

EFFECT OF THIOL COMPOUNDS ON PEA TRANSFORMATION

VLIV THIOLOVÝCH SLOUČENIN NA TRANSFORMACI HRACHU SETÉHO

Matušková P., Reinöhl V., Procházka S.

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita
v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

Email: petra.matuskova@email.cz

ABSTRACT

Pea plants were considered to be „recalcitrant“ to transformation procedures and therefore the first step for the obtaining of transgenic plants is the optimisation of the transformation procedure. From the published methods, the one using embryonic segments and *A. tumefaciens* was used. The method is based on the work of SCHROEDER et al. (1993) that was modified for our laboratory conditions and dry seeds. The original method was furthermore extended with thiol compounds from that as first dithiotreitol in different concentrations was used. The efficiency of the transformation was evaluated by histochemical and molecular testing of the presence and expression of the reporter gene *uidA* (GUS). Transient expression of the *uidA* gene in pea tissues after co-cultivation was achieved, however we have not yet succeeded in proving stable incorporation of the transgene in the analysed plants. Application of dithiotreitol into the medium significantly increased expression of reporter gene.

Keywords: Pea, transformation, *A. tumefaciens*, thiol compounds

ABSTRAKT

Hrách je považován za obtížně transformovatelný a prvním krokem k získání transgenních rostlin je optimalizace postupu transformace. Z metod, které jsou u hrachu popsány jsme se zabývali metodou transgenozie embryonálních řezů pomocí *A. tumefaciens*. Základem byla metoda autorů SCHROEDER et al.(1993),modifikovaná pro suchá semena a naše laboratorní podmínky, kterou jsme rozšířili o thiolové sloučeniny, z nichž jsme jako první začali aplikovat dithiotreitol v různých koncentracích. Účinnost transformačního postupu byla vyhodnocována pomocí histochemického a molekulárně biologického testování přítomnosti a exprese reportérového genu *uidA* (GUS). Bylo dosaženo exprese genu *uidA* v pletivech

hrachu ihned po kokultivaci. Aplikací dithiotreitolu do media byla exprese prokazatelně zesílena.

Klíčová slova: Hrách setý, transformace, *A. tumefaciens*, thiolové sloučeniny

ÚVOD

Hrách je považován za obtížně transformovatelný. Transformací, kdy dochází ke včleňování požadovaného genu do eukaryotické buňky, se dodává plodině určitá specifická vlastnost, která je výhodná z hlediska člověka. Cílem práce je získání rostlin rezistentních k virovým a houbovým chorobám a herbicidům a také zlepšení nutričních vlastností rostlinných potravin. Prvním krokem k získání transgenních rostlin je optimalizace postupu transformace. Z metod, které jsou u hrachu popsány jsme se nejvíce zabývali metodou transgenozе embryonálních řezů pomocí půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* čeledi *Rhizobiaceae*. Základem byla metoda autorů Schroder *et al.*(1993), kterou jsme rozšířili o thiolové sloučeniny, kdy jsme začali aplikovat dithiotreitol (dále DTT) v různých koncentracích. Důvodem pro zařazení thiolových sloučenin do metodiky je snaha o zesílení účinnosti transformace (Olhoft and Somers, 2003). Účinnost transformačního postupu byla vyhodnocována pomocí histochemického a molekulárně biologického testování přítomnosti a exprese reportérového genu *uidA*(GUS).

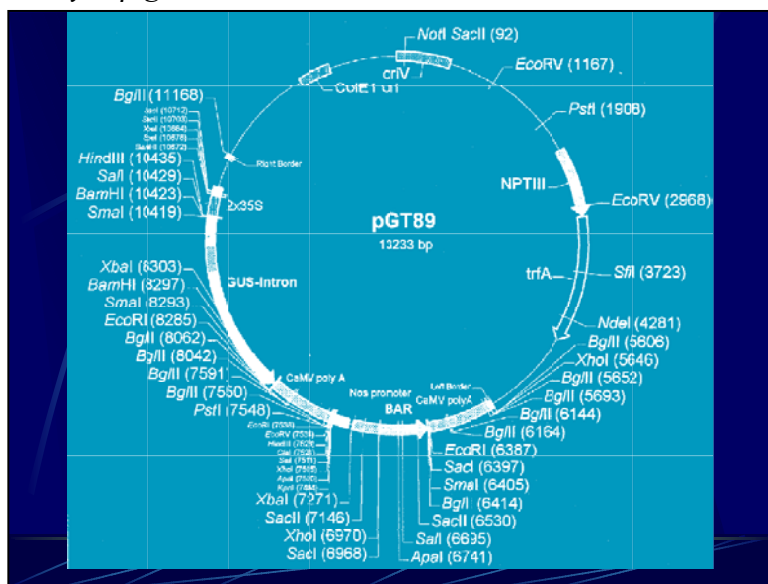
Vycházeli jsme z metod autorů Schroder *et al.*(1993), Anna and Wacław Orczyk (2000) , Olhoft and Somers (2001). Olhoft and Somers (2003).

MATERIÁL A METODY

Při experimentech byla použita odrůda Cézár hrachu zahradního (*Pisum sativum* L). Semena byla sterilizována v 70 % ethanolu a 15 % Savu a poté se nechala naklíčit do druhého dne.(Schroder *et al* 1993). Sterilními nástroji byla vyřezána z nabobtnaných semen embrya bez radikuly a hypokotylu. Vše bylo provedeno za striktně sterilních podmínek.

Pro přenos genů byl použit modifikovaný plazmid pGT89 začleněný do půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* čeledi *Rhizobiaceae*. Část DNA (T- DNA) z plazmidu této bakterie (značený Ti-plazmid) se přenáší do rostlinných buněk, které potom produkují specifické látky, opiny, užitečné pro bakterii. Embryonální řezy byly kultivovány v tekuté suspenzi s Gram pozitivní bakterií kmene *Agrobacterium tumefaciens* s přidavkem DTT o koncentraci 0,5 mM v tekutém mediu MS1/2 s antibiotiky Kanamycinem a Rifampicinem po dobu 90 min.

Mapa plazmidu pGT89 nesoucí NPT3 bakteriální gen pro rezistenci ke kanamycinu. V oblasti T-DNA jsou dále selekční gen *bar* pro rezistenci k fosfinothricinu a reportérový gen *GUS* kódující enzym β -glukuronidázu



Kultivační a kokultivační media

Pro kultivaci *Agrobacterium* bylo použito médium LB s přidavkem antibiotik o pH 7,2 (Schroder *et al* 1993). Opakovaná kultivace po centrifugaci *Agrobacterium* byla již s přidáním embryonálních řezů do MS1/2 media s Acetosyringonem, NAA, BAP a přidavkem 0,5m M DTT.

Médium pro kokultivaci embryonálních řezů umístěných v kultivační místnosti při 20 °C na 7-8 dnů bylo Murashige a Shoog s přidavkem. vitaminů.

Metoda embryonálních řezů

Obr.1. a) Nařezaná embrya hrachu bez radikuly a hypokotilu

b) Embrya v kokultivačním mediu umístěná na 7-8 dnů do kokultivační místnosti při 20 °C

a)



b)



VÝSLEDKY A DISKUSE

Jako důkaz přenosu a integrace transgenu do buněk hrachu bylo použito histochemické analýzy GUS.

Vnesený markerový gen GUS kóduje β -glukuronidázu, která odštěpuje ze substrátu X-GLUC glucuronid při inkubaci 37 °C po dobu 24 hod a v přítomnosti katalyzátoru vzniká tmavě modrá sloučenina, kterou následně detekujeme pod mikroskopem po 8 dnech kokultivace.

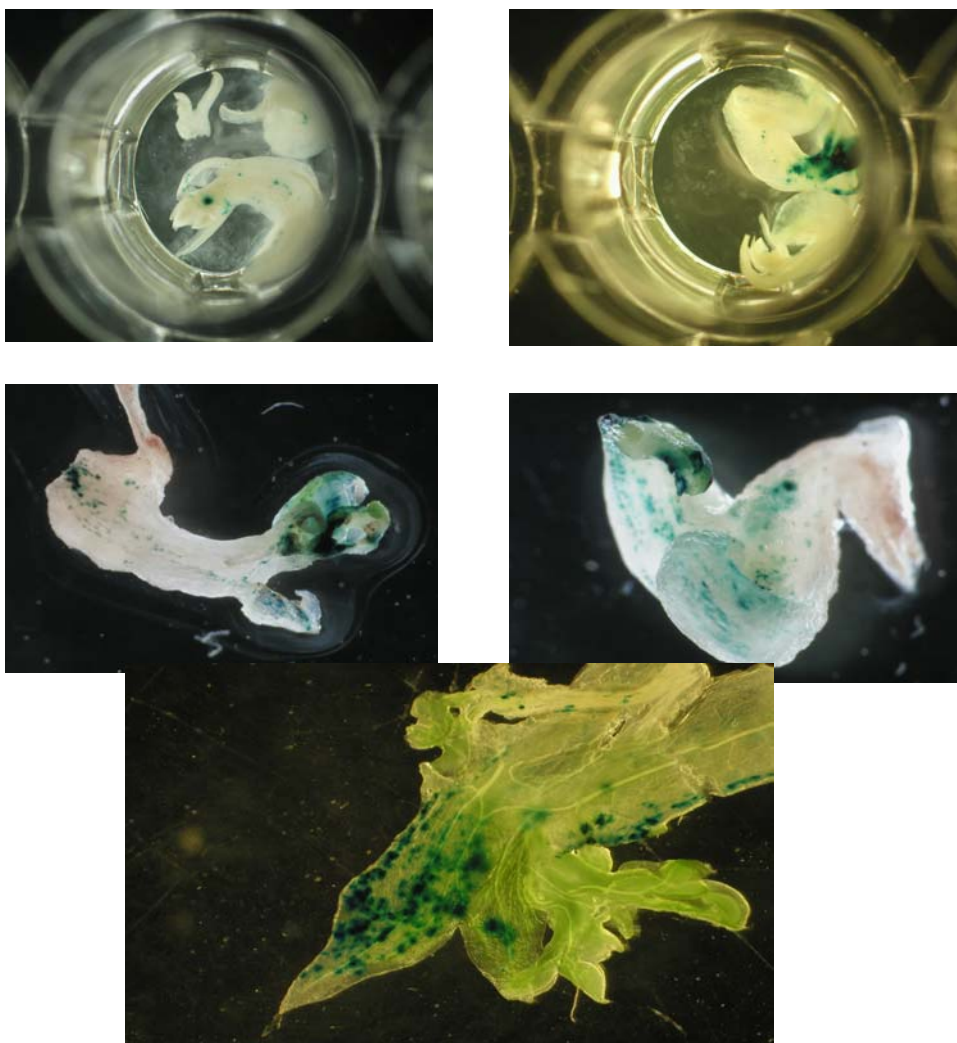
Srovnány byly dvě varianty.

a) Varianta bez DTT.

b) Varianta s 0,5 mM DTT.

Obr. 2. Histochemický GUS test provedený na listu regenerovaného prýtku po 3-týdenní kokultivaci na P1 mediu s Augmentinem o koncentraci 300 mg/l

b)



Původní metodika byla modifikována o dvoudenní regeneraci na kultivačním mediu P1 s 1 mM DTT. Modifikace se prokázala zlepšenou regenerací řezů. Z thiolových sloučenin byl dále použit L-cystein v koncentraci 3,3 mM a 1 mM thiosíran sodný.

DTT se prokázal výbornou regenerací řezů a velkým množstvím detekovatelných modrých sektorů.

Thiosíran sodný má nižší regeneraci řezů a detekovatelnost modrých sektorů je srovnatelná s metodou bez použití thiolových sloučenin.

L-cystein se prokázal špatnou regenerací řezů a výskyt modrých sektorů na řezu byl nepatrný.

ZÁVĚR

Na základě zvýšení exprese reportérového genu GUS v transformovaných rostlinách hrachu byl prokázán pozitivní vliv DTT na účinnost transformace. Výrazný vliv na expresi reportérového genu GUS měla dále regenerace embryonálních řezů hrachu na kultivačním mediu, kdy řezy po přepasážování na médium s phosphinothricinem prokázaly i lepší životnost.

POUŽITÁ LITERATURA:

Schroder et al 1993: Transformation and regeneration of two cultivars of Pea. *Plant. Physiol.* 101: 751-757.

Orczyk Anna and Waclaw 2000: Study of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of Pea. *Molecular Breeding* 6: 185-194

Olhoft and Somers 2001: The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Genetic transformation and hybridization*

Olhoft P, Flagel L, Somers D, (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216: 723-735

Poděkování

Príspevek vznikl za podpory projektů FRVŠ 176/2004 a NAZV QF3072.