vie.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cultivarele analizate, provenite de la SDE Iași, sunt: Fetească albă (FA), Fetească regală (FR), Riesling Italian (RI), Traminer (TR), Cabernet Sauvignon (CA), Muscat Ottonel (MO), Merlot (ME), Cetățuia (CE), Napoca (NA) și Timpuriu de Cluj (TCj). Materialul biologic destinat izolării ADN a fost reprezentat de frunze tinere recoltate la începutul verii.

Izolarea și amplificarea ADN

Izolarea ADN-ului s-a realizat din 500 mg țesut foliar mojarat în azot lichid. Metoda de izolare ADN reprezintă o variantă îmbunătățită a protocolului lui Lodhi și colab., 1994 (R. Pop și colab., 2003).

Amestecul de reacție PCR a avut un volum de 25 μ l cu următoarea compoziție:

- 50 ng ADN
- 200 μ M din fiecare dNTP (Promega)
- 0,2 μ M primer (UBC)
- 2,5 mM $MgCl_2$
- 2,5 mM 10 x buffer
- 1 U Taq DNA Polymerase (Promega)
- 2% PVP (Sigma)
- apă bidistilată sterilă

Amplificarea s-a realizat în aparatul Eppendorf Mastercycler Gradient programat astfel:

- 3 min. la 95°C - predenaturare urmată de 45 de cicluri cu următorul profil de temperatură:
- 1 min. la 93°C (denaturare)
- 1 min. 34°C (fixarea primerilor)
- 1 min. 72°C (extensia), urmate de:
- extensia finală 10 minute la 72°C.

Pentru amplificare s-au utilizat 39 primeri decameri produși de University of British Columbia, Pharmacia Biotech și Microsynth (tab. 1).

Electroforeza în gel de agaroză, preluarea imaginilor și interpretarea statistică a datelor

Prođușii de amplificare, au fost separați prin electroforeză în gel de agaroză (Sigma) 1,4% și 0,5 $\times$ TBE, alături de un marker ADN standard (100 pb DNA Step Ladder, Promega). După separare gelul a fost imersat într-o soluție de bromură de etidiu 0,5 μ g/ml și menținut pe o platformă agitatoare timp de 25 de minute. Vizualizarea produșilor de amplificare s-a realizat în lumină UV, imaginea gelului fiind

achiziționată cu sistemul Alpha Innotech. Prelucrarea imaginii s-a realizat cu programul Alfa Imager 2200.

Tabelul 1

Primerii utilizați în amplificarea ADN

Nr.	Primerul	Secvența (5' – 3')	Nr.	Primerul	Secvența (5' – 3')
1	228	GCT GGG CCG A	21	6 PB	CCC GTC AGC A
2	241	GCC CGA CGC G	22	OPAB 11	GTG CGC AAT G
3	245	CGC GTG CCA G	23	OPAB 18	CTG GCG TGT C
4	285	GGG CGC CTA G	24	OPE 14	TGC GGC TGA G
5	286	CGG AGC CGG C	25	AB 11	GTG CGC AAT G
6	421	ACG GCC CAC C	26	OPA 04	AAT CGG GCT G
7	436	GAG GGG GCC A	27	OPA 03	AGT CAG CCA C
8	537	CGA AAG GAC T	28	OPAL 20	AGG AGT CGG A
9	538	TGA TCT CTC C	29	OPX 03	TGG CGC AGT C
10	563	CGC CGC TCC T	30	OPA 01	CAG GCC CTT C
11	564	CGG CGT TAC G	31	GY 169	CTA AGC TGC TTT TGT TTG AGC
12	570	GGC CGC TAA T	32	OPC-14	TGC GTG CTT G
13	571	GCG CGG CAC T	33	OPC 15	GAC GGA TCA G
14	584	GCG GGC AGG A	34	OPA 11	CAA TCG CCG T
15	599	CAA GAA CCG C	35	OPA 17	GAC CGC TTG T
16	1 PB	GGT GCG GGA A	36	70.08	CTG TAC CCC C
17	2 PB	GTT TCG CTC C	37	OPA 20	GTT GCG ATC C
18	3 PB	GTA GAC CCG T	38	70.03	ACG GTG CCT G
19	4 PB	AAG AGC CCG T	39	MIC – 07	TGT CTG GGT G
20	5 PB	AAC GCG CAA C			

Pentru calcularea distanțelor genetice și realizarea dendrogramei s-a utilizat programul RAPDistance 1.04, utilizând coeficientul Jaccard pentru distanțele genetice, respectiv metoda Neighbor Joining Tree pentru dendrogramă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din cei 39 primeri testați, doar 22 (BC 228, BC 245, BC 563, BC 584, BC 599, PB1, PB3, PB4, PB5, PB6, OPAB 11, OPAB 18, OPE 14, AB 11, OPA 04, OPA 03, OPX 03, OPA 01, OPAL 20, 70.08, 70.03, MIC 07) au relevat polimorfism între cultivare.

Notarea benzilor s-a realizat direct pe fotografiile gelurilor, prin raportarea la markerul ADN. 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. Numărul total de benzi generate a fost de 192, dintre care 165 de benzi au fost polimorfice. Numărul cel mai mare de benzi polimorfice au fost obținute cu primerul 6 PB, respectiv 15 benzi, urmat de primerul 5 PB (13 benzi polimorfice) (fig. 1).

Notarea benzilor s-a realizat direct pe fotografiile gelurilor, prin raportarea la markerul ADN, prezența și absența benzilor fiind înscrise într-un tabel sub formă binară. Aceste date primare au fost introduse în programul RAPDistance 1.04 care a calculat distanțele genetice pe baza coeficientului Jaccard.

Distanțele genetice sunt prezentate în tabelul 2.

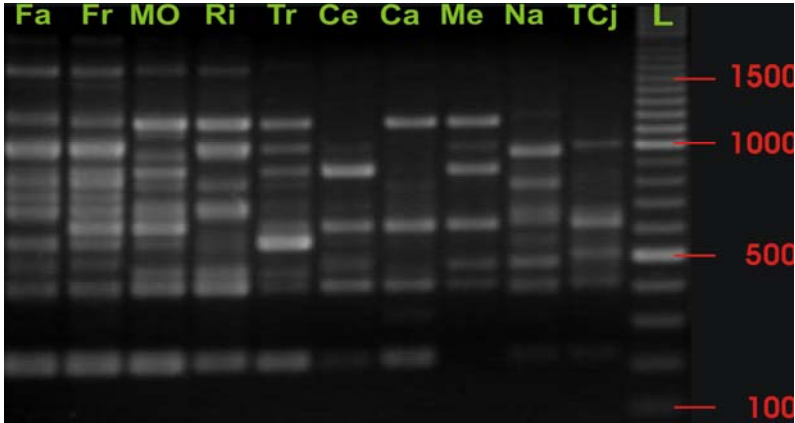


Fig. 1 - Producții de amplificare obținute cu primeru 5 PB la cele zece soiuri de viță de vie

Tabelul 2

Distanțele genetice calculate pentru cele zece soiuri de viță de vie

	Fa	Fr	M	R	Tr	Ce	Ca	Me	Na	TCj
Fa	0,0000									
Fr	0,4421	0,0000								
M	0,6783	0,6667	0,0000							
R	0,5158	0,5248	0,6216	0,0000						
Tr	0,6364	0,6250	0,6132	0,6263	0,0000					
Ce	0,7217	0,7184	0,7048	0,7113	0,6629	0,0000				
Ca	0,6900	0,6887	0,6881	0,6531	0,6000	0,7222	0,0000			
Me	0,7113	0,7087	0,7431	0,7525	0,5882	0,7326	0,6024	0,0000		
Na	0,7059	0,7037	0,6909	0,6566	0,6771	0,7111	0,6774	0,7283	0,0000	
TCj	0,7158	0,6458	0,6990	0,6484	0,6395	0,6053	0,7303	0,6951	0,7609	0,00

Apropierea genetică între cele zece soiuri de viță de vie analizate, stabilită pe baza matricei distanțelor genetice și a algoritmului Neighbor Joining Tree, sunt reprezentate în figura 2 sub forma unei dendrograme.

În cadrul dendrogramei se evidențiază două grupuri principale A și B. Primul grup cuprinde soiurile Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Cetățuia, Timpuriu de Cluj și Muscat Ottonel, iar cel de al doilea grup soiurile Merlot, Cabernet, Traminer rose și Napoca.

Grupul A este constituit la rândul lui din alte două subgrupuri, notate cu A1 și A2. Subgrupul A1 cuprinde soiurile Fetească albă, Fetească regală, Riesling italian, Cetățuia și Timpuriu de Cluj. Soiurile Fetească albă și Fetească regală sunt în aceeași ramură, distanța genetică dintre ele fiind de 0,4421. Din punct de vedere ampelografic cele două soiuri sunt considerate apropiate, datorită particularităților morfologice. De asemenea, în literatura de specialitate se arată că soiul Fetească regală ar fi un hibrid natural între Fetească albă și Grasă de Cotnari, ceea ce denotă apropierea genetică dintre cele două soiuri. Apropierea genetică dintre cele două soiuri rezultată prin analiza RAPD confirmă deci rezultatele anterioare conform cărora au o origine comună.

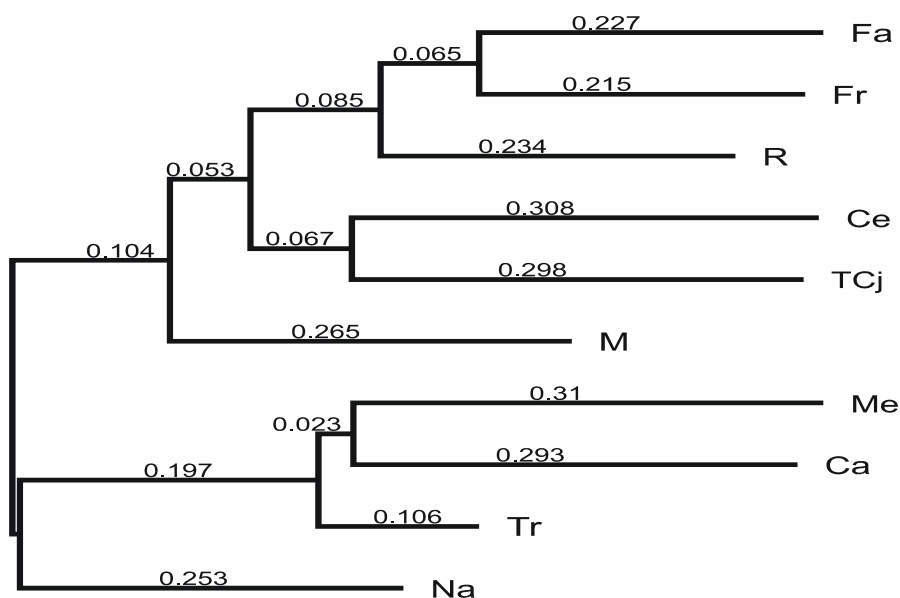


Fig. 2 - Dendrograma obținută la cele zece soiuri de viță de vie

Soiurile Cetățuia și Timpuriu de Cluj, au un părinte comun, în dendrogramă fiind situate în același subgrup. Și în acest caz, analiza RAPD a confirmat originea comună a acestor soiuri.

Grupul B este împărțit și el în două subgrupuri, respectiv B1 și B2. Grupul B1 cuprinde soiurile Merlot și Cabernet. În literatura de specialitate se precizează că cele două soiuri sunt apropiate genetic (Bellin D. și colab., 2001), acest rezultat fiind confirmat și în experiențele noastre.

Tot în acest subgrup apare și soiul Traminer rose. Deși este un soi de struguri pentru vinuri albe, se pare că este mult mai apropiat genetic de soiurile roșii. O explicație ar consta în faptul că acest soi, din punct de vedere al clasificării pe grupe ecologo-geografice face parte din *proles occidentalis*, la fel ca și soiul Cabernet Sauvignon. De asemenea, bobul are o culoare roz-cenușie.

În subgrupul B2 este prezent un singur soi și anume Napoca, ceea ce sugerează un grad mai îndepărtat de înrudire cu celelalte soiuri analizate.

Din analiza matricei distanțelor genetice se poate observa că cele mai apropiate cultivare din punct de vedere genetic sunt Fetească albă și Fetească regală, distanța genetică dintre acestea fiind de 0,4421.

Distanța genetică cea mai mare s-a constatat între soiul Napoca și Timpuriu de Cluj, aceasta fiind de 0,7609. Această depărtare genetică sugerează existența unui grad îndepărtat de înrudire, la originea formării acestor soiuri existând părinți total diferiți.

CONCLUZII

Analizele RAPD s-au dovedit un instrument valoros de determinare a polimorfismului genetic intraspecific la *Vitis vinifera*.

Soiurile analizate se diferențiază la nivel molecular, respectând în linii generale gruparea acestora pe baza caracteristicilor morfofiziologice (precocitatea, culoarea boabelor).

Distanțele genetice cele mai mari au fost înregistrate între soiuri total neînrudite, în timp ce distanțele genetice mici trădează întotdeauna o înrudire mai mult sau mai puțin apropiată a soiurilor respective.

BIBLIOGRAFIE

1. Ardelan M., 1986 - *Ameliorarea plantelor horticole*. Tipo Agronomia, Cluj-Napoca
2. Bohm A., Zyprian E., 1998 - *RAPD marker in grapevine (Vitis spp.) similar to plant retrotransposons*. Plant Cell Reports.
3. Fanizza G., Colonna G., Resta P., Ferrara G., 1999 - *The effect of the number of RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in Vitis vinifera*. Euphytica 107: 45-50.
4. Pamfil D.C., 1999 - *The use of RAPD markers for the identification of somaclonal variation of the micro propagated grapevine*. Proc Symp. Present and Prospects in Horticulture 247-254
5. Pop R., M. Ardelean, Pamfil D., Gaboreanu Ioana Marina, 2003 - *The Efficiency of Different DNA Isolation and Purification in Ten Cultivars of Vitis vinifera*. Bul. Nr. 59 USAMV, seria ZB, 259-261.
6. Ryan F.J., Ledbetter C.A., Ramming D.W., Palmquist D.E., Bell D.E., Peterson S.J., 2001 - *Challenges in developing molecular markers for almond (Prunus amygdalus) and Grape (Vitis species)*. Proc. Int. Symp. on Molecular Markers, Eds. Dore, Dosba & Baril, Acta Hort. 546, ISHS.
7. Tessier C., David J., This P., 1999 - *Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in Vitis vinifera L.*, Theor Appl Genet 98:171-177.
8. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Raflaski J.A., Tingey S.V., 1990 - *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acids Res 18:6531-6535.