

DISTINGUISHING OF THE SPRING AND WINTER GROWTH HABITS OF COMMON WHEAT VARIETIES (*TRITICUM AESTIVUM* L.) BY DETECTION OF GENE *VRN1*

ROZLIŠENÍ JARNÍCH A OZIMÝCH ODRŮD PŠENICE OBECNÉ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) DETEKCÍ GENU *VRN1*

Kohutová Z., Vejl P.

Katedra genetiky a šlechtění, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha, Česká republika.

E-mail: kohutova@af.czu.cz, vejl@af.czu.cz

ABSTRACT

The vernalisation of wheat is directed by 4 majorgenes: *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3* and *Vrn4*. The gene *Vrn1* has the major influence on the spring or winter growth habit of wheat. The gene *Vrn1* was detected by method PCR to distinguish the growth habit of wheat. *Vrn1* brings out in the dominant form the spring growth habit – plants are sensitive to low temperatures a the recesive form of *vrn1* is accountalbe for winter growth habit, when plants are vigorous to low temperatures. The sequence of *Vrn1* was found in *Triticum monococcum* and the difference between dominant and recesive allele is located in the promoter, where deletion in the dominant allele was found. In present times, 3 forms of the *Vrn1* were described. Lenght of these forms is 20bp, 34bp and 48 bp. Deletion in the promoter of the recesive allele was not described. The primer for detection of *Vrn1* was suggested on the basis of modern bioinformatic methods and this primer was tested on 120 common wheat varieties.

Keywords: Common wheat, vernalization, gene *Vrn1*, primer, PCR

ABSTRAKT

Vernalizace je řízena čtyřmi majorgeny: *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3* a *Vrn4*. Gen *Vrn1* má zásadní vliv na jarovost či ozimost pšenice. Pro rozlišení jarních a ozimých forem pšenice obecné byl detekován gen *Vrn1* metodou PCR. *Vrn1* v genotypu v dominantní sestavě vyvolává jarovost – rostlina je citlivá na nízké teploty a recesivní homozygotní *vrn1* je zodpovědná za ozimost, kdy je rostlina vůči nízkým teplotám odolná. Gen *Vrn1* byl osekvenován u *Triticum monococcum*, kde rozdíl mezi dominantní a recesivní alelou je v promotoru, ve kterém se u dominantní alely nachází delece. Dosud byly popsány tři formy dominantní alely genu *Vrn1* a to o velikosti delece 20bp, 34bp nebo 48bp. U recesivní alely nebyla delece v oblasti promotoru zjištěna. Na základě metod moderní bioinformatiky byl navržen primer pro detekci genu *Vrn1*, který byl testován na 120-ti odrůdách pšenice obecné.

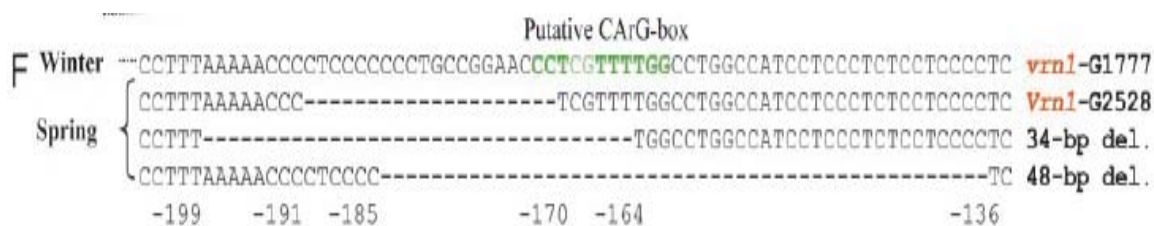
Klíčové slova: Pšenice obecná, vernalizace, gen *Vrn1*, primer, PCR

ÚVOD

Jarovost nebo ozimost u pšenice je řízena třemi faktory: raností, fotoperiodickou citlivostí a vernalizačním požadavkem (Shindo *et al.*, 2002). Vernalizace je zejména u ozimých forem zřetelný požadavek na nízké teploty v počátečním období vegetace. Je to požadavek definovaný rozsahem teplot a nezbytnou dobou působení (Petr *et al.*, 1997). Substitucí chromosomů V. homeologické skupiny nesoucích dominantní lokusy *Vrn* z donorových odrůd (Zlatka, Česká Přesívka, Chinese Spring) do pozadí ozimů (Zdar, Košutka, Vala) došlo ke vzniku linií s jarním růstovým typem, a zároveň s významně sníženou odolností vůči nízkým teplotám oproti původním ozimým odrůdám (Prášil, 2004).

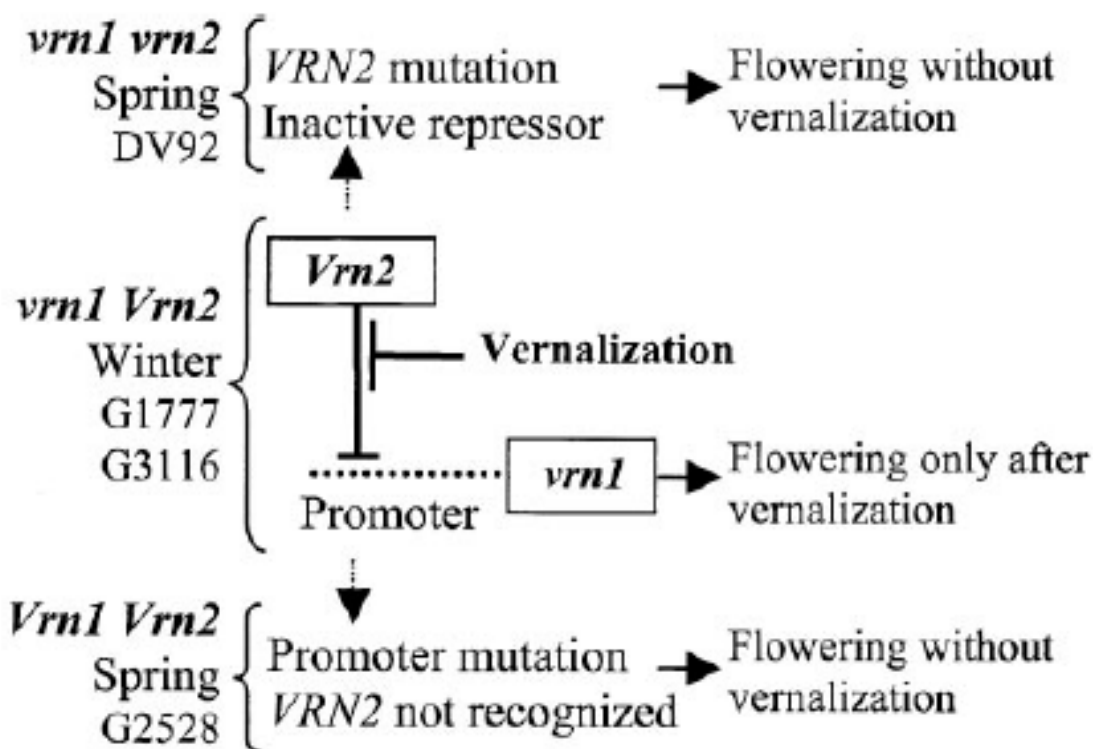
Podle autora Yan *et al.* (2003) geny *Vrn1* a *Vrn2* jsou hlavními geny, které řídí proces vernalizace. Gen *Vrn1*, který byl osekvenován u *Triticum monococcum*, má zásadní vliv na jarovost či ozimost pšenice. Rozdíl mezi dominantní a recesivní alelou je v promotoru, ve kterém se u dominantní alely nachází delece. Dosud byly popsány tři formy dominantní alely genu *Vrn1* a to o velikosti delece 20bp, 34bp nebo 48bp. U recesivní alely nebyla delece v oblasti promotoru zjištěna (viz. obrázek 1).

Obrázek 1: Rozdíl mezi dominantní a recesivní alelou v promotoru (podle Yan *et al.* (2003))



Řízení vernalizačního procesu funguje na principu negativní regulace genové exprese. Gen *Vrn2* působí jako tzv. represor, který se váže pouze na promotor recesivní alely genu *vrn1* a tím gen *vrn1* inaktivuje. Dominantní alelu genu *Vrn1* produkt genu *Vrn2* nerozpoznává. Působením nízkých teplot (vernalizační požadavek) dochází k degradaci represoru a dochází k expresi genu *vrn1*. K indukci kvetení dochází takto u ozimých pšenic až po působení nízkých teplot. Pokud se nachází gen *Vrn1* v dominantní sestavě nebo gen *vrn2* v recesivně homozygotní sestavě (není syntetizován represor *Vrn2*), kvetení proběhne bez vernalizačního požadavku a jedná se o jarní formu pšenice (viz. obrázek 2).

Obrázek 2: Geny *Vrn1* a *Vrn2* při řízení vernalizace (podle Yan et al. (2003))



MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál

Pro PCR analýzy bylo použito celkem 120 genotypů pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.). Jednalo se o odrůdy jarní i ozimé.

Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen a kitu Plant Gene Elute od firmy Sigma. K izolaci byly používány listy klíčnicích rostlin. Kvalita izolované DNA (vysokomolekularita) byla ověřena pomocí elektroforetické separace v 1% agarozovém gelu na horizontální elektroforéze. Použitá DNA byla ředěna na koncentraci 30 ng . μl^{-1} .

Amplifikace DNA

Polymerázová řetězová reakce probíhala v termocykleru T-gradient (Biometra, Německo). Byly použity primery pro detekci *Vrn1* genu: AP1-ProDel-F₁ 5'- ACA GCG GCT ATG CTC CAG – 3', AP1-ProDel-R₁ 5'- TAT CAG GTG GTT GGG TGA GG – 3'.

Pro PCR reakci bylo chemické složení následující: 60 ng templátové DNA, 0,24 μM primeru, 1x PCR pufr, 2,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, 1,5U Taq polymerázy (Fermentas, Litva). Pro PCR byl použit námi optimalizovaný teplotní a časový profil uvedený v tabulce 1.

Tabulka 1: teplotně časový profil optimalizované PCR reakce

Kroky PCR	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [s]	Počet cyklů
počáteční denaturace	94,0	180	1
denaturace	94,0	45	34
„annealing“	63,5	90	
prodlužování	72,0	90	
závěrečné prodlužování	72,0	300	1
uchování produktů	4,0	max.	1

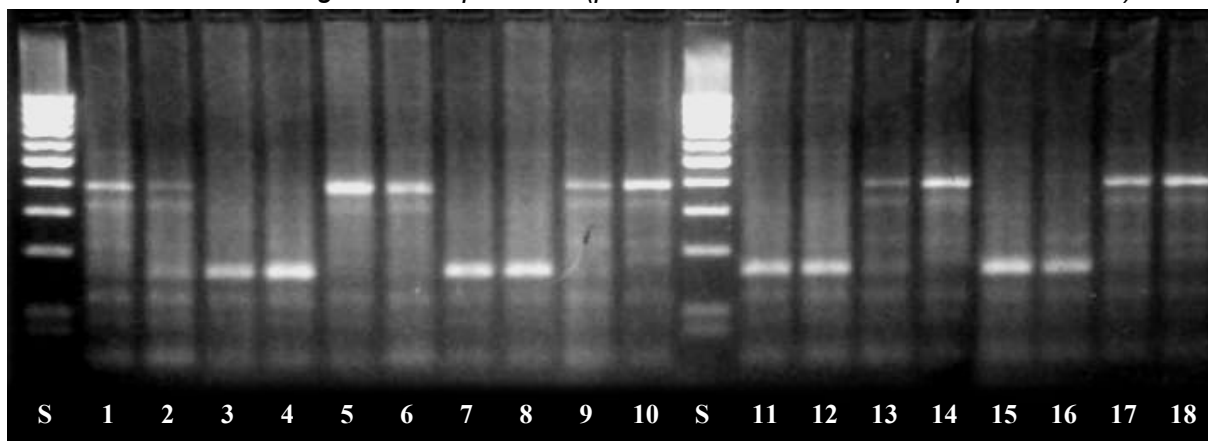
Elektroforetická separace PCR produktů a počítačová analýza elektroforeogramů

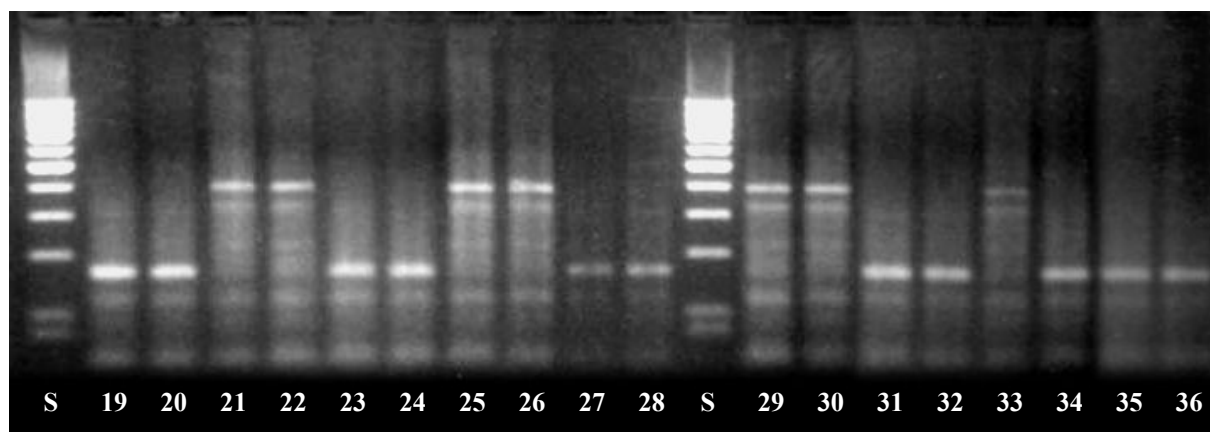
Pro separaci amplifikovaných fragmentů DNA byla použita horizontální 1,7 % agarózová elektroforéza (přístroj firmy Bio Rad, USA). Elektroforeogramy byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu na UV transiluminátoru a dokumentovány fotokamerou Polaroid.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledkem izolace DNA byla vysokomolekulární DNA, která byla otestována, kvantifikována a byla použita pro PCR. Byl použit primer AP1-ProDel. Pro specifičnost amplifikace byla důležitým faktorem „annealing“ teplota a časový profil PCR reakce. Pro získání výsledků v této práci byla použita teplota 63,5 $^{\circ}\text{C}$. Z elektroforeogramů PCR produktů jednotlivých odrůd byla vyhodnocena přítomnost dominantní nebo recesivní alely v genu *Vrn1*, či-li jedná-li se o jarní nebo ozimou formu pšenice obecné. Na elektroforeogramu (obrazky 3 a 4) je patrna detekce genu *Vrn1* u 36 odrůd, z toho jarní odrůdy jsou: kanadské pšenice (1-Renown, 2-Redfile, 5-Manitoba, 6-Marquis, 9- Garton, 10-Goronation, 13-Huron, 14-Garnet), 17-Anza, 18-Jara, 21-Klasik, 22-Glenlea, 25-Sandra, 26-Aranka, 29-Leguan, 30-Granny, 33-Sirael, 34-Chinese Spring. Ozimé odrůdy jsou: 3-Mironovská, 4-Mladka, 7-Nela, 8-Rheia, 11-Rialto, 12-Samanta, 15-Sparta, 16-Sulamit, 19-Merrito, 20-Harrier, 23-Ilias, 24-Apache, 27-Rapsodia, 28-Ebi, 31-Talent, 32-Alibaba, 35-Versailles, 36-Cheyenne.

Obrázek 3: Elektroforeogram PCR produktů (primer AP1-ProDel u odrůd pšenice 1-18)





S – hmotnostní standard λ DNA/Eco47I (AvaII)

Na ozimost a jarovost nemá vliv pouze gen *Vrn1*. Důkazem je jarní odrůda Chinese Spring (34), která se na elektroforeogramu jeví jako ozimá, to znamená, že gen *vrn1* má v recesivní sestavě.

Odrůda Cheyenne (36) sice má gen *vrn1* v recesivní sestavě, rovněž ale i gen *vrn2* je v recesivní sestavě. Tato kombinace předurčuje jarní variantu. Recesivní alela genu *vrn3* (zimní) nahrazuje substitucí v chromozomu 5D dominantní (jarní) alelu genu *Vrn3*, čímž je Cheyenne v konečném důsledku odrůdou ozimou (Limin and Fowler, 2001).

Pro jednoznačné určení jarní nebo ozimé formy pšenice je tedy třeba ještě navrhnout primer, který by detekoval gen *Vrn2*, osekvenovat geny *Vrn3* a *Vrn4* a následně navrhnout primery pro jejich detekci.

V posledních letech bylo registrováno několik nedostatečně zimovzdorných odrůd. Nepochybně to souviselo s mírným průběhem zim během posledních několika let a s tím, že jejich ostatní hospodářsky významné charakteristiky se ukázaly jako významně lepší než u jiných genotypů. Pokud by tento trend pokračoval, pak z hlediska dostatečného přezimování ozimé pšenice by v ČR mohlo dojít ke zvýšení rizikovosti přezimování v mrazivých zimách (Martínek, 2003). Toto nebezpečí je reálné a podle víceletých průměrů je možné stanovit, že asi za období 10 let nastávají zimy kontinentálnějšiho charakteru, ve kterých odrůdy málo odolné zcela vymrzají. Při šlechtění pšenice se nemůžeme opírat o přirozenou selekci v polních podmínkách, protože vzhledem k nepříznivým vzbám mrazuvzdornosti k výnosu zrna a často i k odolnostem k chorobám by se nahromadil pouze šlechtitelský materiál s nízkou mrazuvzdorností (Hanišová *et al*, 2004). Techniky molekulární genetiky, v tomto případě detekce genu *Vrn1*, představují rychlou, spolehlivou a jednoznačnou detekci genetické výbavy konkrétních rostlin a umožňují tak výrazný zefektivňující krok ve šlechtitelském procesu.

ZÁVĚR

Výsledky experimentů, které sledovaly detekci genu *Vrn1* při rozlišení jarních a ozimých odrůd pšenice obecné, potvrzují, že tato metoda je vhodným postupem pro řešení této problematiky. Navržené primery spolehlivě detekovaly dominantní a recesivní alelu genu *Vrn1*. Pro jednoznačné rozlišení bude nutné navrhnout primer pro detekci genu *Vrn2*, který se rovněž podílí na řízení procesu vernalizace a ovlivňuje, zdali má rostlina požadavek na nízké teploty v počátečním období vegetace, a osekvenovat a navrhnout primery pro neméně důležité geny *Vrn3* a *Vrn4*. Nezbytné je metodu vždy optimalizovat pro dané laboratorní podmínky.

Práce je podporována výzkumným záměrem MSM 412100002 a grantovým projektem QF4190.

LITERATURA

- Hanišová, A., Horčíčka, P.: Potřebujeme mrazuvzdorné odrůdy pšenice? www.selgen.cz
- Limin, A. E., Fowler, D. B.: Inheritance of cell size in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to the vernalization loci. *Theor Appl Genet*, 103, 2001, 277-281.
- Martínek, P., Prášilová, P.: Porosty ozimé pšenice byly na Moravě poškozeny mrazy. www.agrokrom.cz
- Petr, J., Húska, J. a kolektiv: Speciální produkce rostlinná – I.. AF ČZU Praha, 1997: 197 s.
- Prášil, I.: Určení vztahů mezi potřebou jarovizace a mrazuvzdorností pšenice. www.vurv.cz
- Shindo, C., Sasakuma, T.: Genes responding to vernalization in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*, 104, 2002, 1003-1010.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J.: Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Plant Biology*, 10, 2003, 6263-6268.