

# TRANSGEENSETE JUURTE MOODUSTUMINE KARTULI EKSPLANTAATIDEL

J. Lokk, R. Vardja, T. Vardja, A. Pae

Kõrvuti klassikaliste sordiaretusmeetoditega on viimastel aastakümnetel kasutusele võetud meetodid, mille varal on võimalik aretatavasse taime viia vajalikku tunnust kodeerivaid võõrgeene. Vektorina kasutatakse kas bioloogilisi objekte – baktereid – või füüsikalisi meetodeid.

Võõrgeenide bioloogiliste ülekandjatena kasutatakse enamikus kahte patogeenset bakterit – *Agrobacterium tumefaciens*'i ja *A. rhizogenes*'t. Esimene bakter kutsus esile kalluste moodustumise nakatunud kudedel, teine transgeensete, nn. karvjuurte tekke. Kummastki kasvajatüübist võib regenereerida taimed, mis kannavad endas bakteri T-DNA-d. Kalluste taolisest kasvajast saadakse tihti kimäärsed taimed, st. taimed, milles osa rakke kannab bakteri T-DNA-d ja on seega transgeensed, teine osa rakke ei ole transgeensed. Põhjus on selles, et transgeensed kiiresti paljunevad rakud avaldavad oma metaboliitide kaudu toimet ka kõrvalasuvatele normaalsetele rakkudele ja need hakkavad kiiresti paljunema (Hänisch ten Cate, Sree Ramulu, 1987; Christey, 1997).

Karvjuur kasvab koe nakatamisel *A. rhizogenes*'ega välja ühest rakust. Karvjuure rakud kaotavad kontakti normaalsete rakkudega. Seetõttu ei ole karvjuured kimäärsed ja kindlast karvjuurekloonist regenereeritud taimed on suhteliselt ühesuguste omadustega (Christey, 1997).

EBI organkultuuride laboris püütakse leida võimalusi transgeensete kartulisortide saamiseks, kasutades vektorina *Agrobacterium rhizogenes*'t. Eri uurijate tööd näitavad, et kaugeltki ei ole veel selged transgeensete juurte endi saamise moodused.

## Materjal ja meetodika

Karvjuurte tekitamiseks kasutati *A. rhizogenes*'e agropiintüve 9402 (plasmiid pRi 1855), milles esineb kaks iseseisvat T-DNA-d. TL-DNA kodeerib karvjuurte fenotüüpi ja kasvuainete autotroofiat, TR-DNA agropiini ja mannopiini sünteesi. Bakterit hoiti YMB söötmel (Mugnier, 1988) +25 °C juures pimedas. Bakterikultuur säilitati –10 °C juures külmutis. Transformeerimiseks kasutati YMB vedelsöötmel 26 °C juures loksutil kasvatatud bakterisuspensiooni, mis lahjendati MS (Murashige, Skoog, 1962) vedelas toitesegus. Lahjendatud bakterisuspensioonis loksutati lehe või võrseeksplantaate 30 minutit. Seejärel eksplantaadid kuivatati steriilsel filterpaberil ja asetati MS+Claforan toitesöötmetele ning kultiveeriti valgustatud fütotronis.

Igalt karvjuuri moodustanud eksplantaadilt valiti välja kõige kiiremini kasvav juurekloon. Juurekloonid kultiveeriti MS vedelal Claforaniga (200 mg/l) söötmel vähemalt 6 järjestikuse ümberistutuse jooksul (kolme nädala tagant). Bakteri olemasolu karvjuurekloonides kontrolliti karvjuure kultiveerimisega YMB söötmel.

Juuri, nii transgeenseid kui ka mittetransgeenseid (kontroll), kasvatati vedelal MS söötmel rotatsioonloksutil (90 pööret minutis) +25 °C juures.

Transformatsiooniks kasutati nelja nädala vanuste taimede lehe- ja võrse sõlmevahede eksplantaate. Karvjuured indutseeriti kümnel kartulisordil. Kartulitaimed kasvatati steriilselt MS ilma kasvuaineteta söötmel fütotronis 16-tunnise päevapikkuse 21±1 °C juures. Valgustugevus fütotronis oli 1000 luksit.

## Katsetulemused

Vanusekatse kasutasime kartulisorti 'Sarme', mis oli katseklassis kasvanud viis nädalat ning moodustanud 7–8 sõlmevahet. Kõige noorema sõlmevahelõigu eraldasime taime ülemisest sõlmevahest, keskmise vanusega lõigu saime 3...4 sõlmevahest ning kõige vanem lõik oli taime alumine sõlmevahe. Katsetulemustest selgus, et kõige paremini nakatusid ülemised e. kõige nooremad sõlmevahelõigud, 30st eksplantaadist nakatusid 28 lõiku (93,3%). Väikseim juurte moodustumise protsent, vaid 33,3, oli kõige vanematel sõlmevahelõikudel. Kolmekümnest keskmisest võrselõigust nakatus kaksikümmend (66,7%). Vanusekatse tulemused näitasid selgelt, et taimede nakatamisel *Agrobacterium rhizogenes*'ega tuleks arvesse võtta ka eraldatava taimeeksplantaadi vanust (tabel 1). Nakatamise efektiivsuse parandamiseks tuleks eelistada nooremaid sõlmevahelõikusid. Oletatakse, et selle põhjuseks on suurem kasvuainete, eriti auksiinide sünteesi intensiivsus nooremates kudedes (Vries-Uijtewaal jt., 1989).

**Tabel 1.** Karvjuurte moodustumine sordi 'Sarme' sõlmevaheeksplantaatidel olenevalt eksplantaadi vanusest

**Table 1.** Formation of hairy roots on internode explants (cv. 'Sarme') depending of explant age

Sõlmevahe / Internode	E/N	Juurte moodustumise % Root formation %
Ülemine / Upper	30/28	93,3
Keskmine / Middle	30/20	66,7
Alumine / Lower	30/10	33,3

Kartuli sõlmevahelõikude nakatuskatses oli 9 kartulisorti ning lehe nakatuskatses 10 kartulisorti. Kontrollvõrseid ja -lehti, mida ei nakatatud, oli kummaski katses igast sordist 30. Taime nakatumise fenotüübiliseks näitajaks on rohke juurestiku moodustumine ja tema piiramatult kasv. Vastavalt sellele loendasime katses nakatunud taimede arvu ja grupeerisime ühel eksplantaadil tekkinud juurte arvu nelja gruppi.

Üldiselt nakatusid kartuli lehed paremini kui võrsed. Nakatamata e. kontroll-lehtede juurte moodustumise sagedus oli samuti kõrgem kui nakatamata võrsete puhul. Kõrge juurte moodustamise protsent kontroll-lehtedel oli sordil 'Sarme' ja *Solanum andigenum*'il ('Sarme' 96,7%, *Solanum andigenum* 76,7%). Kontrollvõrsetest ainukesena tekkisid juured samuti sordil 'Sarme'. Kontroll-lehtede juurte arv sordil 'Sarme' oli kõige suurem vahemikus 5–10 juurt ning 4 lehel oli juuri tekkinud rohkem kui 20. See viitab sordi 'Sarme' genotüübi heale juurtemoodustumisvõimele. Juured tekkisid veel vähesel määral kontroll-lehtedel sortidel 'Agra' (26%), ja 'Jõgeva kollane'(3,3%). Juurte arv ühe eksplantaadi kohta oli neil sortidel alla 5. Ülejäänud nakatamata lehtedel ja võrsetel juuri ei tekkinud.

**Table 2.** Karvjuurte moodustumine kartuli leheeksplantaatidel (E=eksplantaatide arv, N=nakatunud eksplantaadid, J=juuri moodustanud eksplantaadid)

**Table 2.** Root formation on potato leaf explants (E=number of explants, N=infected explants, J=root forming explants)

Sort Cultivar	Nakatatud / Inoculated						Nakatamata / Non-inoculated				
	E/N	Juurte moodustumise % Root formation %	Juurte arv Number of roots				E/J	Juurte moodustumise % Root formation %	Juurte arv Number of roots		
			<5	5-10	10-20	>20			<5	5-10	>20
'Mats'	30/11	36,7	10	1	0	0	30/0	0	0	0	0
'Vigri'	30/27	90	20	7	0	0	30/0	0	0	0	0
'Agra'	30/28	93,3	3	7	14	4	30/8	36	9	0	0
'J. kollane'	30/27	90	8	2	17	0	30/1	3,3	1	0	0
'Ants'	30/28	93,3	2	9	17	0	30/0	0	0	0	0
'Congo'	30/18	60	6	0	12	0	30/0	0	0	0	0
'Sulev'	30/29	96,7	1	2	26	0	30/0	0	0	0	0
'Sarme'	30/30	100	0	0	13	17	30/29	96,7	9	16	4
'Ando'	39/25	83,3	18	2	5	0	30/0	0	0	0	0
<i>Solanum andigenum</i>	30/30	100	2	6	21	1	30/23	76,7	11	10	1

Kõige rohkem erineb nakatumise protsent lehtede ja võrsete vahel sortidel 'Agra' (võrsed 3,3%; lehed 93,3%) ja 'Vigri' (sõlmevahed 6,7%; lehed 90%). Madal võrsete nakatumise protsent oli samuti sortidel 'Ants' (23,3%), 'Jõgeva kollane' (13,3%) ja 'Sulev' (40%) (tabelid 2 ja 3). Kõigi nende sortide leheeksplantaadid nakatusid aga ligikaudu 90% ja üle selle. Eelnimetatud sortide juurte arvilised tulemused on kõige suuremad grupis 10–20 juurt. Ühtlase tulemuse nii sõlmevahede kui ka lehtede nakatamisel andis sort 'Congo' (võrsed 50%; lehed 60%). Sort 'Mats', mis ei nakatunud võrsete puhul üldse ning mille lehtede nakatamisel oli juurte moodustumise sagedus kõige madalam (vaid 36,7%), võib lugeda üheks näiteks, kus nakatumine sõltub eelkõige nii sordi genotüübist kui ka kasutatud eksplantaadist. Sordil 'Mats' tekkinud juurte arvu näitaja viitab samuti madalale nakatumisvõimele (10 leheeksplantaadil tekkis alla 5 juure ning vaid ühel lehel oli juurte arv 5–10 juure vahel). Sordil 'Vigri', mis nakatus lehtede korral 90%, olid juurte arvilised näitajad siiski madalad (alla 5 juure tekkis 20 leheeksplantaadil ning 5–10 juurt 7 lehel).

Enamikus kasutatakse nakatamiseks kartulitaime eksplantaatidena just pungata sõlmevahelõike (Dobigny *et al.*, 1995, 1996). Nagu eelnevast selgub, ei pruugi kõikide kartulisortide juures karvjuuri sõlmevahelõikudest saada, kuid sõlmevahelõikude kasutamine karvjuurte saamiseks on tunduvalt ökonoomsem kui leheeksplantaatide kasutamisel. Enamikul kartulisortidest ei moodustu nakatamata sõlmevahelõikude eksplantaatidel juuri (tabel 2), mille tõttu väheneb juure transgeensuse kontrolli vajadus. Sordil 'Mats' moodustunud karvjuured kasvasid võrreldes teistel sortidel moodustunud karvjuurtega väga kehvalt.

Katseandmete põhjal võib järeldada, et kartulisortide nakatumine *Agrobacterium rhizogenes*'ega sõltub taime genotüübist, taime vanusest ja eksplantaadist (kas on tegemist lehe või sõlmevahelõiguga). Sordid, mis olid hästi nakatunud, andsid ka ühe eksplantaadi kohta rohkem karvjuuri. Ka karvjuurte pikkus oli suurem neil kartulisortidel, mille juurte moodustumise protsent ja juurte arvu näitajad olid suuremad (karvjuurte pikkusandmed on siinses töös välja toomata).

Praeguseks on regenereeritud karvjuurtest esimesed transgeensed kartulitaimed sortidest 'Sarme' ja 'Congo'. Karvjuuri regenereeriti MS söötmel, kuhu oli lisatud taime kasvuhormoone ja erineva kontsentratsiooniga sahharoosi.

**Tabel 3.** Karvjuurte moodustumine kartuli sõlmevaheeksplantaatidel (E=eksplantaatide arv, N=nakatunud eksplantaadid, J=juurdunud eksplantaadid)

**Table 3.** Root formation on potato stem internode explants (E=number of explants, N=infected explants, J=root forming explants)

Sort <i>Cultivar</i>	Nakatatud / <i>Inoculated</i>					Nakatamata / <i>Non-inoculated</i>		
	E/N	Juurte moodus- tumise % <i>Root formation %</i>	Juurte arv <i>Number of roots</i>			E/J	Juurte moodustu- mise % <i>Root formation %</i>	Juurte arv <i>Number of roots</i>
			<5	5-10	>20			
'Mats'	30/0	0	0	0	0	30/0	0	0
'Vigri'	30/2	6,7	2	0	0	30/0	0	0
'Agra'	30/1	3,3	1	0	0	30/0	0	0
'Jõgeva kollane'	30/4	13,3	4	0	0	30/0	0	0
'Olev'	30/15	50	5	10	0	30/0	0	0
'Ants'	30/7	23,3	6	1	0	30/0	0	0
'Congo'	30/15	50	8	6	1	30/0	0	0
'Sulev'	30/12	40	4	8	0	30/0	0	0
'Sarme'	30/20	66,7	0	15	5	30/6	20	2

## Kirjandus

- Christey M. C. Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. In: Hairy Roots. P.M. Doran (ed.). Harwood Academic Publishers, Netherlands, 99–112, 1997.
- Dobigny A., Ambroise A., Haicour R., David C., Rossignol L., Sihachkar D. Transformation of potato using mannopine and cucumopine strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 40: 225–230, 1995.
- Dobigny A., Tizroutine S., Gaisne C., Haicour R., Rossignol R., Ducreuse G., Shachake, D. Direct regeneration of transformed plants from stem fragments of potato inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 45: 115–121, 1996.
- Hänisch ten Cate C. H., Sree Ramulu K. Callus growth tumor development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar Bintje. *Plant Sci.*, 49: 209–216, 1987.
- Mugnier J. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, 7: 9–12, 1988.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473–497, 1962.

Vries-Uijtewaal E., Glissen L. J. W., Filipse E., Sree Ramulu K., Stickema W. J., Groot B. Fate of introduced genetic markers in transformed root clones and regenerated plants of monohaploid and diploid potato genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 183–193, 1989.

**Tänuavaldus**

Autorid tänavad dr. J. D. Hamilli ja M. J. C. Rhodest põllumajanduse ja toiduainete instituudist (AFRC Institute of Food Research, Norwich Laboratory, England) *A. rhizogenes*'e tüve LBA 9402 eest.

Käesolev töö on teostatud Eesti Teadusfondi granti nr. 3518 toetusel

## **Formation of Transgenic Roots on Potato Explants**

J. Lokk, R. Vardja, T. Vardja, A. Pae

### Summary

The induction of transgenic roots depends on the type of potato cultivars, and the type and age of explants used for inoculation with *A. rhizogenes*. Thus the stem internode of cv. 'Mats' did not produce hairy roots. Unusually stem and leaf explants of some potato cultivars gave normal roots.