

**MOLECULAR AND NON-MOLECULAR APPROACHES  
TO CREATING MARKER-FREE TRANSGENIC WHEAT  
(*Triticum aestivum* L.)**

A dissertation submitted to the:  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ETH), ZÜRICH**

For the degree of:  
**DOCTOR OF NATURAL SCIENCES**

Presented by:  
**CLAIRE A. MILLS**

BSc.(HONS.) ENVIRONMENTAL SCIENCE  
UNIVERSITY OF THE WEST OF ENGLAND, BRISTOL, UK  
MSc. ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY  
UNIVERSITY OF THE WEST OF ENGLAND, BRISTOL, UK

Born:  
11<sup>TH</sup> OF MARCH 1974

Citizen of:  
THE UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND.

Accepted upon the Recommendation of:

**PD. DR. C. SAUTTER - EXAMINER  
PROF. DR. P. STAMP - CO-EXAMINER**

29<sup>th</sup> of May 2000

## ABSTRACT

Wheat is one of the most important crop plants in the world. Over centuries the effort towards improving this cereal has been great. The technology of gene transfer can contribute considerably towards the many goals of wheat improvement. However, in employing gene transfer techniques, genetically modified plant selection has become a necessity of this technology. Marker genes used for selection, however, are no longer required after laboratory usage and are therefore dispensable.

This study aims to investigate possibilities to create marker-free transgenic wheat plants. Two model systems are proposed. The first system, involving a non-molecular, cellular approach, aims to control the entry of required genes into each transformed cell, by micro-injecting the genes into zygotes. The wheat ovary, was studied morphologically, to optimise the developmental stage and technique for zygote isolation. Isolation was established, in Kao 90 media, containing an osmolarity of 370 mOsmol kg H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>, with the model variety Bobwhite, and Swiss field varieties, Frisal, Griena and Golin. A co-cultivation system was investigated for first division and regeneration of the zygote, using either a rice cell suspension culture, or a wheat microspore culture. Division of the zygote was not reproducible and full regeneration was not achieved. Additionally, we became aware of data showing a vast majority of integration events only contained incomplete fragments. This made the system inadequate, not only with respect to the regeneration, but also the gene transfer.

The second system, involves a molecular approach. Transposable elements are used to excise the marker-gene after its experimental requirement has expired. The maize Ac/Ds transposon family was studied for marker-gene excision, using the *Ac* gene encoding for the Activator Transposase protein, and 2 minimal Dissociation elements, to flank the 5' and 3' termini of the marker gene cassette. A system was developed in order to positively determine absence of the selectable marker gene. Male sterility, more specifically the rice pT72 tapetum specific promoter fused to the *Barnase* gene, was employed. A dissociation construct was created and transferred to the immature embryo and suspension cultures of the model cereal rice. In parallel the *Ac* gene was transferred

to separate rice lines. At sexual maturity, of the T<sub>0</sub> generation where the Ds line would exhibit male sterility, the lines would be crossed to instigate the excision of the Ds elements and the enclosed expression cassette, restoring fertility in the T<sub>1</sub> generation. In addition, a transient construct was created, using the Ds elements separated by the Wheat Dwarf Virus bi-directional terminator, to interrupt a Ubiquitin:*Uida* expression cassette. This construct was co-bombarded with the *Ac* gene, and two genes, *Cl* and *Bperu*, encoding for transcription activators of the anthocyanin biosynthesis pathway. All genes were targeted to wheat immature embryos. The *Cl* and *Bperu* genes served as positive gene transfer controls. Restoration of the *Uida* expression cassette, and subsequent GUS expression, was not observed. Callus DNA PCR with Ubiquitin:*Ac* annealing primers showed the construct was present in transient. Transcriptional analysis showed *Ac* transcription using PCR on the cDNA. A preliminary Western blot did yet not show the presence of the *Ac* Transposase in transient.

An additional study was included on the storage of rice pollen to facilitate artificial pollination of the Ds lines, with the *Ac* lines at differing developmental stages. A basal pollen germination medium was demonstrated, and viability data collated on pollen storage at differing sub-zero temperatures, using a combination of Fluorescent Diacetate staining and germination rates. Storage at -20 °C and -80 °C proved closest to that of fresh material with a germination viability value of approaching 40%.

The molecular approach to creating marker free transgenic wheat has introduced an innovative model system with potential.

## ZUSAMMENFASSUNG

Weizen ist weltweit eine der wichtigsten Nutzpflanzen. Über die Jahrhunderte hat man dieses Getreide genetisch ständig verbessert. Die Technologie der Genübertragung besitzt das Potenzial erheblich zur weiteren Verbesserung des Weizens beizutragen. Dazu ist aber die Selektion der transgenen Pflanzen eine Grundvoraussetzung. Zur Selektion bedarf es der Markergene, die aber später in den transgenen Pflanzen überflüssig und unerwünscht sind. Wir haben die Möglichkeiten studiert, transgenen aber Markergen-freien Weizen zu erzeugen. Zwei Ansätze wurden verfolgt, ein molekularer und ein nicht-molekularer.

Der erste nicht-molekulare, zelluläre Ansatz hatte die kontrollierte Aufnahme der gewünschten Gene durch Mikroinjektion in die Zygoten zum Ziel. Wir studierten zunächst die Morphologie der Weizenfruchtknoten, um die Technik der Zygotenisolation vom geeignetsten Entwicklungsstadium zu optimieren. Die Isolation wurde etabliert und war am besten in Kao 90 Medium bei einer Osmolariät von 370 mOsmol kgH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup> mit der Modellsorte Bobwhite, und den Schweizer Feldsorten Frisal, Griena und Golin. Für die erste Teilung und die Regeneration der Zygoten wurde eine Helfer-Kultur eingesetzt, die entweder aus einer Suspension von Reiszellen oder einer Weizenmikrosporen-Kultur bestanden. Die Teilung der Zygoten war jedoch nicht reproduzierbar, und eine volle Regeneration fand überhaupt nicht statt. Daten über die Integration mikroinjizierter fremder DNA in Zygoten haben gezeigt, dass bei der überwiegenden Mehrzahl der Transformationsereignisse nur unvollständige Kopien eingebaut wurden. Das macht den nicht-molekularen Ansatz zusätzlich zu der mangelhaften Regeneration noch unattraktiver.

Bei dem zweiten, molekularen System wurden Transposonelemente studiert, ob sie Markergene nach deren Gebrauch wieder zu entfernen vermögen. Die Ac/Ds Familie der Maispflanzen wurde zum Ausschneiden von Markergenen benutzt. Verwendet wurde das Activator-Transposase-Protein-kodierende Ac Gen, sowie 2 minimale Dissoziations-elemente, um die 5' und 3' Enden der Marker-Gen-kassette zu markieren. Wir haben ein System entwickelt zur positiven Bestimmung der Abwesenheit von

Genen. Zu diesem Zweck wurde der Reis T72 Tapetum spezifische Promoter an das *Barnase* Gen fusioniert als Marker gewählt, der männliche Sterilität erzeugt. Ein

Dissoziationskonstrukt wurde in Reis als Modellpflanze übertragen, entweder in unreife Embryonen oder in Suspensionskulturen. Parallel dazu wurde das Ac Gen in getrennte Zelllinien integriert. Zur sexuellen Reife der T<sub>0</sub> Generation, wo die Ds Linie männlich steril wäre, sollen die Linien gekreuzt werden, um das Ausschneiden der Ds Elemente und des dazwischen liegenden Genkonstrukts für männliche Sterilität zu ermöglichen. Damit würde die Fruchtbarkeit des Pollens in der T<sub>1</sub> Generation wieder hergestellt.

Zusätzlich wurde ein Konstrukt für transiente Studien geschaffen, bei dem die Ds Elemente verwendet wurden, getrennt durch den Weizen Dwarf Virus bi-directional Terminator, um eine Ubiquitin:*Uida* Expressionskassette zu unterbrechen. Dieses Konstrukt sollte anschliessend mit dem Ac Gen zusammen auf unreife Weizenembryonen bombardiert werden. Die Wiederherstellung der UidA Expressionskassette und die darauffolgende GUS Expression konnte allerdings nicht beobachtet werden. Die beiden Mais-Gene C1 und Bperu kodieren für Transkriptionsaktivatoren der Anthocyan synthese und dienten als Kontrolle für den Transformationserfolg. PCR Analyse der Kalli mit Ubiquitin:*Ac* spezifischen Primern zeigte transiente Anwesenheit des Konstruktes, und eine Transkriptionsanalyse durch RT-PCR Amplifizierung von cDNA bestätigte die Transkription des *Ac* Gens. Ein erster Western Blot konnte noch keine transiente Anwesenheit der *Ac* Transposase nachweisen.

Wir testeten ausserdem die Lagerung von Reispollen für die künstliche Befruchtung der Ds Linien mit den Ac Linien falls diese in verschiedenen Entwicklungsstadien wären. Ein Grundmedium für das Keimen von Pollen wird beschrieben. Überlebensdaten der Pollenlagerung bei verschiedenen Temperaturen unter dem Nullpunkt wurden aufgrund einer Fluoreszein Diazetat Färbung und den Keimraten bestimmt. Lagerung zwischen -10 °C und -80 °C zeigte die besten Ergebnisse im Vergleich zu frischem Material, mit einer Keimrate von annähernd 40%.

Das molekulare Modellsystem hat das Potenzial für eine neue Methode, Marker-freie transgene Weizenpflanzen zu erzeugen.