



Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany



METODICKÁ PRÍRUČKA

*Transformácia pšenice
biolistickou metódou*



Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ



Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Vypracoval: Mgr. Katarína Ondreičková
Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany
Bratislavská cesta 122
921 68 Piešťany

Piešťany, 2012

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Materiál.....	6
2.1 Donorové rastliny.....	6
2.2 Sterilizácia nezrelých embryí.....	6
2.3 Zásobné roztoky pre kultivačné médiá.....	6
2.4 Kultivačné médiá (Vasil & Vasil, 2006).....	8
2.5 Materiál potrebný k nastreľovaniu.....	10
3. Metódy.....	12
3.1 Príprava donorového materiálu.....	12
3.2 Obaľovanie zlatých častíc plazmidovou DNA.....	13
3.3 Transformácia pomocou génovej pušky PDS 1000/He.....	13
3.4 In vitro kultivácia, regenerácia a rast potenciálnych transformantov.....	15
4. GUS analýza.....	17
5. Použitá literatúra.....	19
6. Príloha.....	21

1. Úvod

Pšenica je jednou z najvýznamnejších potravinárskych plodín. Pre 35% ľudskej populácie v 60 krajinách tvorí základ stravy a vytvára 10-20% ich denného kalorického príjmu. Pšenica sa stala jednou z posledných obilnín, ktoré boli úspešne transformované. Prvé transgénné pšenice boli získané začiatkom 90-tych rokov min. storočia, keď bola vynájdená biolistická metóda na transformáciu (Klien et al., 1987), keďže jednoklíčnolistové rastliny sú veľmi slabo citlivé na transformáciu sprostredkovanú pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens*. Vasil et al. (1992) boli prví, ktorí získali transgénnu pšenicu biolistickou metódou, ale ich postup bol veľmi zdĺhavý (12 – 15 mesiacov). Prvé pokusy s transformovaním pšenice vykazovali nízku transformačnú účinnosť od 0,2% do 1,5% (Vasil et al., 1992; Vasil et al., 1993; Weeks et al., 1993; Becker et al., 1994). Zlepšením transformačných podmienok sa zvýšila účinnosť transformácie na 2 – 5 % (Rasco-Gaunt et al., 1999; Pastori et al., 1992).

Na regeneráciu transgénnych rastlín z explantátov je vhodných niekoľko typov pletív. Najpopulárnejšie je používanie nezrelých embryí

(Vasil et al., 1992; Vasil et al., 1993; Weeks et al., 1993; Becker et al., 1994), ale v menšej miere aj používanie apikálnych meristémov, peľnicových kultúr a mikrospór (Ahmed et al., 1992; Barro et al., 1997). Výhodou použitia nezrelých embryí je ich schopnosť vytvárať somatické embryá. Ich nevýhodou je, že nezrelé embryá sú schopné vytvárať tieto somatické embryá iba počas veľmi krátkej doby (1 – 2 dni) počas ich vývoja. Ďalšou nevýhodou, ale nielen pri nezrelých embryách je, že množstvo a kvalita explantátov vhodných pre transformáciu závisí aj od rastových podmienok donorových rastlín ako aj od genotypu rastlín.

2. Materiál

2.1 Donorové rastliny

Pre úspešnú transformáciu je veľmi dôležitý dobrý stav rastlín (*Triticum aestivum* L.), z ktorých budú využité nezrelé embryá. Rastliny sa sadia do cca 10 l črepníkov po 5 – 7 rastlín na 1 črepník. Pri ozimných pšeniciach je dôležitá jarovizácia pri 4 - 5°C asi 8 týždňov. Ak donorové rastliny rastú v rastovej komore tak je minimálna možnosť ich napadnutia rastlinnými patogénmi. Ak však rastú vo vonkajších podmienkach je veľká možnosť, že budú napadnuté napr. múčnatkou. Treba rastliny sledovať a preventívne ich ošetriť pred napadnutiami, keďže iba zo zdravých rastlín sa berú nezrelé embryá aby sa zabránilo následnej kontaminácii pri kultivácii *in vitro*.

2.2 Sterilizácia nezrelých embryí

Etanol 70% (v/v)

Savo 50% (v/v)

Sterilná voda

2.3 Zásobné roztoky pre kultivačné médiá

Zásobné roztoky je potrebné mať pripravené dopredu a sú využívané pri príprave kultivačných médií pri kultivácii *in vitro*.

Zásobný roztok vitamínov

Vitamín	Navážka	Sterilizácia, uskladnenie
Tiamín	10 mg	sterilizácia cez filter, uloženie pri -20°C
Kys. nikotínová	50 mg	
Pyridoxín HCl	50 mg	
Glycín	200 mg	
Destilovaná voda	doliať do objemu 100 ml	

Chemikália	Koncentrácia	Rozpúšťadlo	Sterilizácia	Uskladnenie
2,4-Dichlorofenoxyoctová kys. (2,4-D)	2 mg/ml	rozpuštiť v malom množstve etanolu, pridať vodu do potrebného objemu	sterilizácia cez filter	-20°C v 1 ml alikvotách
Zeatín	5 mg/ml	rozpuštiť v malom objeme 1M HCl a doliať vodou do potrebného objemu	sterilizácia cez filter	-20°C v 1 ml alikvotách
Fosfinotricín (PPT)	5 mg/ml	voda	sterilizácia cez filter	-20°C v 1 ml alikvotách

2.4 Kultivačné médiá (Vasil & Vasil, 2005)

Všetky kultivačné médiá je potrebné autoklávať 15 min pri 121°C, pričom zásobný roztok vitamínov, zeatín a fosfinitricín sa pridávajú do média až po autoklávaní.

Médium na kultiváciu nezrelých embryí (č. 1), 1000 ml	
MS soli (Murashige & Skoog, 1962)	4,3 g
Sacharóza	20 g
Myo-inozitol	100 mg
Glutamín	500 mg
Kazeín hydrolyzát	100 mg
2,4-D	2 mg
pH	5,8
Gelrite	2,5 g
Zásobný roztok vitamínov	1 ml

Osmotické médium (č. 2), 1000 ml	
MS soli	4,3 g
Sacharóza	20 g
0,2 M sorbitol	36,44 g
0,2 M mannitol	36,44 g
Myo-inozitol	100 mg
Glutamín	500 mg
Kazeín hydrolyzát	100 mg
2,4-D	2 mg
pH	5,8
Gelrite	2,5 g
Zásobný roztok vitamínov	1 ml

Selekčné médium (č. 3), 1000 ml	
MS soli	4,3 g
Sacharóza	20 g
Myo-inozitol	100 mg
2,4-D	2 mg
pH	5,8
Gelrite	2,5 g
Zásobný roztok vitamínov	1 ml
PPT	3 mg

Regeneračné médium (č. 4), 1000 ml	
MS soli	4,3 g
sacharóza	20 g
Myo-inozitol	100 mg
pH	5,8
Gelrite	2,5 g
Zásobný roztok vitamínov	1 ml
PPT	4 mg
Zeatín	5 mg

Médium na tvorbu výhonkov (č. 5), 1000 ml	
MS soli	2,15 g
Sacharóza	15 g
Myo-inozitol	50 mg
pH	5,8
Gelrite	2,5 g
Zásobný roztok vitamínov	0,5 ml
PPT	5 mg

Zakoreňovacie médium (č. 6), 1000 ml	
MS soli	2,15 g
Sacharóza	15 g
Myo-inozitol	50 mg
pH	5,8
Gelrite	2,5
Zásobný roztok vitamínov	0,5 ml
PPT	4 - 5 mg

2.5 Materiál potrebný k nastreľovaniu

1. Zlaté častice (BIO-RAD) 1 μm je potrebné mať pripravené vo forme zásobného roztoku: 60 mg 1 μm zlatých častíc sa naváži do 1,5 ml skúmavky a pridá sa k nim 1 ml 100 % etanolu. Nasleduje krátky ultrazvuk a centrifugácia 5 s a vyleje sa supernatant. Opakuje sa tento krok ešte 2-krát. Potom sa pridá 1 ml sterilnej destilovanej vody, ultrazvuk 2 min a centrifugácia, supernatant sa vyleje. Aj tento krok sa opakuje 2-krát. Následne sa pridá 1 ml sterilnej destilovanej vody a zlaté častice sa premiešajú vortexovaním. Takto pripravený zásobný roztok zlatých častíc sa uloží v 50 μl alikvotných množstvách pri -20°C . Je dôležité pred každým odpipetovaním do sterilnej skúmavky zásobný roztok vortexovať, pretože zlaté častice sú ťažké a ihneď klesajú na dno skúmavky.

2. Makronosiče, stopovacie mriežky, 900/1100 psi zlomové platničky (BIO-RAD). Stopovacie mriežky treba pred použitím autoklávovať.

3. Plazmidová DNA (1µg/µl) je rozpustená v sterilnej vode a uskladnená pri -20°C.

4. Zásobné roztoky potrebné k obaľovaniu zlatých častíc plazmidovou DNA:

Chemikália	Koncentrácia	Rozpúšťadlo	Sterilizácia	Uskladnenie
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,5 M	rozpustiť 3,67 g v 10 ml objeme vody	sterilizácia cez filter	-20°C v 50 µl alikvotných množstvách
Spermidín	1 M	rozpustiť ešte vo fľaške 1 g spermidínu v 6,89 ml objeme sterilnej vody	-	-80°C v 20 µl alikvotných množstvách
	0,1 M	riedenie 1:10 zásobného roztoku 1M spermidínu v sterilnej vode	-	-80°C v 20 µl alikvotných množstvách ihneď po nariadení

3. Metódy

3.1 Príprava donorového materiálu

1. Sterilizácia zrn pšenice: na transformáciu sú vhodné nezrelé embryá veľké približne 0,5 - 1,2 mm, čo je asi 12 – 16 dní od začiatku kvitnutia. Z rastlín sa zozbierajú klasy a odstránením vonkajších obalov sa získajú zrná, ktoré sa premyjú 5 min v 70 % etanole. Následne sa ponoria do 50 % Sava na 20 min za stáleho miešania. Po 20 min sa zrná 3-krát premyjú v sterilnej vode.

2. Izolácia nezrelých embryí: izolácia prebieha vo flow boxe za sterilných podmienok. Zo zrn sa pomocou skalpela odstráni vonkajší obal (perikarp) a okryje sa nezrelé embryo, ktoré je možné ľahko „odlúpnuť“. Ostrým skalpelom sa odstráni embryonálna os a embryo bez tejto embryonálnej osi (scutellum) sa položí touto stranou nadol na médium č. 1. Na jednej Petriho miske (9 x 14 mm) je vhodné mať asi 25 - 30 embryí.

3. *In vitro* kultivácia nezrelých embryí v kultivačnej miestnosti v tme pri 27°C približne 4 – 6 dní.

4. Pred nastreľovaním sa nezrelé embryá preniesú na médium č. 2 na 4-6 hod a kultivujú v tme pri

27°C. Embryá je potrebné na médium č. 2 uložiť centrálné do kruhu o priemere 2 cm tak aby sa navzájom neprekrývali.

3.2 Obaľovanie zlatých častíc plazmidovou DNA

50 µl pripraveného zásobného roztoku zlatých častíc nechať rozmraziť pri izbovej teplote, ultrazvuk na 1 – 2 min a premiešať pomocou vortexu. Pridať 5 µl DNA (1 µg/µl) a krátko vortexovať. Pridať 50 µl 2,5M CaCl₂·2H₂O a 20 µl 0,1 M spermidínu a zamiešať. Krátko vortexovať spolu s DNA. Nechať na ľade 5 - 10 min. Centrifugácia na najvyššej rýchlosti 3 - 5 s. Vyliať supernatant. Pridať 200 µl 100% etanolu, rýchlo resuspendovať pomocou pipety. Centrifugácia na najvyššej rýchlosti 3 - 5 s a vyliať supernatant. Resuspendovať v 150-250 µl 100% etanolu. Uložiť do ľadu. Spotrebovať do 1 hod!

3.3 Transformácia pomocou génovej pušky PDS

1000/He (BIO-RAD)

Princíp fungovania génovej pušky PDS-1000/He: hélium sa akumuluje v rezervoári vo vrchnej časti génovej pušky dovtedy, kým jeho tlak nie je taký veľký, aby došlo k narušeniu zlomovej platničky pod rezervoárom. Po uvoľnení sa tlak hélia dostáva k makronosiču, na ktorom sú umiestnené zlaté častice obalené DNA. Makronosič sa

pohybuje smerom k stopovacej mriežke, na ktorej sa zastaví, zlaté častice však pokračujú v pohybe, kým nedosiahnu cieľové bunky.

1. Sterilizácia génovej pušky: pred nastreľovaním je potrebné kompletne vysterilizovať génovú pušku aj so všetkými jej súčasťami pomocou 100 % etanolu a vysušením pri izbovej teplote. Sterilizujú sa etanolom aj makronosiče a zlomové platničky. Po vysušení sú makronosiče aj zlomové platničky vložené do pre ne určeného nástavcu.

2. Obalené zlaté častice treba vortexovať a naniesť 5 µl do stredu makronosiču a nechať voľne vysušiť. Stopovacie mriežky, zlomové platničky (900/1100 psi) a makronosič treba vložiť do génovej pušky spolu s Petriho miskou s pripravenými embryami na osmotickom médiu. Vzdialenosť medzi stopovacou mriežkou a Petriho miskou by mala byť približne 5,5 cm. Nastreľovanie prebieha vo vákuu 91,4 - 94,8 kPa. Po výstrele sa vyberie Petriho miska spolu so zlomovou platničkou a makronosičom. Postupne sa opakujú výstrely so všetkými pripravenými Petriho miskami, ale po každom výstrele sa vymení zlomová platnička aj makronosič za nové. Stopovacia mriežka môže zostať rovnaká v prípade, že sa používa 1 typ plazmidovej DNA.

Ak sa v jeden deň použije pri nástreloch viac typov plazmidových DNA je potrebné zakaždým vymieňať aj stopovacie mriežky.

3. Kultivácia nastrelených embryí na osmotickom médiu ešte 16 – 20 hod v kultivačnej miestnosti v tme pri 27°C.

3.4 *In vitro* kultivácia, regenerácia a rast potenciálnych transformantov

1. Kultivácia na selekčnom médiu č. 3: nastrelené embryá sa kultivujú na tomto médiu 2 týždne do tvorby embryogénnych kalusov. *In vitro* kultivácia v kultivačnej miestnosti v tme pri 27°C.

2. Kultivácia na regeneračnom médiu č. 4 prebieha 8 – 10 dní pri fotoperióde 16/8 hod pri 27°C.

3. Kultivácia na médiu č. 5 prebieha 1 – 2 cykly po 2 týždňoch pri stálom osvetlení. Na médium sa prenášajú výhonky spolu s kalusom.

4. Kultivácia na médiu č. 6: na médium sa prenášajú asi 2 cm rastliny a kultivujú sa pri stálom osvetlení do vzniku koreňov.

5. Presádzanie potenciálnych transformantov do pôdy: ak majú rastliny dostatočne vyvinutý koreňový systém presádzajú sa do pôdy. Presadené rastliny sa potrebujú aklimatizovať keď prechádzajú z *in vitro* podmienok a preto je

potrebné ich na asi 10 dní prikryť priehľadnou fóliou aby sa zabezpečila vysoká vlhkosť prostredia.

6. Keď majú rastliny viac listov je možné vyizolovať z listov DNA a pomocou PCR zistiť, ktoré rastliny sú PCR pozitívne, teda nesú gén záujmu. Tieto rastliny potom rastú v kultivačnej miestnosti pri vhodných teplotných podmienkach pri fotoperióde.

7. Nastrelené kalusy/rastliny je možné analyzovať aj pomocou histochemickej GUS analýzy pre reportérový gén *uidA*.

4. GUS analýza

Príprava farbičky (na 100 ml pufru):

NaH₂PO₄.....1,1999g.....roztok „A“ do 50 ml banky }
Na₂HPO₄ (bezvodý).....1,4204g.....roztok „B“ do 50 ml banky } doliať
19,5 ml „A“ + 30,5 ml „B“ + 50 ml redest. vody = PUFOR }
(100 ml), skladovať pri 4°C vodou

Na 10 ml farbičky:

X-gluc.....2 mM.....0,0104 g
Na₂EDTA . 2H₂O.....10 mM.....0,0372 g
K₃Fe(CN)₆.....5 mM.....0,0165 g
K₄Fe(CN)₆. 3H₂O.....5 mM.....0,0211 g
Sorbitol.....400mM.....0,7288 g
Merkaptoetanol.....10 mM.....0,0078 g
DMSO.....2 %.....0,2 g

- Do kadičky navážiť K₃Fe(CN)₆, K₄Fe(CN)₆. 3H₂O, Na₂EDTA . 2H₂O, sorbitol
- X-gluc na lodičku, pridať 200 µl DMSO, nechať rozpustiť a opláchnuť asi 5 ml pufru do kadičky + 7 µl merkaptoetanolu
- Preliať do odmerného valca a doplniť pufrom na 10 ml
- Preliať do umelej skúmavky, zabaliť do alobalu a do chladničky (trvanlivosť 1 mesiac), alebo na -70°C (na -20°C stráca aktivitu)

Postup:

- Sterilne odobrať po jednom kaluse do 1,5 ml skúmavky a pridať asi 100 µl farbičky.
- Inkubácia cez noc na 37°C v tme.
- Koniec farbenia: odpipetovať farbičku, reakciu zastavíme pridaním 70% etanolu asi 500 µl.
- Vždy máme pozitívnu aj negatívnu kontrolu: negatívna sa nezafarbí a pozitívna má modré sfarbenie.
- GUS analýza by sa mala robiť až 48 hod po nastrelení.
- Listy odfarbovať až po inkubácií 70 – 100 % etanolom, mladšie listy sa farbja intenzívnejšie.

5. Použitá literatura

Ahmed, K. Z., Bartok, T., Sagi, F. (1992) A modified method for rapid callus induction by utilisation of endosperm metabolites in mature and immature seeds of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum durum* L.). *Cereal Res Comm* 20:81–86.

Barro, E., Rooke, L., Bekes, E., Gras, P., Tatham, A. S., Fido, R., Lazzeri, P., Shewry, P. R., Barcelo, P. (1997) Transformation of wheat with HMW subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology* 15:1295-1299.

Becker, D., Brettschneider, R., Lorz, H. (1994) Fertile transgenic wheat plants from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J* 5:299-307.

Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., Sanford, J. C. (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70–73.

Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Pastori, G. M., Wilkinson, M. D., Steele, S. M., Sparks, C. A., Jones, H. D., Parry, M. A. J. (2001) Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *Journal Exp Bot* 52:857–863.

Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P., Lazzeri, P. A. (1999) Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* 19: 118–127.

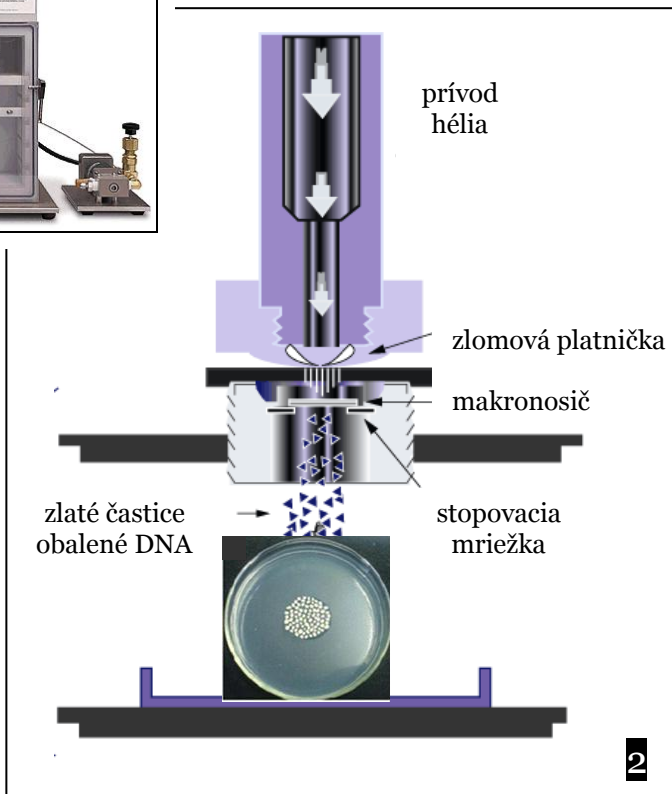
Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E., Vasil, I. K. (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10:667–674.

Vasil, V., Srivastava, V., Castillo, S. M., Fromm, M. E., Vasil, I. K. (1993) Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology* 11:1553–1558.

Vasil, I. K., Vasil, V. (2005) Transformation of wheat via particle bombardment. In: Loyola-Vargas, V. M., Vázquez-Flota, F. *Plant cell culture protocols. Methods in molecular biology.* © Humana Press 2005, ISBN 978-1-58829-547-7

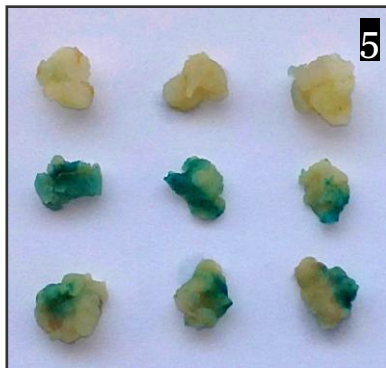
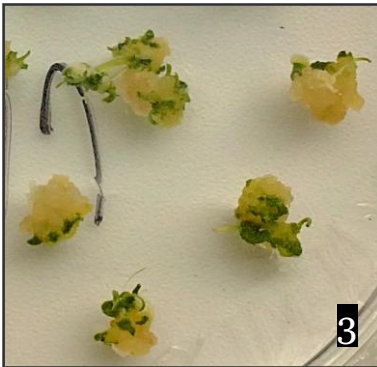
Weeks, J. T., Anderson, O. D., Blechl, A. E. (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*, L.). *Plant Physiol* 102:1077 - 1084.

6. Príloha



1. Génová puška PDS 1000/He.

2. Priebeh nastreľovania, keď dochádza k prasknutiu zlomovej platničky, makronosič sa zastaví na stopovacej mriežke, ale zlaté častice pokračujú v pohybe pokiaľ nezasiahnu cieľové pletivo.



- 3.** Rast výhonkov z nastrelených kalusov na regeneračnom médiu č. 4.
- 4.** Nenastrelené kalusy na regeneračnom médiu č. 4. Nenastáva žiadna tvorba výhonkov, keďže médium obsahuje fosfotricín ako selekčný agens.
- 5.** GUS analýza nastrelených nezrelých embryí (6 kalusov modrej farby).



- 6.** Rast potenciálnych transformantov na zakoreňovacom médiu č. 6.
- 7.** Dostatočne vyvinutá koreňová sústava pri regenerujúcej pšenici vhodná na presádzanie do pôdy.
- 8.** Dopestovanie transformovanej pšenice v črepníku v kultivačnej miestnosti.