

TRANSGEENSETE JA MITTETRANSGEENSETE JUURTE JA TAIMEDE VÕRDLUS *IN VITRO*

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

Agrobacterium rhizogenes'e abil saadud transgeensete ja mittetransgeensete kudede eristamiseks kasutatakse meetodeid, mis põhinevad kas bakteri T-DNA otsesel määramisel nakatatud taime genoomis, bakteri abil taime viidud märk- või selektiivste geenide (GUS-geen, antibiootikumi- või herbitsiidiresistentsusgeen jne.) või bakteri T-DNA poolt indutseeritud ühendite (opiinid) tuvastamisel nakatatud koes (Petit jt., 1983; Hamill, Lidgett, 1996). Need meetodid nõuavad märkimisväärset aparatuuri.

Juba esimestes töödes, kui *A. rhizogenes*'ega saadi transgeensed nn. karvjuured, täheldati, et erinevalt tavalistest juurtest on nad võimelised kasvama kasvuaineteta söötmetel. Karvjuurtel oli tunduvalt intensiivsem kasv kui harilikel juurtel. Et neil on vähenenud apikaalne domineerimine, siis on karvjuured tavaliselt tugevalt hargnenud. Tihti puudub neil positiivne geotropism jne. (Ackermann, 1977; Tepfer, 1983). Kõiki neid tunnuseid võib lugeda juurte transgeensuse indikaatoreiks.

Karvjuurtest regenereerunud taimed on lühenenud sõlmevahedega ja kurruliste lehtedega. Lisaks ilmnevad neil hilisemates kasvufaasides muutused ka õite morfoloogias ja viljumises (Nilsson, Olsson, 1997).

Materjal ja meetodika

Karvjuurte indutseerimiseks kasutati *A. rhizogenes*'e tüve LBA 9402. *Solanum tuberosum*'i (16 sorti) karvjuurte saamiseks nakatati bakterisuspensiooniga steriilsete taimede lehe- või sõlmevahelõikude eksplantaadid. *Fagopyrum esculentum*'il, *Hyoscyamus niger*'il ja *Armoracia rusticana*'l nakatati leheeksplantaadid (Vardja, Lokk, 1999). *Aktinidia kolomicta* ja *Malus pumila* (õunapuu pookealus M-26) karvjuurte saamiseks eelnev meetod ei sobinud – lehe- või võsueksplantaadid kärbusid söötmetel. Selle tõttu nakatati steriilseid katseklaasitaimi haavates bakterisuspensiooni kastetud kääridega tipulehte või võsu tipuosa. Vigastuskohast kasvavad juured välja kahe kuni kolme nädalaga.

Edasisteks katseteks valiti igalt eksplantaadilt üks kõige kiiremini kasvav juur. Saadud juurekloone ja mittetransgeensid juuri kasvatati ilma kasvuaineteta söötmetel 300 ml-s koonilistes kolbides rotatsioonloksutil (90 pööret/min.), pimedas fütotronis temperatuuril +25 °C.

Juurte kasvukatseteks ja morfoloogia jälgimiseks pandi igasse kasvuanumasse üks 3 cm (kuivkaal ca 0,3–0,5 mg) pikkune juuretippuga lõik (kartul) või neli (ca 1–1,5 mg) samasugust juurelõiku (koerapöörirohi).

Kartuli karvjuurtest regenereeriti taimed MS söötmel, millesse oli lisatud 1 mg/l bensüüladeniini, 1 mg/l indolülülvõihapet ja 10 mg/l gibberelliini (Vardja jt., 1999).

Katsetulemused

Juurte morfoloogia.

Väliskujult erinevad karvjuured tavalistest juurtest silmanähtavalt. Nad on harilikest juurtest märgatavalt jämedamad ja hargnenud. Hargnemine on monopodiaalne ja juur meenutab kuuseoksa. Harilikud juured ei hargne või kui hargnevad, siis on hargnemine korrapäratu (joonis 1).

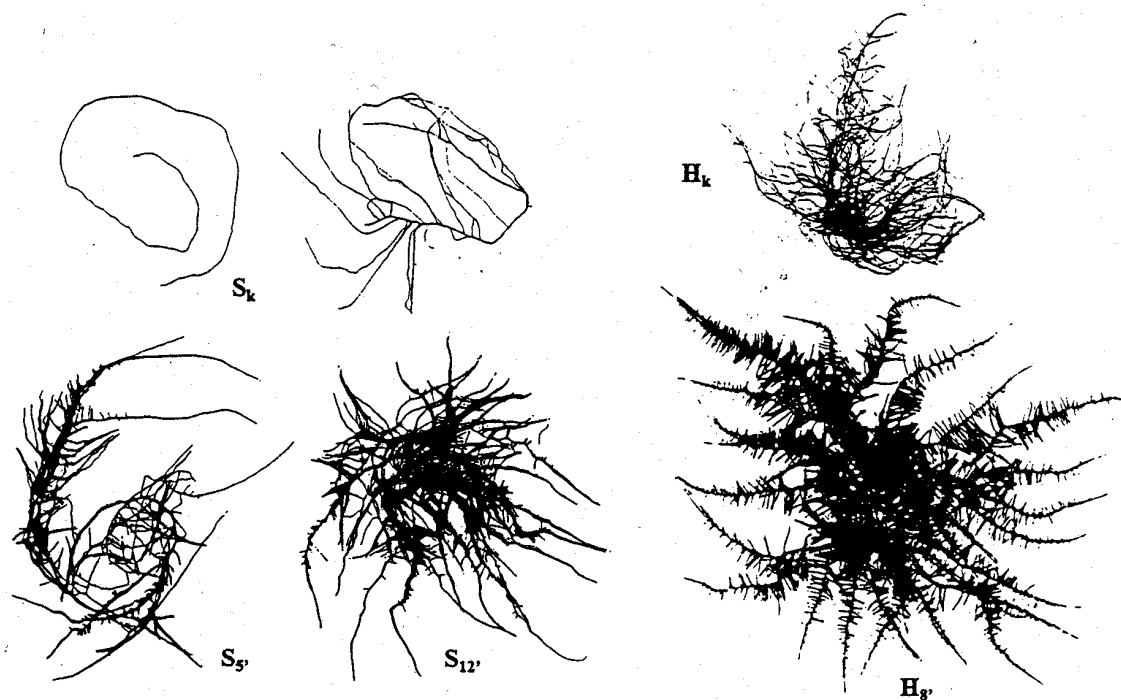
Juurte kasv (kuivkaal).

Kõikide uuritud taimede karvjuurte kasv oli tunduvalt suurem kui harilikel juurtel. Südajalehise aktiniidia, õunapuualuse M-26 ja tatra karvjuured ei kasvanud ilma kasvuaineteta söötmetel. Kartuli harilikud juured küll kasvavad ilma kasvuaineteta MS söötmetel, kuid nende juurdekasv on väga väike. Kartuli karvjuurte kasv sõltub eelkõige juurekloonist, kuid võib arvata, et ka emataime genotüübist (joonis 2).

Tunduvalt paremini kasvavad kasvuaineteta söötmetel koerapöörirohu harilikud juured, mille tõttu neid on võimalik kasutada troopaalkaloidide tootmiseks (Pudersell jt., 1998). Olenemata aga koerapöörirohu harilike juurte suhteliselt heast kasvust kasvuaineteta söötmetel, ületab karvjuurekloonide kasv seda tunduvalt (joonis 2).

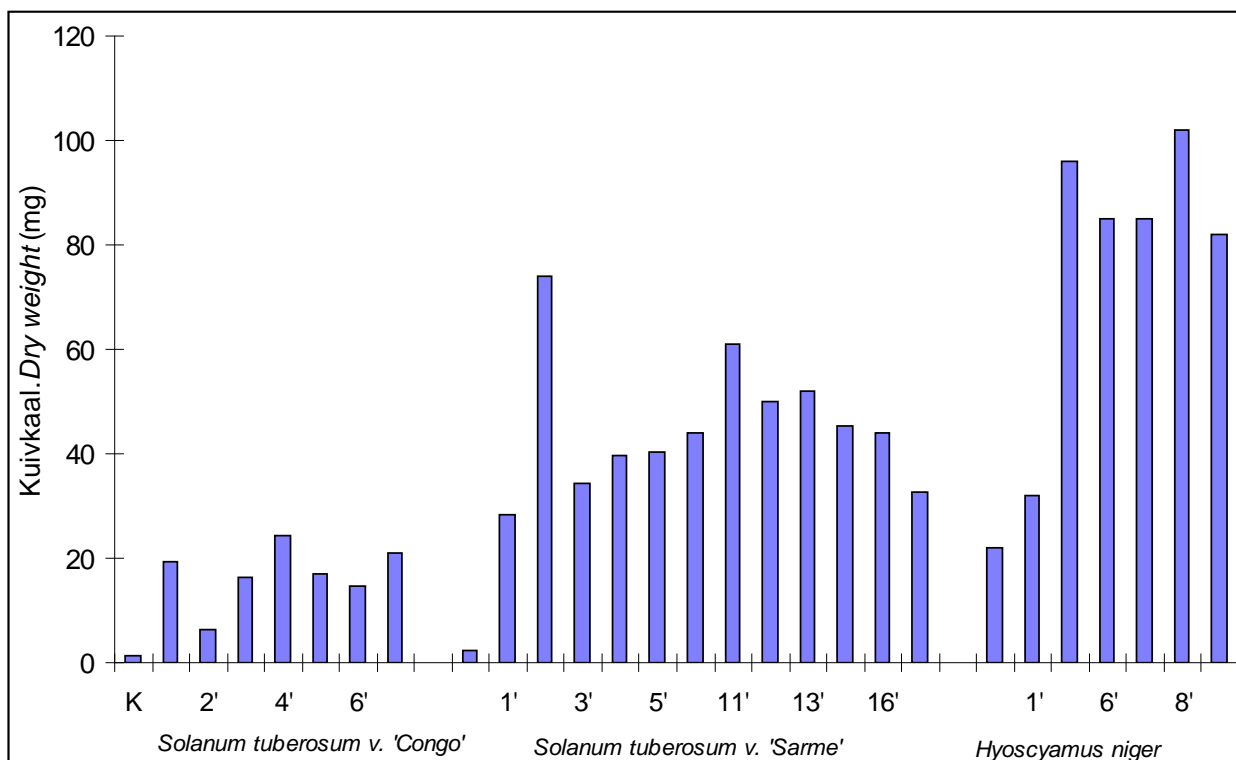
Katseklaasitaimede haabitus.

Katseklaasis kasvavate transgeensete taimede fenotüüp võib erineda (joonis 3, C) või olla küllaltki sarnane emataimega (joonis 3 B), kuid kõikide Ri-transgeensete taimede iseloomulikuks tunnuseks võrreldes mittetransgeensete taimedega on tunduvalt tugevam juurte kasv (joonis 3). Kartuli transgeensetel taimedel täheldatakse sageli juba katseklaasis liitlehtede moodustumist. Mittetransgeensetel kartulitaimedel ei ole seda kunagi täheldatud (Vries-Uijtewaal *et al.*, 1989).



Joonis 1. Kontaktkoopid (1/2) *Solanum tuberosum* v. 'Sarme' harilikest juurtest (S_k) ja karvjuurekloonidest (S_5, S_{12}) ning *Hyoscyamus niger* harilikust juurest (H_k) ja karvjuurekloonist (H_8).

Figure 1. Imprints of *Solanum tuberosum* cv 'Sarme' and *Hyoscyamus niger* non transformed roots (S_k, H_k) and hairy root lines (S_5, S_{12}, H_8)

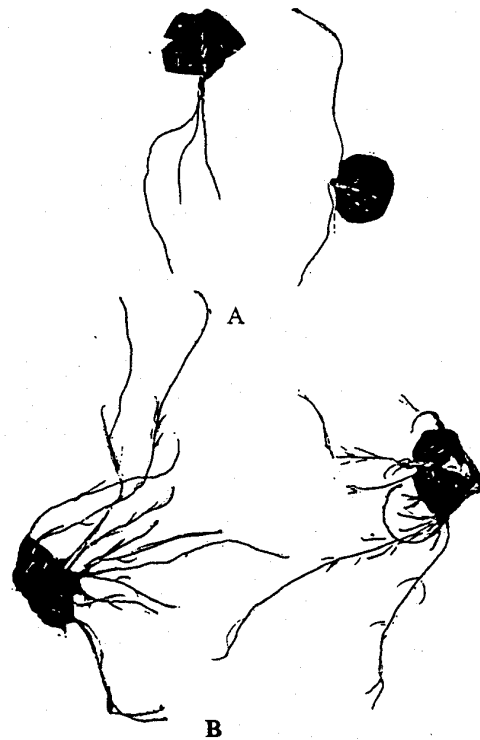


Joonis 2. *Solanum tuberosum*'i ja *Hyoscyamus niger*'i harilike (K) ja karvjuurte kuivkaalud pärast 3 ('Sarme') või 4 ('Congo' ja *H. niger*) nädalat kasvuaineteta söötmel

Figure 2. Dry weight of *Solanum tuberosum* and *Hyoscyamus niger* nontransformed (K) and transformed roots after 3 ('Sarme') or 4 ('Congo' and *H. niger*) weeks in hormone-free liquid MS medium



Joonis 3. *Solanum tuberosum* v. 'Sulev' mitte-transgeenne taim(A) ja transgeensed taimed (B,C).
Figure 3. Non transgenic plant (A) and transgenic plants (B;C) of *Solanum tuberosum* cv.'Sulev'.



Joonis 4. Mittetransgeense (A) *S. tuberosum* v. 'Sarme' ja transgeense taim (B) leheeksplantaatide risogenees.
Figure 4. Rhizogenesis of 'Sarme' leaf explants of non transgenic plant (A) and transgenic plant (B).

Transgeense ja mittetransgeense taimede lehe organogeneesi iseärasused.

Transgeensed ja mittetransgeensed taimed erinevad järevalt juurte moodustumise poolest leheeksplantaatidel.

Mõnede kartulisortide mittetransgeensete taimede leheeksplantaadid moodustavad juuri ka ilma *A. rhizogenes*'ega nakatamist (Vardja, Lökk, 1999). Transgeensete kartulitaimede leheeksplantaadid moodustavad juuri olenemata sellest, kas emasordi eksplantaat seda teeb või mitte. Kõige olulisem on aga nähtus, et mittetransgeense taimede leht moodustab juuri ainult lehevarre otsast või lehe alumise poole keskroo lõikekohast. Lehe ülemine pool moodustab juuri vaid vähestel sortidel ja sedagi ainult keskroo lõikekohalt.

Transgeensete kartulitaimede leheeksplantaadid moodustavad alati juuri nii lehe alumise osa kui ka ülemise osa lõikepinnal ja seda kogu lõikepinna ulatuses (ilmselt väiksemate roodude läbilõikekohtades). Juured moodustuvad kiiresti. Juba 5.–6. päeval täheldatakse transgeense lehe eksplantaatidel nelja kuni kuut 0,5–1 cm pikkust juurt, mis kasvavad kiiresti pikemaks ja hargnevad. Mittetransgeensetel lehtedel ilmuvad juured 9.–11. päeval ja juured ei hargne (joonis 4).

Mittetransgeense mädarõika leheeksplantaadid moodustavad kergesti juuri. Moodustunud juurtel regenereeruvad 30 päevaga taimed. Kuid samasugune juurte moodustumise erinevus nagu kartulil – transgeense taimede leheeksplantaadid moodustavad juuri kogu lõikepinna ulatuses, mittetransgeense taimede leheeksplantaadid ainult keskroo lõikekohal – on täheldatav ka mädarõikal.

Kirjandus

- Ackermann, 1977. Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes* Tumoren aus *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Lett., 8, 23–30
- Hamill, D. J., Lidgett, A. J., 1996. Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. In: Doran, M. (ed), Hairy Roots: Culture and application. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1–29.
- Nilsson, O., Olsson, O., 1997. Getting to root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots. Physiol. Plant., 100: 463–473.

- Petit, A., Chantal, D., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate or opine degradation. *Mol. Gen. Genet*, 190: 204–214.
- Pudersell, K., Kiho, K., Vardja, R., Vardja, T., Raal, A., Arak, E., 1998. Söötme koostise mõju koerapöörirohu (*Hyoscyamus niger*) juurkultuuridele. *Eesti Rohuteadlane*, 3, 3–8.
- Tepfer, D., 1983. The potential uses of *Agrobacterium rhizogenes* in the genetic engineering of higher plants: nature got there first. In Lurquin, P.F., Kleinhofs, A. (eds), *Genetic engineering of eukaryotes*. Plenum Press, New York, 153–163.
- Vardja, R., Lokk, J., 1999. Võõrgeeni ülekanne kartulitaime *Agrobacterium rhizogenes*'e abil. *Kogum.: Taimekoekultuurid*, Harku, 88–103.
- Vardja, R., Vardja, T., Lokk, J., 1999. Kartuli geneetiline transformatsioon *Agrobacterium rhizogenes*'e abil. IV Ülevenemaaline taimefüsioloogide konverents, Moskva, 1: 206 (vene keeles).
- Vries-Uijtewaal, E., Gilissen, L. J. W., Flipse, E., Sree Ramulu, K., Stiekema, W. J., de Groot, B., 1989. Fate of introduced genetic markers in transformed root clones and regenerated plants of monohaploid and diploid potato genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 185–193.

Käesolev töö on teostatud Eesti Teadusfondi granti 3518 toetusel.

Comparison of Transgenic and Non Transgenic Roots and Plants *in vitro*

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

Summary

The transformed nature of the roots was confirmed by their growth rate and by branching ability. Rhizogenic capacity of leaf explants were used to distinguish transgenic plants from non-transgenic plants. Many hairy roots developed randomly from leaf segments of transgenic plants. Non transformed plants formed no or few roots, and from the main leaf veins only.