

THE RNA ISOLATION FROM GENETIC RESOURCES OF COLOURED GRAIN WHEAT

Musilová M., Trojan V., Vyhnánek T., Havel L.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: milena.musilova@mendelu.cz

ABSTRACT

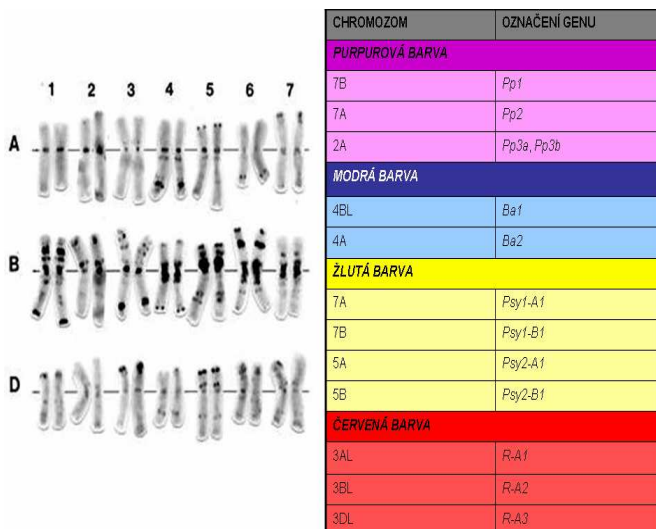
There are several genotypes of wheat with different, genetically determined, grain colour: purple, blue yellow and white. These coloured grain wheat was obtained through wide hybridization among common wheat (*Triticum* L., $2n=42$) and other related genotypes, such as *Agropyron elongatum*, purple-grained tetraploid wheats from Ethiopia etc. The grown common wheat has red coloured grain. The different coloured grains can be used in food industry for a production of new products which could be not only attractive for consumers but they would be also good for their health. The purple and blue forms content different anthocyanins, compounds well known as antioxidants. Our objective based on flavonoid biochemical pathway was to find genes responsible for different grain coloration in a group of 5 genotypes. The first procedure of the analyses was the RNA isolation, a very important step to manage the whole experiment. The isolation of intact, functional total RNA from coloured-grained wheat containing high levels of starches, polysaccharides, and flavonoids was extremely difficult, that is why were used 3 commercial isolation kits (NucleoSpin RNA Plant - Macherey-Nagel, RNeasy Plant Mini Kit - Qiagen, UltraClean Plant RNA Isolation Sample Kit - MO BIO). There is very important to obtain enough RNA of good quality by the isolation, because there is requested at least $125 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of RNA for RT PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). The range of isolated RNA number is optimal from $125\text{-}150 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. According to the results from 3 different isolations 1 kit was chosen. The amount of RNA isolated by the kit UltraClean Plant RNA Isolation Sample Kit (MO BIO) was $530.3 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of purity 2.1.

Key words: wheat, coloured grain, RNA isolation

Acknowledgments: This study was supported by project IGA FA MENDELU No. TP 1/2010.

ÚVOD

Předmětem práce je na základě biosyntetické dráhy flavonoidů vyhledat geny zodpovědné za zbarvení obilek a provést jejich sekvenční porovnání v souboru 5 genotypů pšenice s diferencovaným zbarvením obilek. Pěstované odrůdy pšenice seté (*Triticum aestivum*) mají červené zbarvení obilky. Existují však i odrůdy nebo genotypy, které mají zbarvení obilky odlišné – purpurové, modré, žluté a bílé. Z biochemického hlediska jde o to, že z flavononů vznikají mimo jiné flavan-4-oly a dihydroflavonoly, z nichž poté vznikají leukoanthokyany. Z těchto se pak leukoanthokyanidin reduktázou odvozují flavan-3-oly, které mají žlutou a bílou barvu a na druhé straně enzym leukoanthokyanidin dioxygenáza katalyzuje tvorbu 3-hydroxy anthokyanů, z nichž za účasti 3 enzymů (O-metyl transferáza, flavonoid glukosyl transferáza, rhamnosyl transferáza) vznikají další typy anthokyanů (modré, purpurové aj.) Tato zbarvení jsou podmíněna přítomností příslušných genů. V případě purpurových a modrých obilek se jedná o antokyany. U žlutých obilek je to zvýšený obsah karotenoidů. U bílých obilek jde o redukcí exprese genů, které podmiňují tvorbu enzymů katalyzujících vznik flavonoidů (Himi a Noda, 2005). Nejběžnější, červené, zbarvení je způsobeno deriváty katechinu a taninu. Tyto látky nejen podmiňují zbarvení obilek, ale některé jejich vlastnosti, např. antioxidační účinky, mohou výrazně ovlivňovat dietetickou hodnotu výsledných potravinářských produktů. K expresi těchto genů nedochází v celé obilce. Tvorba jednotlivých barviv je pak omezena na jednotlivé části obilky. Purpurová barviva jsou obsažena v perikarpu a testě obilky, modrá jsou v aleuronové vrstvě a žlutá v endospermu. Geny zodpovědná za tzv. netradiční zbarvení obilek byly lokalizovány na různých chromozomech genomu pšenice (obr. 1) (Trojan et al., 2010).



CHROMOZOM	OZNAČENÍ GENU
PURPUROVÁ BARVA	
7B	<i>Pp1</i>
7A	<i>Pp2</i>
2A	<i>Pp3a, Pp3b</i>
MODRÁ BARVA	
4BL	<i>Ba1</i>
4A	<i>Ba2</i>
ŽLUTÁ BARVA	
7A	<i>Psy1-A1</i>
7B	<i>Psy1-B1</i>
5A	<i>Psy2-A1</i>
5B	<i>Psy2-B1</i>
ČERVENÁ BARVA	
3AL	<i>R-A1</i>
3BL	<i>R-A2</i>
3DL	<i>R-A3</i>

Obr. 1 Chromozomy hexaploidní pšenice, geny odpovědné za zbarvení obilek a jejich umístění

RNA, kterou izolujeme z obilek, je nutno reverzní transkripční přepsat do cDNA, tuto pak amplifikovat pomocí degenerovaných primerů. Získané amplikony se po přečištění naklonují do vektoru a budou podrobeny následné sekvenaci. Získané sekvence budou porovnány se sekvencemi genů databáze NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Získané sekvence budou využity i pro návrh specifických primerů umožňující studium exprese v průběhu zrání obilky.

Kvalita izolovaného materiálu často rozhoduje o úspěšnosti navazujících postupů. Cílem extrakčních a purifikačních procesů je získat nukleovou kyselinu v nativním stavu v dostatečném množství a čistotě. Metody izolace nukleových kyselin využívají rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na pevný podklad nebo ultracentrifugace v gradientních roztocích. Výběr metody purifikace DNA nebo RNA závisí na způsobu její následné analýzy (Šmarda et al., 2005).

MATERIÁL A METODIKA

Soubor genotypů s rozdílným zbarvením obilek byl poskytnut ze ZVÚ Kroměříž, s.r.o. Jedná se o 5 vzorků ('ANK-28B', 'Abyssinskaja Arreseita', 'UC 66049', 'Tschermaxs Blauörniger Sommerweizen' a 'Heroldo'). Jelikož se příslušné geny různého zbarvení obilek exprimují v době jejich dozrávání (mléčná zralost, cca 20 dní *post anthesis*), nebylo možno RNA izolovat z listů či kořínků. Odběry z polních podmínek v ZVÚ Kroměříž proběhly v termínech 2., 15. a 19. 7.2010. Po exstirpaci obilek byly vzorky uskladněny v hlubokomrazicím boxu při -70°C. Izolace RNA se provedly pomocí 3 komerčních kitů (NucleoSpin RNA Plant f. Macherey-Nagel, RNeasy Plant Mini Kit f. Qiagen, UltraClean Plant RNA Isolation Sample Kit f. MO BIO). Izolace celkové rostlinné RNA se skládá z několika kroků. Nejdříve je potřeba rostlinný materiál homogenizovat. Byly zvoleny 2 způsoby, drcení vzorků celých obilek o hmotnosti do 100 mg zmrazených tekutým dusíkem jednorázovými drátky přímo v Eppendorf zkumavkách nebo tloučkem v třecí misce prostředkem RNase Zap. Po homogenizaci následuje po přidání pufrů buněčná lyze a filtrace tohoto lyzátu. Po úpravě podmínek etanolem dojde k navázání RNA na silikagelovou membránu kolonky. Tato membrána se MDB (Membráně Desalting Buffer) pufrům odsolí, aby mohla následně proběhnout enzymatická reakce DNázou. Při tomto kroku se degraduje DNA, tudíž na membráně zůstává už jen RNA, kterou pomocí promývacích pufrů vyvážeme z membrány a v posledním kroku tuto RNA vymyjeme vody, která neobsahuje RNázu.. Takto vyzizolovanou RNA dále uchováváme krátkodobě při -20°C, dlouhodobě při -80°C. Dalším postupem je reverzní transkripce vyzizolované RNA do cDNA. Pro účely této reakce byl vybrán taktéž komerční kit (Enhanced Avian HS RT-PCR-100 Kit f. Sigma-Aldrich). Výrobce tohoto kitu deklaruje optimální množství RNA pro přepis 125 ng.µl⁻¹. Kontrola přítomnosti, výtěžnost a kvalita získané RNA byla měřena na spektrofometrických přístrojích Picodrop a Nanodrop 2000.

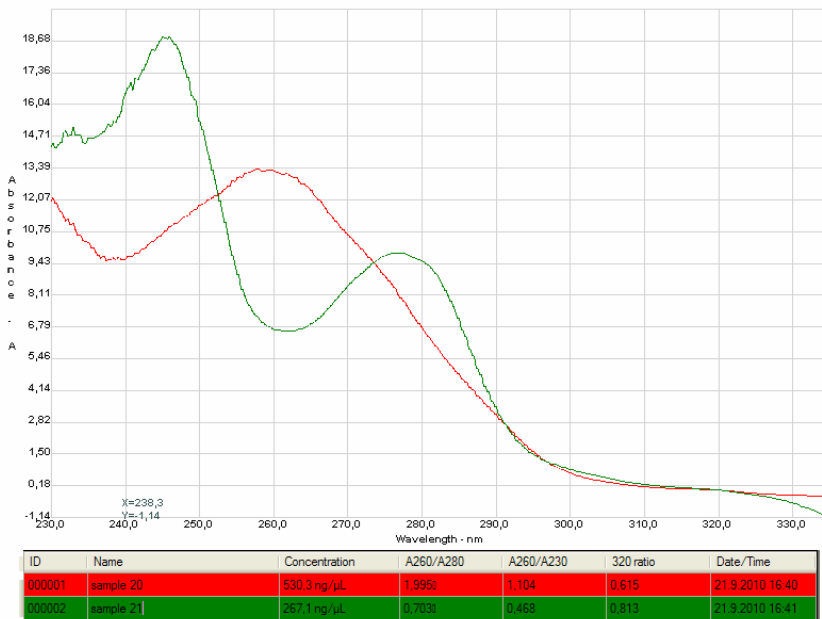
VÝSLEDKY A DISKUZE

Při studiu regulace vzniku flavonoidů a jejich lokalizace v určitých částech rostlin, byly izolovány a popsány klony genomové cDNA, kódující většinu genů podléhajících se na biosyntéze flavonoidů. Studie časové a prostorové exprese některých z těchto genů přinesly velmi cenné informace o jejich důležitosti při regulaci biosyntézy flavonoidů, ve vztahu ke specifické akumulaci těchto flavonoidů v určitých pletivech a orgánech v průběhu vývoje rostliny a k adaptaci rostliny k rozmanitým vnějším stresům. Analýzy prokázaly úzký vztah mezi aktivitou enzymů a akumulací flavonoidů

(Koorneef 1990; Shirley et al. 1995). Při mapování těchto genů je potřeba získat z materiálů dostatečné množství RNA o odpovídající čistotě.

Jak uvádí Gao et al. (2001) je izolace RNA tradičními metodami z materiálů s vysokým procentem škrobu velice obtížná. Z důvodů nedostatečné čistoty a nízké výtěžnosti (max. $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pomocí kitů f. Macherey-Nagel a f. Qiagen) byl k izolaci použit ještě kit f. MO BIO.

Ribonucleic Acid



Graf. 1 Koncentrace RNA ve vzorcích modrých (20) a purpurových (21) obílek po izolaci kitem fi. MO BIO, měřena na přístroji Picodrop

Dosažená výtěžnost při izolaci tímto kitem byla $267,1$ a $530,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (graf 1), tudíž dostatečná pro přepis do cDNA, která je v našem případě $125 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Gao et al. (2001) použitím metody izolace SDS/fenol dosáhl stabilní výtěžnosti z navážky 1 g v rozmezí od $350 - 400 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. V našem případě jsou výsledky o to uspokojivější, že nebylo potřeba tolik rostlinného materiálu, přičemž výtěžnost je velice dobrá. Škrob, ale také jiné polysacharidy a flavonoidy se mohou vázat nebo srážet s RNA, což činí izolaci RNA z pletiv obílek pšenice obzvláště obtížnou (Salzman et al., 1999). Při použití tohoto kitu byl také nejvíce eliminován problém s mazováním škrobu ve fázi buněčné lyze. Čistota RNA, tedy poměr absorbance při λ 260 nm (A260) a 280 nm (A280) odpovídal u vzorku modrého genotypu hodnotě 2,1. Výrobce kitu f. MOBIO pro přepis z RNA do cDNA deklaruje hodnoty mezi 1,9 až 2,1 jako optimální čistotu RNA. Vzorek č. 21 s purpurovou barvou obílek byl v průběhu izolace zkontaminován neznámou látkou o λ 240 nm, jak je patrné ze

zelené křivky grafu 1. Poměr absorbancí A260/ A280 ukazuje hodnotu 0,70; čili nedostatečně čistou RNA.

ZÁVĚR

Detailní znalosti o umístění a složení genů podmiňujících tvorbu anthokyanů a karotenoidů v obilkách pšenice jsou nezbytné pro cílené šlechtění této důležité obilniny. Poznatky o expresi genů zodpovědných za biochemické dráhy, které podmiňují tvorbu jednotlivých barviv v obilce, a lokalizaci této exprese, umožní regulovat produkci těchto metabolitů, a tak bude možné vhodnou volbou suroviny (celé nebo části obilky) ovlivňovat dietetickou hodnotu vyráběných potravinářských produktů.

Na základě zkušeností a výsledků získaných při izolaci RNA z odlišně zbarvených obilek pšenice se osvědčila homogenizace vzorků na třecí misce tloučkem. K izolaci RNA z rostlinných materiálů s vysokým obsahem škrobů doporučuji komerční izolační kit UltraClean Plant RNA Isolation Sample Kit f. MO BIO, neboť výtěžnost RNA a její čistota jsou dostatečné k přepisu RNA do cDNA pomocí RT PCR.

LITERATURA

- Gao JI., Liu JI., Li B., Li Z. (2001): Isolation and Purification of Functional Total RNA from Blue-grained Wheat Endosperm Tissues Containing High Levels of Starches and Flavonoids. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 185a – 185i.
- Himi E., Noda K. (2005): Red braun colour gene (R) of wheat is a Myb-type transcription factor, - *Euphytica*, 143: 239-242.
- Koorneef M. (1990): Mutation affecting the testa color in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Inf Serv*, 28: 1 – 4.
- Salzman R.A., Fujita T., Zhu-Salzman K., Hasegawa P.M. and Bressan R.A. (1999): An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 11-17.
- Shirley B. W., Kubasek W. L., Storz G., Bruggeman E., Koorneef M., Ausubel F. M., Goodman H. M. (1995): Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. - *Plant J.*, 8: 659 – 671.
- Trojan V., Bartl P., Musilová M., Vyhnanek T., Martinek P., Tremlová B. (2010): Barevné pšenice - genetika, šlechtění a potravinářské využití. In *HYGIENA ALIMENTORUM XXXI*. 1. vyd. Košice, Slovensko: Univerzita veterinárského lékařstva a farmácie v Košiciach, 5. – 7. 5. 2010: 335-337.
- Winkel - Shirley, B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. – *Plant Physiology*, 26 (2): 485 – 493.