

TOMO LVIII

**ACADEMIA NACIONAL
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

ISSN 0327-8093

BUENOS AIRES

REPUBLICA ARGENTINA

**Conferencia del Ing. Agr. Dr. Jorge
Dubcovsky
(Univ. California, Davis, USA)**

**Clonado posicional de los genes de
vernalización de trigo**



Sesión Pública Extraordinaria
del
6 de Abril de 2004

CLONADO POSICIONAL DE LOS GENES DE VERNALIZACIÓN DE TRIGO

Dr. Jorge Dubcovsky¹, Gabriela Tranquilli^{1,2}, Marcelo Helguera^{1,3}, Viviana Echenique^{1,4}, Artem Loukoianov¹, Ann Blechl⁵ and Liuling Yan¹

¹ Dept. of Agronomy & Range Science, Univ. of California, Davis, CA 95616, USA. E-mail: jdubcovsky@ucdavis.edu; ² Instituto de Recursos Biológicos- CIRN – INTA Castelar; ³ EEA –Marcos Juárez. INTA, ⁴ Departamento de Agronomía- Universidad Nacional del Sur, ⁵ Department of Agriculture–Agricultural Research Service, Albany, USA.

Señoras y Señores:

Antes que nada deseo agradecer vuestra presencia lo mismo que agradecer las amables palabras del Ing. Agr. Suárez y por supuesto me siento honrado de haber sido invitado a esta prestigiosa tribuna.

Introducción

El trigo es uno de los principales cereales consumidos por el hombre. Su consumo se ha duplicado durante los últimos 30 años y la producción anual ha alcanzado alrededor de 600 millones de toneladas. La importancia económica del cultivo depende en gran medida de su amplia adaptabilidad a distintos ambientes, desde templados a tropicales, lo cual se ve facilitado por la flexibilidad que muestra en su regulación del momento de floración. El requerimiento de vernalización, es decir acumulación de horas de frío, es uno de los mecanismos que regulan la floración y es particularmente importante en la adaptación a climas fríos. La respuesta a la vernalización está controlada genéticamente, siendo *Vrn1* y *Vrn2* los genes principales en cereales como trigo, cebada y centeno. *Vrn-1* y *Vrn2* han sido mapeados en regiones

colineares homeólogas entre estas especies, sugiriendo la presencia de genes ortólogos. (1-3)

Estos genes presentan fuertes interacciones epistáticas por lo que actuarían dentro de la misma vía regulatoria (4,5). Tanto en trigo como en cebada, los alelos *Vrn1* (dominante) y *vrn2* (recesivo) confieren hábito de crecimiento primaveral y son epistáticos sobre los alelos que confieren hábito de crecimiento invernal, de manera que el fenotipo invernal se observa únicamente en plantas que llevan el alelo *vrn1* en estado homocigota y al menos una dosis del alelo *Vrn2* (1,2,4,5).

Con el objetivo de llegar a un mayor entendimiento del mecanismo del proceso de vernalización y su interacción con otros factores ambientales en la determinación del momento de floración en el trigo se planteó como primer paso el aislamiento de los genes *Vrn1* y *Vrn2* utilizando como estrategia el clonado posicional. El clonado mediante caminata cromosómica en el trigo reviste cierta complejidad debido al gran tamaño del genoma (5.600 Mb en el genoma haploide de *Triticum monococcum*, A^mA^m, y 16.000 Mb en el de *T. aestivum*,

AABBDD) y la abundancia de elementos repetitivos. A fin de disminuir la probabilidad de que estos elementos repetitivos detuvieran la caminata, tanto para el clonado de *Vrn1* como el de *Vrn2*, se utilizaron las regiones ortólogas de arroz, cebada y sorgo como puntos de apoyo para superar estas regiones genómicas.

En este artículo se resumen los logros alcanzados en el clonado posicional de *Vrn1* y *Vrn2* y se plantea un modelo para explicar a nivel molecular las interacciones entre estos genes.

Clonado posicional de *Vrn1*

El clonado posicional de *Vrn1* se alcanzó en primera lugar, y los resultados de este trabajo fueron publicados por Yan et al (2003) (6).

Brevemente, para el clonado de *Vrn1* se desarrolló un mapa de alta densidad utilizando una población de mapeo constituida por 3.095 individuos F2 derivados del cruzamiento entre dos líneas de *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*: G2528 (primaveral, *Vrn1*) y G1777 (invernal, *vrn1*). Paralelamente se construyó el mapa físico de la región comprendida entre los marcadores Wg644 y CD708, utilizándose para ello bibliotecas genómicas de BACs (Bacterial Artificial Chromosome). Finalmente se llegó a delimitar una zona mínima de 0.04cM en la que dos genes resultaron ser candidatos para *Vrn1* (Fig 1). Ambos genes, designados *AGLG1* y *AP1*, corresponden a factores de transcripción y puede clasificarse como miembros de la familia MADS.

La comparación de las secuencias de los genes candidatos en genotipos con distinto hábito de crecimiento, así como el estudio de la

expresión de los mismos frente a distintos tratamientos experimentales (vernalización / no vernalización) fueron estrategias utilizadas para individualizar a *Vrn1*.

Del estudio comparativo de la secuencia de *AGLG1*, entre G2528 y G1777, no se observaron diferencias que pudieran asociarse con la variación fenotípica que muestran estas líneas. Tampoco se observaron diferencias entre las regiones codificantes de *AP1*. Sin embargo, se detectó una delección de 20-pb en la región del promotor de G2528, adyacente a un potencial sitio de reconocimiento de factores de transcripción (CArG-box), sugiriendo que *AP1* era un buen candidato de *Vrn1*. La caracterización de regiones similares en otras líneas primaverales permitió identificar variantes en cuanto al tamaño de la delección, pero en todos los casos comprometiendo al CArG-box.

Los experimentos de RT-PCR llevados a cabo con muestras de ARN mensajero de los genes candidatos, extraídas de ápices, hojas y espigas de plantas sometidas a distintos períodos de vernalización (desde 0 hasta 6 semanas a 4°C) dieron nuevas evidencias para sustentar la hipótesis de que *AP1* es *Vrn1* (Fig 2). Esta hipótesis fue finalmente corroborada por transformación de plantas del cultivar primaverale Bobwhite con *Ap1*, en las cuales se silenció la expresión de *Vrn1* por interferencia de su ARN. En las plantas transformadas se observó un nivel menor de expresión endógena de *AP1* y un retraso en el período a espigazón (entre 14 y 20 días), respecto del testigo no transformado (Fig. 3).

Clonado posicional de *Vrn2*

Los resultados del clonado

posicional de *Vrn2* fueron publicados recientemente en Science por Yan et al (2004) (7).

Sintéticamente, el gen *Vrn2* había sido mapeado previamente en el brazo largo del cromosoma 5A^m de *T. monococcum*, en una población F2 derivada del cruzamiento entre las líneas DV92 (primaveral) y G3116 (invernal). Para el clonado posicional de este gen, se desarrolló un mapa genético de alta densidad utilizando una población de mapeo constituida por 2849 individuos F2 derivados del mismo cruzamiento, y el mapa físico de la región comprendida entre los marcadores flanqueantes Nucellin y UCW22. La generación de nuevos marcadores dentro de esta región y la identificación de individuos recombinantes entre los mismos, permitió acotar a 0.04cM la región conteniendo a *Vrn2*. Dentro de esta región equivalente a 315-Kb se identificaron tres genes completamente ligados a *Vrn2*. (Fig 4). Estos tres genes candidatos, denominados AY485644.3, *ZCCT1* y *ZCCT2*, fueron evaluados en cuanto a su nivel de expresión bajo un tratamiento de vernalización. Se observó que el nivel de expresión en hojas de AY485644.3 no varió significativamente como consecuencia de la vernalización, en tanto que en respuesta a este tratamiento, se observó un paulatino decrecimiento en el nivel de transcritos de *ZCCYT1* y *ZCCT2* ha expresión de *ZCCYT1* se observó también en el

ápice de plantas no vernalizadas. En este tejido no hubo un nivel de transcritos de *ZCCYT2* posible de ser detectados bajo las condiciones experimentales aplicadas, sugiriendo a *ZCCYT1* como el mejor candidato para *Vrn2*. La desregulación de *ZCCYT2* durante la vernalización fue concomitante con un incremento en la transcripción de *Vrn1* (*AP1*), en consistencia con las interacciones epistáticas observadas entre *Vrn1* y *Vrn2* (Fig. 5)

La comparación de los genes candidatos en fenotipos con distintos hábito de crecimiento reveló ausencia de diferencias en la proteína codificada por AY485644.3, y *ZCCT2*, respectivamente. En contraste, se detectó una mutación puntual en la zona codificante de *ZCTT1*, determinante de un cambio de aminoácido (arginina, R, a triptofano, W) en la proteína codificada, que diferenció a DV92 de las líneas invernales evaluadas. Se caracterizó una colección de 65 líneas de *T monococcum*, de las cuales 16 eran invernales. Ninguno de estos genotipos invernales llevaba la mutación R/W, aportando nuevas evidencias de la correspondencia entre *ZCCT1* y *Vrn2*. (Tabla1). La caracterización de este germoplasma se completó con el análisis molecular del promotor de *Vrn1*, pudiendo explicarse la condición primaveral en 46 de los 49 genotipos evaluados, por la presencia de mutaciones o deleciones en *Vrn1* y/o *Vrn2*. (Tabla 1).

Tabla 1. Constitución alélica de los genes *Vrn1* y *Vrn2* en 65 líneas (16 invernales y 49 primaverales) de *T. monococcum* cultivado.

Hábito	N	<i>VRN1</i> (promotor)	<i>VRN2</i> (proteína)
Invernal	16	Tipo salvaje (<i>vrn1</i>)	Tipo salvaje (<i>Vrn2</i>)
Primaveral	21	Tipo salvaje	Mutación R/W
Primaveral	1	Delección 48-bp	Mutación R/W
Primaveral	14	Tipo salvaje	Delección
Primaveral	3	Delección 34-bp	Delección
Primaveral	7	Delección 1-bp	Tipo salvaje
Primaveral	3	Tipo salvaje	Tipo salvaje
Total	65		

La validación de la hipótesis sustentando a *ZCCT1* como gen candidato de *Vrn2* se logró por transformación del cultivar Jagger (invernal), en el cual se silenció la expresión de *Vrn2* por interferencia de su ARN. En las plantas transformadas se observó un nivel menor de expresión endógena de *ZCCT1*, y un adelanto en el período a espigazón (42 días), respecto del testigo no transformado (Fig 6). Paralelamente, el nivel de expresión endógena de *ZCCT2* no mostró diferencias en plantas transformadas respecto del control sin transformar.

Modelo de la regulación del inicio de la floración por vernalización en gramíneas

Basados en el conocimiento ganado a partir de la clonación de *Vrn1* y *Vrn2* y teniendo en cuenta que las gramíneas de clima templado evolucionaron a partir de gramíneas de climas subtropicales el desarrollo de una vía de regulación del inicio de la

floración por vernalización puede considerarse como un paso evolutivo importante en la adaptación de los cereales a climas fríos. En la mayoría de las especies salvajes de la tribu *Triticeae* la vernalización acelera el período a floración, sugiriendo que el hábito de crecimiento invernal es una característica ancestral. Sin embargo, estas especies han conservado la capacidad de generar formas primaverales por mutaciones asociadas a una pérdida de función en los dos genes principales que regulan la respuesta a vernalización, *Vrn1* y *Vrn2* (Fig 7). Las mutaciones independientes generadas en estos *loci* se mantuvieron por selección natural en la población silvestre, y por una fuerte presión de selección en los trigos domesticados. Estos resultados sugieren que la amplia adaptabilidad de los cereales de climas templados se favoreció por la presencia de un sistema flexible en la regulación del inicio de la floración.

Esto es todo así que les doy nuevamente las gracias por su presencia y atención y a la Academia por su hospitalidad.

FIGURAS

Fig 1 Clonado posicional del gen *Vrn1* de vernalización en trigo.

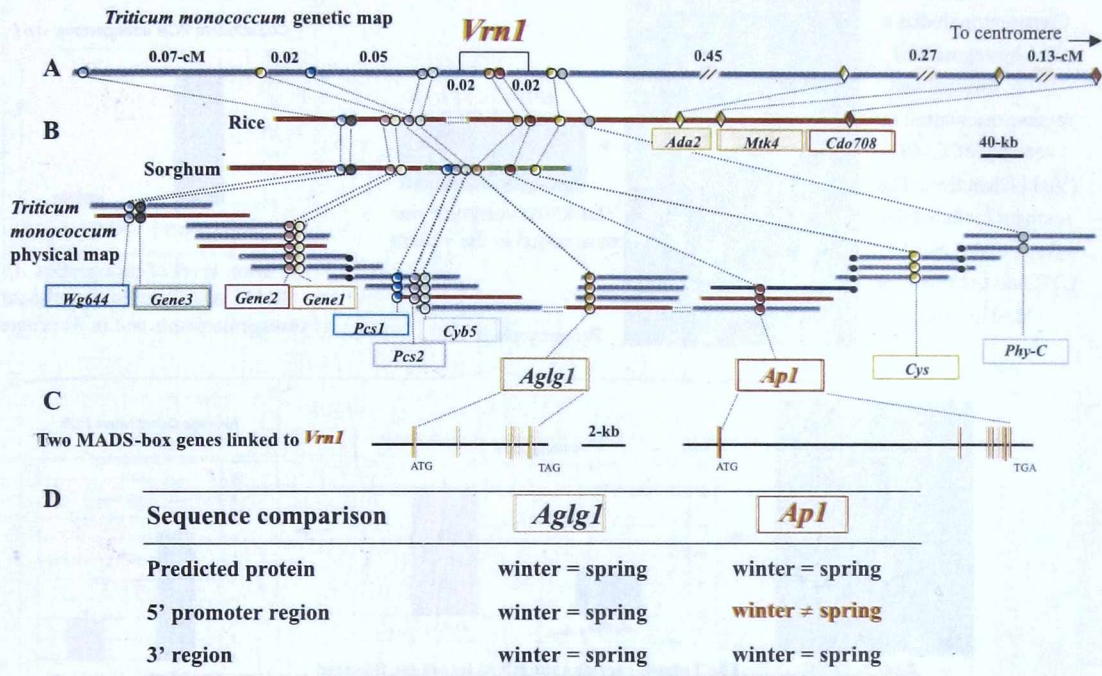
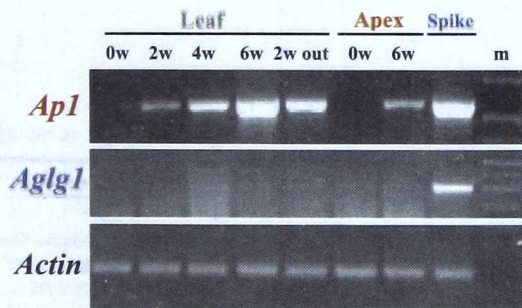


Fig 2. Perfiles de transcripción de *Vrn1*



RT-PCR experiments

- *Apl* is expressed in apices early in the vernalization process
- *Aglg1* is expressed later during spike differentiation
- *Apl* is also expressed in leaves after vernalization

Time course of transcription levels during vernalization (Quantitative PCR)

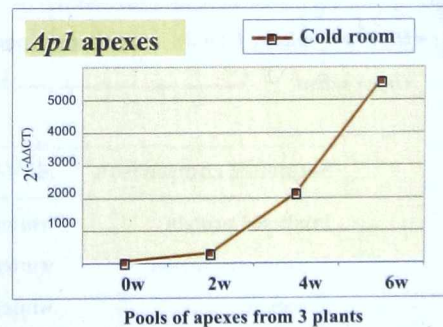
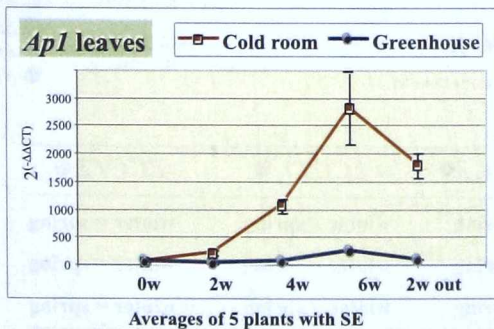


Fig 3. Validación de *Ap1* como gen candidato de *Vrn1*.

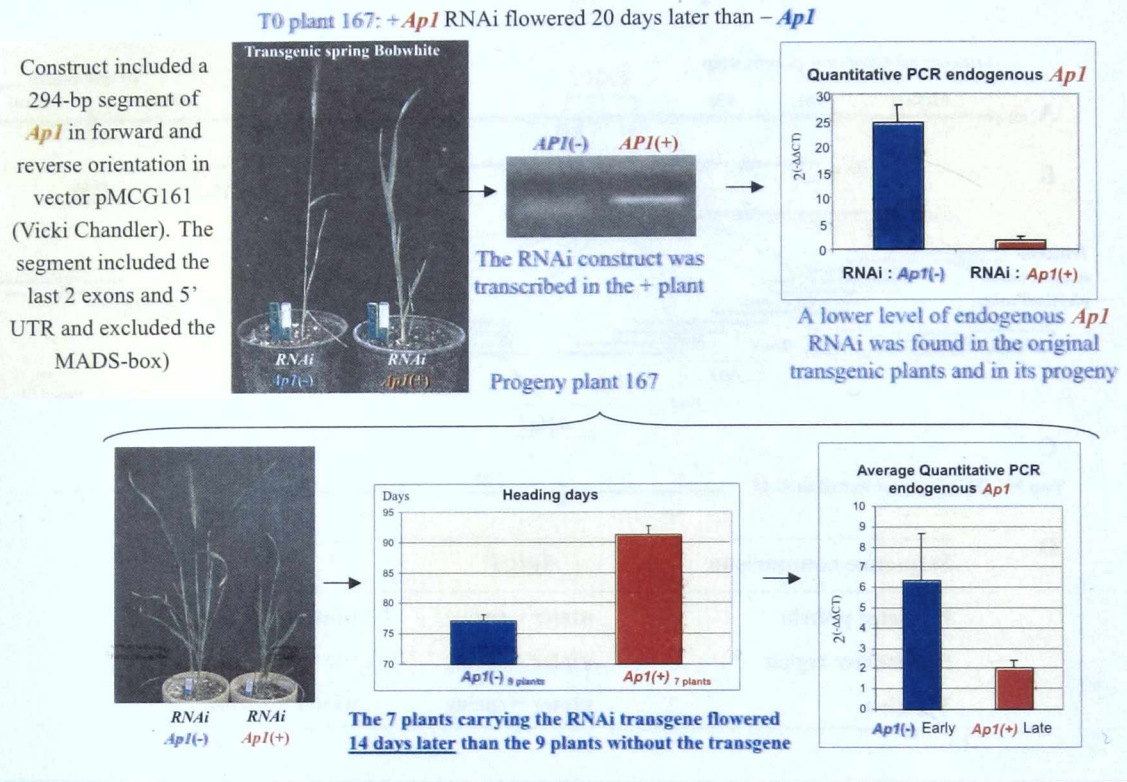


Fig 4 Clonado posicional del gen *Vrn2*

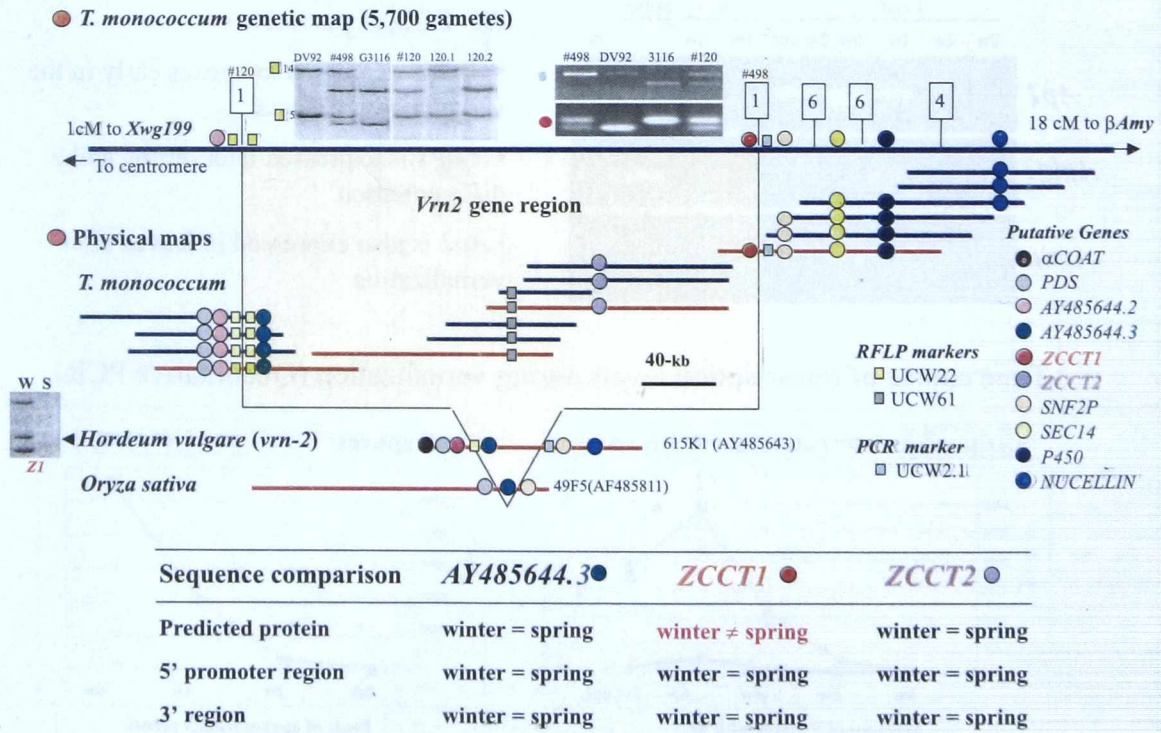
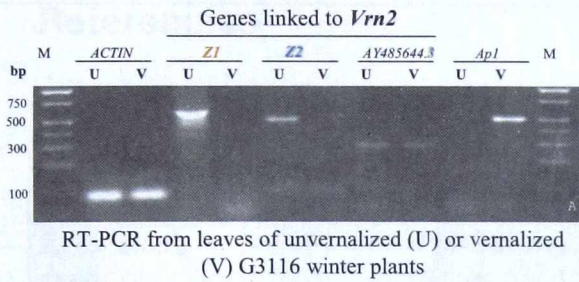


Fig 5 Perfiles de transcripción de *Vrn2*

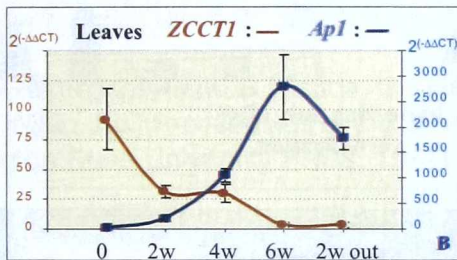


RT-PCR from leaves of unvernallized (U) or vernalized (V) G3116 winter plants

RT-PCR experiments in leaves

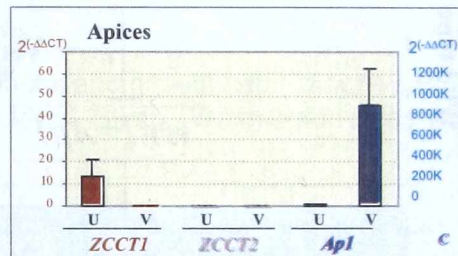
- These five genes were tested in the same cDNA sample
- RNA from *ZCCT1* and *ZCCT2* was detected in unvernallized plants but not after six weeks of vernalization
- RNA levels of *AY485644.3* were not affected by vernalization

Time course of transcription levels of *ZCCT1* and *Apl1* in leaves during vernalization



Quantitative PCR using TaqMan systems for *ZCCT1* and *Apl1* and *Actin* as control. Averages of 5 leaves ± SE.

Transcription levels of *ZCCT1*, *ZCCT2*, and *Apl1* in apices during vernalization

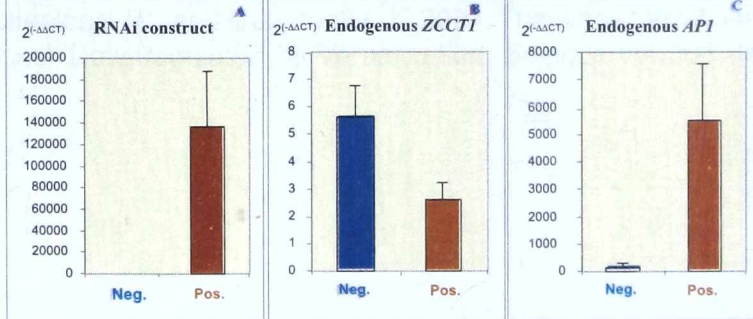


Quantitative PCR using TaqMan systems for *Z1*, *Z2*, *Apl1* and *Actin* as control. Averages of 3 pools of apices ± SE

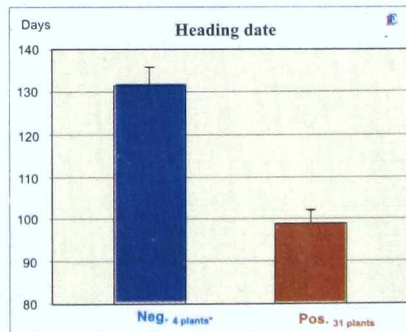
Fig 6 Interferencia de RNA de *ZCCT1* en plantas de trigo transgénicas

Common winter wheat Jagger was transformed with a construct including a 347-bp segment of *ZCCT1* in forward and reverse orientation in vector pMCG161 (Vicki Chandler).

Average RNA level of 8 positive and 8 negative transgenic Jagger T₁ plants

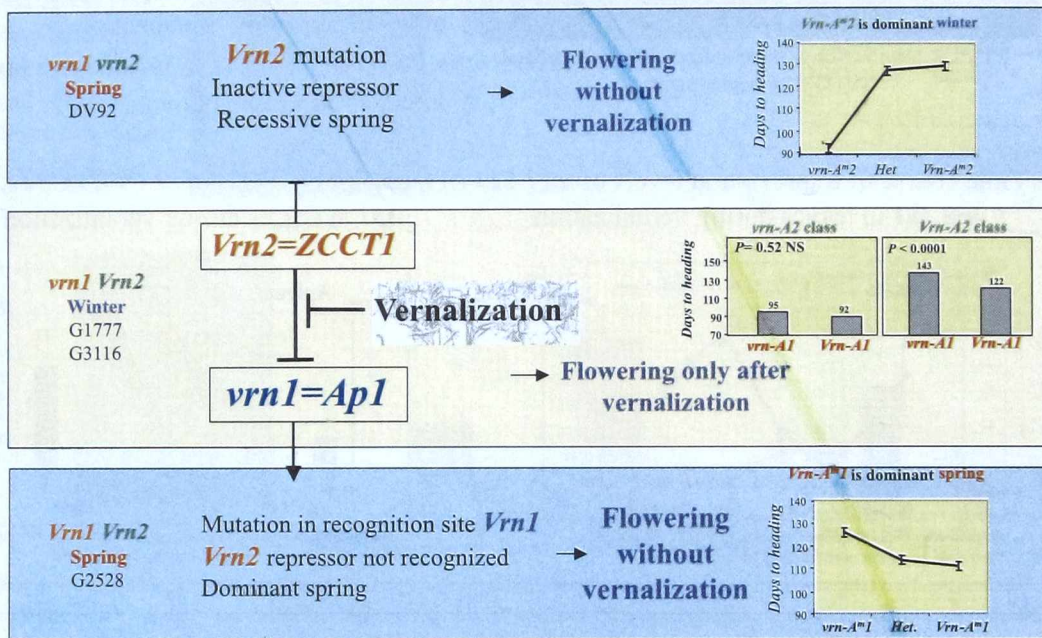


Transformation of winter wheat Jagger into a spring wheat by RNAi demonstrated that *ZCCT1* plays an essential role in the vernalization pathway of common wheat



* 7 additional negative plants have not flowered yet.

Fig. 7. Modelo de la regulación del inicio de la floración por vernalización en gramíneas.



Referencias

1. Dubcovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L. and G. Tranquilli. 1998. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor. Appl. Genet.* 97: 968-975.
2. Laurie D. A., N. Pratchett, J. H. Bezant, J. W. Snape. 1995 RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley *Hordeum vulgare* (L.) cross. *Genome* 38: 575-585.
3. Plaschke, J., Börner, A., Xie, D. X., Koebner, R. M. D., Schlegel, R., and Gale, M. D. 1993. RFLP mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. *Theor. Appl. Genet.* 85: 1049-1054.
4. Takahashi R. and S. Yasuda, Genetics of earliness and growth habit in barley, R. A. Nilan, Ed., Proceedings of the 2nd Int. Barley Genet. Symp., Washington (Washington State University Press, 1971).
5. Tranquilli, G. and J. Dubcovsky. 1999. Epistatic interactions between vernalization genes *Vrn-A^m1* and *Vrn-A^m2* in diploid wheat. *J. Hered.*, 91: 304-306.
6. Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., and Dubcovsky, J. 2003. Positional cloning of wheat vernalization gene *Vrn-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 6263-6268.
7. Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J. L., Echenique, V., and Dubcovsky, J. 2004. The wheat *Vrn2* gene is a Flowering Repressor Downregulated by Vernalization. *Science* Vol 303, Issue 5664, 1640-1644.