

**EESTI ODRASORTIDE SOBIVUS AGROBAKTERI VAHENDATUD
TRANSFORMATSIOONIKS**

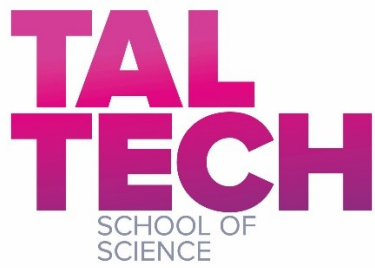
Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Liina Raudva

Juhendaja: Maria Cecilia Sarmiento Guerin, Keemia ja biotehnoloogia instituut,
vanemteadur

Kaasjuhendajad: Ljudmilla Timofejeva, Maaelu Teadmuskeskus, vanemteadur;
Liina Jakobson, Maaelu Teadmuskeskus, vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



SUITABILITY OF ESTONIAN BARLEY VARIETIES FOR AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION

Bachelor thesis

Student: Liina Raudva

Supervisor: Maria Cecilia Sarmiento Guerin, Department of Chemistry and Biotechnology, Senior
Researcher

Co-supervisors: Ljudmilla Timofejeva, Center of Estonian Rural Research and Knowledge, Senior
Researcher; Liina Jakobson, Center of Estonian Rural Research and Knowledge, Senior Researcher

Study program: Applied Chemistry, Food and Gene technology

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Liina Raudva

31.05.2023

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Maria Cecilia Sarmiento Guerin

31.05.2023

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Annotatsioon.....	3
Abstract	4
Lühendid.....	5
Sissejuhatus.....	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Taimede suunatud mutageniseerimise meetodid	8
1.2. Odra transformeerimise meetodid	9
1.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> molekulaarbioloogia töövahendina	10
1.4. Suviokra regeneratsioon ja seda mõjutavad tegurid	11
2. Bakalaureusetöö eesmärgid.....	13
3. Materjal ja meetodika	14
3.1. Taimede kasvatamine	14
3.2. Kloneerimisvektoriga plasmidi puhastamine <i>E. coli</i> bakterist.....	14
3.3. Agrobakteri GV3101 kompetensete bakterite tegemine.....	15
3.4. Elektroporatsioon.....	15
3.5. Agrobakteri transformatsiooni kontroll koloonia PCR abil	16
3.6. Embrüo eraldus	17
3.7. Odra transformatsioon.....	17
3.8. Kalluste kasvatamine ja selleks vajalikud söötmed.....	17
4. Tulemused	19
4.1. Agrobakteri GV3101 transformatsioon pICSL11059 plasmiidiga	19
4.2. Embrüogeensete kalluste induktsiooni efektiivsus.....	19
4.3. Regeneratsiooni efektiivsus	23
4.4. Regeneratsiooniaeg.....	24
5. Arutelu.....	27
6. Kokkuvõte.....	28
7. Tänuavaldused	29
8. Kasutatud kirjandus.....	30
Lisad.....	32
Lisa 1. Plasmidi pICSL11059 kaart	32
Lisa 2. Nakatamata embrüogeensete kalluste arv erinevatel söötmetel sortide võrdluses.....	33
Lisa 3. Nakatamata embrüotest saadud taimede arv kalluste ja sortide kaupa	34

Lisa 4. Nakatatud embrüote ja embrüogeensete kalluste arv erinevatel söötmetel sortide võrdluses	35
Lisa 5. Nakatamata embrüote regeneratsiooni võimekus sortide kaupa	36
Lisa 6. Nakatamata kalluste puhul taimede arv regeneratiivse kalluse kohta	37
Lisa 7. Nakatatud embrüote regeneratsiooni võimekus sortide võrdluses	38

Annotatsioon

Oder (*Hordeum vulgare*) on taimebiotehnoloogias hea teraviljade mudelorganism, kuna omab diploidset genoomi, on isetolmlev ja on lähisuguluses teiste oluliste teraviljadega nagu nisu ja rukis. Aastate jooksul on aretatud mitmeid häid Eesti odrasorte nagu 'Anni', 'Leeni', 'Maali' ja 'Tuuli'. Uute täppisaretustehnikate nagu näiteks CRISPR/Cas rakendamisel on selgunud, et Eesti odrasortide puhul *Agrobacterium tumefaciens* vahendatud transformatsioon ei õnnestu. Käesoleva töö eesmärk oli võrrelda Eestis aretatud suviadra sortide embrüogeense kalluse regeneratsiooni võimekust ja transformeerimise efektiivsust, võrreldes odra mudelsordiga 'Golden Promise' ja tema vanemsordiga 'Maythorpe'. Töö jaoks eraldati kuuest odrasordist kokku 1330 ebaküpset embrüot, millest üks osa pandi nakatamata ja teine osa agrobakteriga nakatatuna kalluse induktsiooni söötmele. Hinnati embrüogeensete kalluste induktsiooni efektiivsust ajas kuni viiel induktsioonisöötmel. Seejärel hinnati kalluse regeneratsiooni efektiivsust, võrreldes võrse algega, taimi andvate kalluste ja regeneereunud taimede arvu sortide võrdluses.

Töö tulemustest ja arutelust selgus, et odra agrobakteriga vahendatud transformatsiooni efektiivsus sõltub genotüübist, kuid on mõjutatav mitmetest protokollidest. Lisaks oleks soovitatav katsetada teisigi transformatsiooni meetodeid odra transformeerimiseks: kalluse nakatamine, mikrospooride nakatamine, biolistilne transformatsioon või mikrosüstimine.

Abstract

Barley (*Hordeum vulgare*) is a good cereal model organism for plant biotechnology because it has a diploid genome, is self-pollinating, and is closely related to other important cereals such as wheat and rye. Over the years, several good Estonian barley varieties have been bred, such as 'Anni', 'Leeni', 'Maali' and 'Tuuli'. When applying new precision breeding techniques such as CRISPR/Cas, it has become clear that *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation is not successful in the case of Estonian barley varieties. The aim of this thesis was to compare the ability of embryogenic callus regeneration and transformation efficiency of spring barley varieties bred in Estonia, compared to the model barley variety 'Golden Promise' and its parent variety 'Maythorpe'. For the current thesis, a total of 1330 immature embryos were isolated from six varieties of barley, one part of which was uninfected and the other part infected with *Agrobacterium*. The induction efficiency of embryogenic calli was evaluated over time on up to five callus induction media. The efficiency of callus regeneration was then evaluated, by comparing the number of the shoots, calli producing plants and the regenerated plants among the varieties.

The results of the work and the discussion revealed that the efficiency of barley *Agrobacterium*-mediated transformation depends on the genotype, but is also influenced by several other components of the protocol. In addition, it is advised to test other transformation methods for barley transformation such as infection of callus and microspore with *Agrobacterium*, biolistic transformation or microinjection.

Lühendid

BAP (*6-benzylaminopurine*) – 6-bensüülaminopuriin

bp (*base pair*) – aluspaar

Cas (*CRISPR associated*) – CRISPR seostunud

Cas9 – *Streptococcus pyogenes* pärit nukleaas

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) – klasterdunud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused

crRNA – CRISPR RNA

Dikamba – 3,6-dikloro-2-metoksübensoaat

DSB (*double-strand breaks*) – kaksikahelalised katkemised

FokI - *Flavobacterium okeanoikoites'*ist pärit restriksiooni endonukleaas

gRNA (*guide RNA*) – giid-RNA ehk juht-RNA

HDR (*homology-directed repair*) – homologiaale suunatud parandamine

IAA (*indole-3-acetic acid*) – indool-3-äädikhape

IBA (*indole-3-butanoic acid*) – indool-3-võihape

LB (*lysogeny broth*) – lüsogeenne sööde (Luria-Bertani)

MS – Murashige ja Skoog sööde

NAA (*1-naphthaleneacetic acid*) – 1-naftaleenäädikhape

NHEJ (*non-homologous end joining*) – mittehomoloogsete DNA-otste ühendamine

PAM (*protospacer adjacent motif*) – eraldajajärjestusega külgnev motiiv

PEG (*polyethylene glycol*) – polüetüleenglükool

sgRNA (*single guide RNA*) – ühtne giid-RNA

ZFN (*zinc-finger nuclease*) – tsink-sõrme nukleaas

TALE (*transcription activator-like effector*) – transkriptsiooni aktivaatori-laadne efektor

TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) – transkriptsiooni aktivaatori-laadne efektornukleaas

T-DNA (*transfer DNA*) – ülekanne DNA

tracrRNA (*trans-activating CRISPR RNA*) – transaktiveeriv CRISPR RNA

vir - virulentsus

2,4-D (*2,4-dichlorophenoxyacetic acid*) – 2,4-diklorofenoksüädikhape

Sissejuhatus

Tänasel päeval on oluline looduse jätkusuutlikkus, millega tuleb arvestada ka põllumajanduses. Oluline on vähendada taimekaitsevahendite kasutamist kui ka väetamist. Selleks on vaja, et põllukultuurid oleksid haiguskindlamad, vastupidavad erinevate ilmastikuolude suhtes, suruksid alla umbrohtude kasvu jne. Tänapäeval kiiresti muutuvus ühiskonnas ja ka keskkonnas enam ei piisa traditsioonilisest sordiaretusest, vaid tuntakse vajadust uute aretustehnikate ja täppisaretuse meetodite järgi. Marker-assisteeritud sordiaretus tõstab juba praegu sordiaretuse efektiivsust, kuid erinevad geenide modifitseerimise meetodid nagu näiteks CRISPR/Cas ja TALEN, tõstavad selle kiirust ja täpsust veelgi. Enamik täppisaretuse meetodeid põhinevad ajutisel DNA ülekandel taime genoomi, milleks kasutatakse laialdaselt mullabakteri *Agrobacterium tumefaciens* abi.

Oder on üks esimesi taimi, mida inimene hakkas ise kasvatama umbes 10 000 aastat tagasi, kuigi juba enne seda tarvitasid inimesed toiduks metsikut otra (19 000 aastat tagasi). Kultiveeritav oder (*Hordeum vulgare*) pärineb metsikust eellasest *Hordeum spontaneum*’ist ja kuulub kõrreliste sugukonna alamsugukonna nurmiklaste perekonda odrad. Oder on oluliselt maailma neljas teravili nisu, maisi ja riisi järel. Ta kasvab peamiselt parasvöötmes, kuid teda iseloomustab väga suur kohanemisvõimekus. Otra saab kasvatada nii lähisarktilises piirkonnas kui ka lähistroopika piirkonnas, samas ka kõrgmäestikis nagu Himaalaja või ka kõrbelähistel aladel Põhja-Aafrikas ja Austraalias. Oder on oluline teravili nii inimtoiduks kui ka loomasöödana ning on heade kiudainete allikaks. Lisaks on oder oluline tooraine viski, õlle ja teiste jookide tootmiseks.

Oder on taimebiotehnoloogias hea teraviljade mudelorganism, kuna omab diploidset genoomi, on isetolmlev ja on lähisuguluses teiste oluliste teraviljadega nagu nisu ja rukis. Odral on 7 kromosoomipaari ($2n=14$), genoomi suurus on umbkaudu 5 Gb ning geene on hinnanguliselt 63 000. Odral on võrdlemisi lühike kasvuaeg (keskmiselt 60-115 päeva), mida on võimalik kiirkasvatusega lühendada.

Oder on oluline teravili ülemaailmselt, kuid on seda ka Eestis. Esmased odraproovide kogumised Eestis algasid 1908. aastal, kuid odra sordiaretus hoogustus Jõgeva Sordikasvatuse rajamisega 1920. aastal. Aastate jooksul on aretatud mitmeid häid Eesti sorte, millel näiteks on hea seisukindlus nagu õlleodral 'Elo' ja söödaodral 'Anni', on head omadused mahetingimustes kasvatamiseks nagu suviotradel 'Leeni' ja 'Maali' või on suur mahumass nagu suviodral 'Tuuli'. Eesti odrasortide aretamisel on olulisel kohal haiguskindlus, näiteks jahukastekindlus.

Alates 2021. aastast on Eesti Taimekasvatuse Instituudis (alates 1.01.2023 Maaelu Teadmuskeskus, METK) katsetatud odra täppisaretuse tehnikat, agrobakteri vahendatud transformatsiooni CRISPR/Cas meetodil. Eesmärgiks oli täppisaretuse abil lisada odrasordile jahukastekindlus. Esmase katsetuse tulemusena selgus, et biotehnoloogilise mudelsordi 'Golden Promise' puhul transformatsioon õnnestus, kuid Eesti sortide puhul transformatsiooni ei toimunud. Seega käesoleva töö eesmärk on võrrelda Eestis aretatud suviodra sortide regeneratsiooni võimekust ja *Agrobacterium tumefaciens* vahendatud transformeerimise efektiivsust.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Taimede suunatud mutageniseerimise meetodid

Taimede transformatsiooniks on mitmeid võimalusi, mida jaotatakse juhuslikeks ja suunatud mutageneesi meetoditeks. Juhusliku mutageneesi meetodid jagunevad füüsikalisteks ja keemilisteks. Füüsikaliste meetodite puhul nagu radiatsioon ja UV-kiirgus töödeldakse taime osa vastavalt, et esile kutsuda geneetilisi muutusi taime DNAs, ja keemilise mutageneesi puhul töödeldakse taime osa kemikaalidega, mis samuti kutsuvad esile juhuslikke muutusi taime DNAs (Ohnoutkova 2019).

Suunatud mutageneesi meetodid põhinevad kohandatavatel endonukleaasidel, milleks on näiteks ZFN'id (*zinc-finger nuclease*), TALEN'id (*transcription activator-like effector nuclease*) ja Cas'id (RNA-juhitud nukleas). Neid kasutatakse genoomi sihilikuks redigeerimiseks nii, et geneetilised modifikatsioonid tekiks vaid soovitud järjestustel genoomis. Kohandavate endonukleaaside põhimõtte seisneb esile kutsutud DSB'il (*double-strand breaks*) ehk DNA kaksikahela katkemisel. Esile kutsutud DNA kaksikahelaline katke parandatakse rakusisese NHEJ (*non-homologous end joining*) tee kaudu, mis viib juhuslike nukleotiidide lisamiseni, kustutamiseni või asendamiseni (Wolter, Schindele, ja Puchta 2019; Lawrenson ja Harwood 2019). Teine kaksikahela katke parandamise tee on HDR (*homology-directed repair*), mis kasutab kaksikahela parandamiseks homologset DNA matriitsi, mille tulemusena tekib kontrollitud parandus või väike muudatus.

ZFN'id on sünteetilised restriksiooni ensüümid, mis sisaldavad Zn-sõrme DNAGA seonduvat domääni ja nukleasi domääni. ZFN'i DNAGA seonduv domään koosneb 3-4 Zn-sõrme motiivist, millest igaüks tunneb ära kolme nukleotiidi pikkuse DNA järjestuse (Novak 2019). Zn-sõrm on väike motiiv, mis on koordineeritud ühe või mitme Zn^{2+} -iooni poolt, et hoida struktuuri stabiilsena. Erinevate Zn-sõrme motiivide kombineerimise korral saab muuta ZFN valgu afiinsust kindlale järjestusele. ZFN'i nukleasi domään on mittespetsiifilise seondumisega ja see on pärit FokI restriktasist. Nukleasi domään peab olema dimeriseerunud, et indutseerida kaksikahelalist katket (Townsend et al. 2009).

TALEN'id ehk transkriptsiooni aktivaatori-laadsed efektornukleasid on samuti sünteetilised restriksiooni ensüümid, mida on võimalik konstrueerida nii, et nad lõikaks DNAd soovitud kohas. Neil on DNA katkestusi tekitav aktiivsus, mis on saidi-spetsiifiline. TALEN valgud on kimäärsed ja koosnevad kahest domäänist, millest üks on DNA-d siduv TALE (*TAL effector*) ja teine on DNAd lõhustav FokI domään (Hensel ja Kumlehn 2019). TALE domään on pärit taime patogeenselt bakterist *Xanthomonas* ja sisaldab 5 kuni 30+ korduvaid lühikesi 34 aminohappe pikkuseid nukleotiidi-spetsiifilisi järjestusi (Wei et al. 2013). TALE korduvjärjestuste 12. ja 13. aminohappe positsioon on kohandatav sihtmärk-DNA spetsiifiliselt. FokI domään on *Flavobacterium okeanoikoite*'st pärit endonukleas, mis on aktiivne vaid dimeerses olekus. TALEN'i kahe ühiku seondumine DNAlle vastupidises orientatsioonis aktiveerib FokI endonukleasi. Mutageneesi teostamiseks on neli etappi – sihtkoha geeni valimine, sihtgeeni spetsiifilise TALEN'i genereerimine ja transformatsiooni vektori konstrueerimine, TALEN'i ekspressiooniga taimede genereerimine, mutanttaimede identifitseerimine geneetiliselt homogeensete järglaste saamiseks.

Võrreldes ZFN'ide ja TALEN'itega, on CRISPR/Cas süsteem lihtsamini konstrueeritav, täpsem ja soodsam. Lisaks saab CRISPR/Cas süsteemi kasutada mitmete geneetiliste muudatuste püramidiseerimiseks (samaaegselt mitme geeni toimetamine), mille tulemusena saab mõjutada mitme geeni ekspressiooni ühe korraga (Wolter, Schindele ja Puchta 2019). CRISPR/Cas süsteemi puhul juhatab eelprogrammeeritud RNA Cas (CRISPR *associated*) nukleaasi huvipakkuvasse genoomi piirkonda. Bakteris on CRISPR/Cas süsteem kaitsesüsteemiks võõr-DNA eest, kus Cas valgu ja juht-RNA (*guide*-RNA e gRNA) kompleks tunneb ära võõr-DNA ning teeb selle katki. See toimib nõnda, et Cas ensüüm kasutab CRISPR järjestust juhtnööriina, et ära tunda komplementaarsel DNA lõigul ahela katkestamise järjestust. Bakteri enda gRNA koosneb kahest eraldi RNA molekulist crRNA-st (CRISPR RNA) ja tracrRNA'st (transaktiveeriv crRNA), mis enne Cas'iga kompleksi moodustumist hübridiseeruvad üheks gRNA'ks. Cas/sgRNA (Cas *single guide* RNA) kompleks on võimeline üle vaatama kogu genoomi ja läbi viima kaksikahela katkestamise seal, kus antud järjestus on tuvastatud (Lawrenson ja Harwood 2019).

Molekulaarbioloogias kasutatakse laialaselt suunatud mutageniseerimiseks CRISPR/Cas9 (ka CRISPR/Cas12, endine Cpf1) süsteemi, kuna seda on tänaseks palju uuritud. Selle põhimõtte seisneb DNA kaksikahela katkestamisel (DSB) huvipakkuvas DNA järjestuses. DSB moodustamiseks on vaja Cas valku (Cas9 või Cas12) ja kimäärset giid-RNAd. gRNA üks osa (crRNA) on sünteetiline ja programmeeritav vastavalt huvipakkuvale DNA lõigule, tavaliselt geeni eksonile, mis võimaldab lõikekoha komplementaarsuse alusel genoomist üles leida. Giid-RNA teine osa (tracrRNA) vastutab Cas nukleaasiga seondumise eest. Taimes seondub gRNA nii Cas9 valguga kui komplementaarse 20 nukleotiidi pikkuse sihtmärk DNA'ga, mille järjestusele järgneb 3' suunas PAM (*protospacer adjacent motif*) motiiv (NGG). PAM'ist kolm nukleotiidi 5' suunas teeb Cas9 DSB.

CRISPR/Cas süsteem võimaldab tõsta sordiaretuses erinevate kultuuride geneetilist mitmekesisust metsikuid eellasi taaskodustades või kasutades aluspaaride redigeerimise süsteemi, mille puhul Cas9-nikaas võimaldab täpset nukleotiidide asendamist ehk tsütosiin asendada tümiiniga või adeniin asendada guaniiniga (Wolter, Schindele ja Puchta 2019).

1.2. Odra transformeerimise meetodid

Taimede transformatsiooni meetodeid saab jagada mööduvaks ehk transientseks transformatsiooniks ja edasipäranduvaks ehk pikaajaseks transformatsiooniks. Lisaks eristatakse transformatsiooni meetodeid ülekande vektori alusel. DNA ülekannet väliskeskonnast regenereeruva taimeraku tuuma võimaldavad mitmed meetodid. Enamlevinud nende hulgas on biolistiline transformatsioon, agrobakteri-vahendatud transformatsioon, PEG (*polüetüleenglükool*) -vahendatud transformatsioon, UV-mikrolaseriga transformatsioon, mikrosüstimine, elektroporatsioon, silikoon-karbiidkiu keeristransformatsioon (*vortex*) ja nanoosakeste-vahendatud transformatsioon.

Biolistilist transformatsiooni kasutati odra puhul esimese meetodina võõr-DNA sisestamiseks (Jähne et al. 1994; Wan ja Lemaux 1994). Osakestega pommitamine on tavaline meetod taimede tuumseks transformeerimiseks, mis põhineb otsesel DNA kandmisel taime rakku. Kuna taime rakukest on võõr-DNA'le läbimatu, siis geenipüss on hea meetod rakukestast läbitungimiseks. Seega taime kude pommitatakse kulla või volframi osakestega, mis on kaetud võõr-DNA'ga. Suurel

kiirendusel pommitades saavad mikromürsud siseneda taime rakku, kus võõr-DNA elueerub osakestelt taime raku sisekeskkonda. Seal see transleeritakse või saab osaks peremehe raku genomist. Biolistilise transformatsiooni puhul saab kasutada palju erinevaid taimekudesid, odra puhul näiteks ebaküpset embrüot, skutellumit, õietolmu, kallust, endospermi ja mikrospoori. Biolistiline transformatsioonimeetod ei vaja binaarset vektorit, võimaldab üle kanda mitmeid plasmide korruga, kuid integratsiooni muster on ebakorrapärane ja ei saa valida rakusisest sihtkohta.

PEG vahendatud DNA ülekanne odra protoplastidesse on samuti üks laialt levinud transformeerimise meetodeid (Lazzeri 1995). See on keemiliselt stimuleeritud võõr-DNA vastuvõtmine protoplastide poolt. Värsked isoleeritud protoplastid segatakse DNA ja 15-20% PEG'iga, mis on lahustatud kahevalentseid katioone sisaldavas puhvris. PEG ja katioonid muudavad protoplastide plasmamembraani ebastabiilseks nii, et see on puhtale DNAle läbitav. PEG soodustab ka DNA sadestumist, mis endotsütoosi teel siseneb protoplasti. Pärast inkubatsiooniperioodi protoplastid pestakse ning pannakse Petri tassile kasvama. Kuid selle meetodi üks kitsaskohti on madal transformatsiooni efektiivsus (Sung et al. 2003).

Eelpool nimetatud suunatud mutageniseerimise meetodite läbiviimiseks kasutatakse laialdaselt ka agrobakteri vahendatud transformatsiooni (Kumlehn et al. 2006). Taimekoekultuuri korral toimub taime osa nakatamine agrobakteriga erinevatel viisidel, vastavalt sellele, mis taime osa töödeldakse. Odra puhul on agrobakteriga nakatatud erinevaid taimekoe tüüpe näiteks ebaküpseid embrüoid (Harwood 2014; Hinchliffe ja Harwood 2019) ja tolmukaid (Kumlehn et al. 2006).

1.3. *Agrobacterium tumefaciens* molekulaarbioloogia töövahendina

Taimede geneetiliseks genoomi toimetamiseks (*genome editing*) on kõige enam kasutatav agrobakteri vahendatud transformatsiooni meetod. See põhineb patogeense pinnasebakteri *Agrobacterium tumefaciens*'e võimekusel sisestada osa enda plasmiidsest DNA-st peremeesraku tuumagenoomi (Narusaka et al. 2012). Kuigi teravili ei kuulu looduses *Agrobacterium*'i peremeesorganismide hulka (Jähne et al. 1994), on labori tingimustes kunstlikult teraviljade nakatamist demonstreeritud.

Agrobacterium on suur perekond gram-negatiivseid pinnasebaktereid, mis on hüpervirulentsed, põhjustades taimedel ebanormaalset kudede vohamist. Agrobakterite rühmitamine põhinebki peamiselt nende fütopatogeensetel omadustel. See agrobakteri liik, mis põhjustab väga paljudel kaheiduleheliste taimede juurtel, juurekaelal ja vartel granuloomi, on *Agrobacterium tumefaciens*. Ta loob endale keskkonna paljunemiseks taime koekahjustuse juures oma *vir* geenide ekspressiooni abil, mis on indutseeritud kemotaksise poolt vastusena taime fenoolsetele ühenditele. *Vir* geenidelt kodeeritakse valke, mis aitavad kaasa T-DNA (*transfer* DNA) genereerimisele ja selle transportimisele bakterist taimeraku tuuma. Kui T-DNA integratsioon taime genoomi on stabiilne, siis T-DNA elemendid kodeerivad taimehormoone, mis mõjutavad taimekoe kasvajaklikku vohamist. (Van Montagu ja Zambryski 2013)

Agrobakteri vahendatud transformatsioonisüsteemi toimimise jaoks on T-DNA eraldatud Ti-plasmiidist ning sellelt on eemaldatud kasvajat tekitavad geenid, *vir* geenid, kuid on alles jäetud T-

DNA transferaasi lugemisraami ORI ja terminatsiooni sait. Seega geneetiliste modifikatsioonide tõttu on võimalik agrobakteri vahendatud transformatsiooni teostada ka üheidulehelistel taimedel nagu kõrrelised, sealhulgas odra perekonnal. Kuid geneetiliste modifikatsioonide tõttu T-DNAs on vaja transformatsiooni jaoks binaarset vektori süsteemi, kus T-DNA asub binaarses plasmiidis ja *vir* geenid asuvad eraldi abiplasmiidis. T-DNA'd sisaldavasse binaarsesse plasmidi saab sisse viia kloneerimise teel huvipakkuva geeni järjestuse. Abiplasmiid aitab T-DNAI siseneda taime rakku, aga ei põhjusta kasvajate. (Lee ja Gelvin 2008)

Agrobakteri vahendatud transformatsiooni jaoks kasutatakse erinevaid tüvesid. Odra puhul levinumad on GV3101 ja AGL1, millel mõlemal on C58 kromosomaalne foon. *Agrobacterium tumefaciens*'i C58-l on tsirkulaarne 2841 kb suurune kromosoom (Ch1), lineaarne 2076 kb suurune kromosoom (Ch2) ja kaks suurt plasmidi, 542 kb suurune pAt ja 216 kb suurune pTi (Ren et al. 2022). AGL1 tüve puhul on insertiooni mutatsioon recA geen (DNA säilitamise ja parandamise geen) rekombinantse plasmidi stabiliseerimiseks. Lisaks omab AGL1 tüvi rifampitsiini ja karbenitsilliini resistentsusgeeni ning tema Ti-plasmiidilt on täielikult eemaldatud T-DNA regioon. GV3101 tüvel on ka rifampitsiini resistentsuse geen ning sisaldab gentamütsiini resistentsuse geeniga Ti-plasmidi, millelt on samuti T-DNA regioon eemaldatud. Mõlema tüve puhul tekib binaarne süsteem, kui bakteri tüve transformeerida vektoriga, mis sisaldab T-DNA regiooni järjestust. *A. thaliana* transformatsiooni puhul oli agrobakteri tüve AGL1 efektiivsus kõrgem kui GV3101 tüve puhul (Zhang et al. 2020). Vastupidine olukord on aga mikro-tomati *Solanum lycopersicum* L puhul, mil GV3101 transformatsiooni efektiivsus oli kõrgem kui AGL1 oma (Chetty et al. 2013). Meile teada olevalt pole odra puhul erinevate agrobakteri tüvede süsteemset võrdlust tehtud.

1.4. Suviodra regeneratsioon ja seda mõjutavad tegurid

Regeneratsioon kalluskultuurist taimeks on võtmetähtsusega ja oluline etapp suviodra agrobakteri vahendatud transformatsiooni meetodi juures. Suviotrade regeneratsiooni võimekus ja efektiivsus sõltub genotüübist, söötme koostisest, embrüo suurusest ja muudest faktoritest. Aga peamisi probleeme odra koekultuuride puhul on olnud albiino regenerantide sagedus. On leitud, et embrüod suuruses 0,5-1,5 mm annavad rohkem embrüonaalseid kalluseid ja väga vähesel määral albiino kasve ning suuremad embrüod diameetriga 1,6-3,0 mm annavad vähem embrüonaalseid kalluseid ja 30-50% regenerantidest on albiino kasvud (Chang et al. 2003).

Väga oluline on taimekoekultuuride puhul söötmete koostis, mis sõltub kasutatavast taimeliigist, sordist ja katse eesmärgist. Odra ebaküpsete embrüote regeneratsiooni potentsiaali tõstmiseks kasutatakse sünteetilisi aukiine ning vase ja lämmastiku ühendeid. Enamasti on leitud, et 2,0-3,0 mg/l 2,4-D kalluse induktsiooni söötmes annab kõige suurema arvu regenerante eraldatud embrüo kohta (Chang et al. 2003; Serhantova, Ehrenbergerova ja Ohnoutkova 2004; Tiidema ja Truve 2004). Kuid samas üksikute suviodra sortide puhul on regeneratsiooni efektiivsus kõrgem dikambat kasutades. Samuti ka transgeensetete otrade puhul on täheldatud, et dikamba soodustab agrobakteri vahendatud transformatsiooni korral transgeensete taimede kasvu (Trifonova, Madsen ja Olesen 2001). Optimeeritud vase tase söötmes tõstab oluliselt regenerereerivate taimede arvu kalluse kohta. On leitud, et vase kontsentratsioon söötmes mõjutab odra erinevaid sorte erinevalt, mõne genotüübi puhul on regeneratsiooni efektiivsus kõrgeim 50 µM CuSO₄ juures ja jällegi teise

genotüübi puhul on regeneratsiooni võimekus kõrgeim 5 μM CuSO_4 (Dahleen 1995). Orgaanilise nitraadi ühendid mõjutavad varajast embrüogeneesi ning anorgaanilised lämmastiku ühendid on kasulikud rohelise kasvu arenemises (Tiidema ja Truve 2004).

Seni kõige usaldusväärsem ja efektiivsem odra taime osa koekultuuris kasutamiseks on olnud ebaküpsed sügootilised embrüod (Chang et al. 2003). Nad annavad häid embrüogeenseid kalluseid, mis omakorda tõstavad taime regeneratsiooni. Kuigi see sõltub ka doonortaime genotüübist ja kalluse induktsiooni kasvutingimustest (Serhantova, Ehrenbergerova ja Ohnoutkova 2004). Transformatsioonitõrksate odrasortide puhul on siiski olemas madala efektiivsusega regeneratsiooni võimekus, mida saab tõsta söötmete koostise kohandamisega. Kõige suuremal määral mõjutab agrobakteri vahendatud transformatsiooni õnnestumist ja regeneratsiooni efektiivsust genotüüp.

2. Bakalaureusetöö eesmärgid

Varasemad avaldamata katsed agrobakteri vahendatud transformatsioonil Eestis aretatud odrasortidega ei andnud embrüogeensetest kallustest ühtegi regeneranti. Selleks kasutati agrobakteri tüve AGL1, mis sisaldas *Golden Gate*'i kloonimisega kokku pandud vektorit koos taime hügomütsiini resistentsuse kasseti, Cas9 ekspressioonikasseti ja kahe sgRNA kassetiga, mis olid suunatud odra *MLO* geenile (binaarse vektori suurus 14 919 bp).

Käesoleva töö eesmärk on võrrelda Eestis aretatud suviodra sortide 'Tuuli', 'Maali', 'Leeni' ja 'Anni' regeneratsiooni võimekust ja *Agrobacterium tumefaciens* vahendatud transformeerimise efektiivsust, võrreldes odra mudelsordiga 'Golden Promise' ja selle esivanemaga 'Maythorpe'. Katsesse valiti võimalikult väike binaarne vektor, selleks sobis hügomütsiini resistentsuse kassetiga pICSL11059 (7225 bp). Selle jaoks kasutati agrobakteri tüve GV3101, kuna varasemas katses kasutatud tüvel AGL1 oli binaarse vekoriga kattuv karbenitsilliini resistentsus.

Käesoleva töö jaoks püstitati kaks hüpoteesi: 1) Eestis aretatud odrasortidest on võimalik indutseerida embrüogeenseid kalluseid, 2) Eestis aretatud odrasortide regeneratsiooni pidurdab agrobakteriga nakatamine.

3. Materjal ja meetoodika

3.1. Taimede kasvatamine

Suviadra sortide 'Tuuli', 'Maali', 'Leeni', 'Anni', 'Golden Promise' ja 'Maythorpe' eelidandatud seemnete külvamine toimus iga nädal ning igast sordist kasvatati 6 taime. Taimed kasvasid 8 mm polükarbonaadist kattega kasvuhuones kiirkasvatuse meetodil ehk pikendatud päevarežiimiga (22 h valgust ja 2 h pimedust). Valgusallikateks oli nii naturaalne päevavalgus kui ka Valoya C65 LED lambid. Taimed kasvasid 2 l ümarkant pottides ja kasutuses oli kasvusubstraat Kekkilä Aiamuld (Kekkilä-BVB Eesti OÜ), millele oli lisatud 4 g/l aeglaselt eralduvat graanulvæetist Osmocote Bloom Bedding 12-7-18+MG+ME (2-3 kuud). Lisaks igapäevasele kastmisele toimus iganädalaselt taimede kastmine 4%-lise elusatest vetikatest koosneva biostimulant-vedelvæetise AllGrow (Allgrow AB, Rootsi) lahusega.

3.2. Kloneerimisvektoriga plasmidi puhastamine *E. coli* bakterist

Kloneerimise vektoriks oli plasmid pCSL11059 (Addgene, #68263), mis sisaldas taimes ekspresseeruvat hügramütsiini resistentsuse kasseti. Plasmid saadi *E. coli* tüve DH5-alfa agaritorkena Addgene deponitooriumist. Bakter külvati LB-agari (LB-agar High Salt 35 g/l, Duchefa Biochemie B.V.) söötmele, mis sisaldas antibiootikumi karbenitsilliini 100 mg/l. LB-agari söötmel kasvanud väljavahitud *E. coli* üksik koloonia kasvatati üleöö antibiootikumi sisaldavas vedel-LB (LB Broth High Salt 25 g/l, Duchefa Biochemie B.V.) söötmes loksutiga inkubaatoris Ecotron (Infors HT, Šveits) 37°C ja 180 rpm juures. Järgmisel päeval puhastati plasmidne DNA FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit abil (Favorgen, Taiwan).

Esmalt 1 ml hästikasvanud bakteri kultuuri pipeteeriti 1,5 ml mikrotsentrifuugi tuubi ja tsentrifuugiti (Eppendorf, Saksamaa) 11 000 x rcf juures 1 minut. Saadud pelletilt eemaldati supernatant täielikult ja lisati 200 µl FAPD1 puhver (RNAas A-ga) ning suspendeeriti ettevaatlikult ühtlase segu saamiseks. Teisena lisati 200 µl FAPD2 puhvrit ning tuubi pöörati mõned korrad (5-10 korda) lahuse segunemiseks ja inkubeeriti 5 minutit, et lüüs saaks toimuda. Kolmandana lisati 300 µl FAPD3 puhvrit ning koheselt pöörati tuubi mõned korrad (5-10 korda) lüüsi peatamiseks ja tsentrifuugiti 14 000 x rcf juures 5 minutit. Välja sadenevad valgud ja genoomne DNA ning plasmidne DNA asub supernatandis, mille kätte saamiseks kasutatakse kogumistuubi ja FAPD kolonni komplekti. Seejärel eemaldati 650 µl supernatanti ettevaatlikult tsentrifuugimise tuubist ja pipeteeriti FAPD kolonni ning tsentrifuugiti veel 30 sekundit. Siis plasmidne DNA seondus silikamaatriksile ning kogumistuubi kogunenud vedelik valati ära.

Soolade ja muude ionide eemaldamiseks toimus pesemine. Esmalt lisati kolonni 400 µl WP puhvrit, tsentrifuugiti 30 sekundit ja kogumistuubi kogunenud vedelik valati ära. Järgmisena lisati kolonni 700 µl pesemise puhvrit, millele oli lisatud 96% etanooli, ning tsentrifuugiti 30 sekundit ja kogumistuubi kogunenud vedelik valati ära. Järgnes lisa tsentrifuugimine maksimum kiirusel 3 min FAPD kolonni kuivatamiseks ning see asetati uude 1,5 ml mikrotsentrifuugi tuubi ja kolonni membraani keskele lisati 50 µl autoklaavitud MQ H₂O ja lasti sellel seista 3 minut. Plasmidse DNA elueerimiseks tsentrifuugiti tuubi maksimum kiirusel 3 minut ning eluaat säilitati -20°C juures kompetentsete agrobakterite transformeerimiseks.

3.3. Agrobakteri GV3101 kompetentsete bakterite tegemine

Esmalt tehti agrobakteri starterkultuur. Laminaari Scanlaf Fortuna (LaboGene, Taani) all võeti pipeti otsaga *Agrobacterium tumefaciens* tüve GV3101 (saadud Tartu Ülikoolist, Prof. Kollisti rühmast) kolooniatega tassilt ümmargune, teistest kolooniatest eraldi olev bakteri koloonia. Ja see lisati 2 ml mikrotsentrifuugi tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 1 ml vedelat LB söödet koos antibiootikumidega (1 µl rifampitsiin 50 mg/l, 1 µl gentamütsiin 50 mg/l). Kultuuri kasvatati loksutiga inkubaatoris 4 h 28°C ja 160 rpm juures.

Kompetentsete rakkude tegemiseks kõige pealt paljundati agrobakteri kultuuri. Katseklaasi pipeteeriti 5 ml vedel-LB söödet koos antibiootikumidega (5 µl rifampitsiin 50 mg/l, 5 µl gentamütsiin 50 mg/l) ja lisati 30 µl starterit. Kultuuri hoiti loksutiga inkubaatoris üleöö 28°C ja 160 rcf juures.

Järgmiseks päevaks valmistati ette kolm 500 ml koonilist kolbi koos vedela LB söötmega. Igasse kolbi lisati 200 ml söödet, mis oli steriliseeritud 121°C ja 1 atm juures autoklaaviga Laboklav (SHP Steriltech AG, Saksamaa). Laminaari all lisati igasse kolbi antibiootikumid (200 µl rifampitsiin 50 mg/ml, 200 µl gentamütsiin 50 mg/ml) ja inokulaati vastavalt 50 µl, 100 µl ja 200 µl. Kultuuri kasvatati loksutiga inkubaatoris üleöö 28°C ja 160 rpm juures.

Kolmandal päeval võeti kasutusse see üleöö kultuur, mille OD₆₀₀ oli kõige optimaalsem, jäädes vahemikku 0,5-1,0, mida mõõdeti NanoPhotometer NP80-ga (Implen, Saksamaa). See jagati kaheksasse 50 ml tuubi, igasse lisati 25 ml öökultuuri ja tsentrifugeeriti Rotanta 460R tsentrifugeerimisaparaadiga (Hettich, Saksamaa) 4°C ja 3000 rcf juures 20 min. Supernatant eemaldati ja pelletit resuspendeeriti 15 ml külma autoklaavitud deioniseeritud veega ning kaks 50 ml tuubi valati kokku nii, et kasutusse jäi neli 50 ml tuubi, mis igaüks sisaldas 30 ml bakteri suspensiooni. Järgnes tsentrifugeerimine 4°C ja 3000 rcf juures 20 min ja teine pesu. Supernatant eemaldati ja pelletit resuspendeeriti 5 ml külma autoklaavitud deioniseeritud veega ning kaks 50 ml tuubi valati kokku nii, et kasutusse jäi kaks 50 ml tuubi, mis kumbki sisaldas 10 ml bakteri suspensiooni. Järgnes kolmas tsentrifugeerimine ja supernatandi eemaldamine.

Saadud pellet resuspendeeriti 2,5 ml 10% glütserooliga ja valati kokku ning tsentrifugeeriti samadel tingimustel. Supernatant eemaldati ning pellet resuspendeeriti 2 ml 10% glütserooliga ja jagati 100 µl kaupa eeljahutaud 2 ml mikrotsentrifuugi tuubidesse (kokku 20 tk). Saadud alikvoodid säilitati elektroporatsiooni jaoks -80°C juures.

Kõikide etappide vahepeal hoiti suspensiooniga tuube jääkastis ja pipeteerimiseks kasutati automaat pipette.

3.4. Elektroporatsioon

Elektroporatsiooni läbiviimiseks kasutati punktis 2.2. puhastatud plasmidi ja punktis 2.3. tehtud elektro-kompetenseid agrobakteri GV3101 rakke.

Esmalt pandi -80°C külmpapist võetud kompetentsete agrobakterite GV3101 rakukultuur ja -20°C külmpapist võetud pICSL11059 plasmiid jääle sulama ligikaudu 15 minutiks, et sulamine toimuks

aeglaselt. Samuti jahutati jääl enne transformatsiooni läbiviimist ka 1,5 ml mikrotsentrifuugi tuubid ja elektroporatsiooni küvetid. Kui agrobakteri kompetentsed rakud ja plasmiidne DNA lahus olid üles sulanud, siis lisati kultuurile (100 µl) 3 µl plasmidi. See segati ettevaatlikult nii, et segu püsiks külm ning inkubeeriti jääl 3 min. Seejärel pipeteeriti saadud segu jahutatud elektroporaatori küveti, mis kuivatati kiiresti enne poraatori kambrisse sisestamist. Elektroporatsioon viidi läbi elektroporaatoriga Eppendorf Eporator (Eppendorf, Saksamaa) 2000 V juures. Koheselt pipeteeriti küveti 1 ml vedelat LB söödet ja suspendeeriti õrnalt ning segu valati ümber jahutatud mikrotsentrifuugi tuubi, hoiti jääl 3 minutit ja inkubeeriti 1,5-2 h loksutiga inkubatsiooni kapis 28°C ja 160 rpm juures.

Plasmiidiga pICSL11059 agrobakteri GV3101 inkubatsiooni ajal valmistati ette bakteri külvamiseks LB-agariga 9 cm diameetriga Petri tassid, 2tk. LB-agari söötmega tasside tegemiseks kasutati autoklaavitud LB-agar *High salt* söödet (35 g/l), mis enne tassidele valamist sulatati üles ja lisati antibiootikumid (rifampitsiin 25 mg/l, gentamütsiin 50 mg/l, karbenitsilliin 100 mg/l). Plasmiid pICSL11059 omab bakteris resistentsust karbenitsilliini vastu. GV3101 tüvel on rifampitsiini resistentsuse ning gentamütsiini resistentsuse geenid. Kummalegi tassile valati laminaari all 25 ml LB-agari söödet ja jäeti tarduma.

Agrobakteri külvamine toimus laminaari all ettevalmistatud LB-agari tassidele. Selleks pipeteeriti mikrotsentrifuugi tuubist 50 µl ühele tassile ja 150 µl teisele tassile ning hõõruti steriilse spaatliga laiali kuni hõõrdumise tekkeni. Tassid asetati inkubatsiooni kappi kolooniate kasvamiseks 48 h ja temperatuurile 28°C.

3.5. Agrobakteri transformatsiooni kontroll koloonia PCR abil

Kui transformeeritud agrobakteri kolooniad oli kasvanud, siis lisaks antibiootikumi selektiivsusele kontrolliti PCR abil plasmidi pICSL11059 olemasolu agrobakteris. PCR läbiviimiseks valiti välja 8 ümmargust, üksteisest eraldi asetsevat kolooniat ja märgistati need numbritega 1-8. Laminaari all pipeteeriti 20 µl MQ H₂O igasse numbriga 1-8 märgistatud 1,5 ml mikrotsentrifuugi tuubi, kuhu võeti pipeti otsikuga agrobakteri kultuuri tassilt vastava märgistusega kolooniast osa ja jäeti 10 minutiks mikrotsentrifuugi tuubi suspendeeruma.

PCR reaktsioonisegu kokkusegamiseks märgistati esmalt 200 µl tuubid numbritega 1-8. Reaktsioonisegu kogumaht ühe tuubi kohta oli 20 µl, mille koostis oli järgmine: 4,8 µl MQ H₂O, 4 µl FirePol Master Mix (Solis BioDyne, #04-11-00S15), 0,6 µl 10 µM pärisuunaline praimer 35S-prom-F (5'CTATCCTTCGCAAGACCCTTC), 0,6 µl 10 µM vastassuunaline praimer Hygr-R (5'TTTGTAGAAACCATCGGCGC), 10 µl bakteri kolooniat suspendeerituna vees, mida kasutati DNA matriitsina vastavalt numbri märgistusele, kokku kaheksa PCR reaktsioonisegu.

PCR programmi tsükkel algas bakteri raku lõhkumise ja DNA matriitsi denatureerimisega 95°C 5 min. 35 korda korduv tsükkel oli järgmine: DNA denatureerimine 95°C 30 sec, praimerite hübridiseerimine 55°C 30 sec, ekstensioon 72°C 25 sec. PCR programm lõppes poolikuks jäänud produktide pikendamiseks 5 min temperatuuril 72°C. Saadud PCR produktid säilitati -20°C juures geelelektroforeesi teostamiseks. Geelelektroforeesiks kasutati 1% agarooosi ja etiidiumbromiidiga geeli, kuhu laeti 10 µl PCR produkti ning 2 µl 6X laadimispuhvit. Pikkusredelina kasutati toodet DNA

Ladder Ready to Load 1 kb (Solis Biodyne, Eesti). Geeli jooksutati elektriväljas 90 V juures 45 min. Seejärel pildistati geeli Syngene transilluminaatori ning GeneSnap tarkvaraga.

PCR läbiviimise ja geelelektroforeesi tegemise ajaks pandi kolooniatega tass +4°C külmkappi ootele. Geelelektroforeesi tulemuste põhjal valiti positiivne koloonia, millest tehti kõigepealt öökultuur, mis kasvas antibiootikumideta vedelas LB söötmes loksutiga inkubatsioonikapis 28°C ja 160 rpm juures. Järgmisel päeval tehti sellest aga 1 ml varud 80% steriilses glütseroolis (öökultuuri 700 µl, glütserooli 300 µl) -80°C kapis säilitamiseks ja edaspidisteks embrüote nakatamiseks.

3.6. Embrüo eraldus

Kui taimed olid 6-8 nädala vanused, siis toimus seemnete kogumine ja nende sterilisatsioon. Sterilisatsiooni etapid olid järgmised: I etapp oli seemnete pesemine 2 min 70%-etanooli lahuses, II etapp oli seemnete 2-kordne loputamine autoklaavitud deioniseeritud veega, III etapp oli seemnete steriliseerimine 4 min 5%-kloori lahuses ja viimane etapp oli seemnete 4-kordne loputamine autoklaavitud deioniseeritud veega. Seemnete steriliseerimine ja embrüote isoleerimine toimus laminaari all. Eraldati ebaküpsed embrüoid, diameetriga 1 – 1,5 mm, stereomikroskoobi Zeiss Stemi 305 (Zeiss, Saksamaa) abil. Tööinstrumentideks oli pintsetid ja hambasond. Mõlema katse puhul eraldati umbes 100 embrüot sordi kohta, kokku 1330 tk.

Regeneratsiooni katse puhul asetati 25 embrüot kalluse induktsiooni tassidele, mis olid CuSO₄-ga ja ilma antibiootikumideta, hajusalt skutellum allapoole. Transformeerimise katse puhul asetati 25 embrüot esmalt kalluse induktsiooni tassile, mis olid ilma CuSO₄ ja antibiootikumideta, skutellum ülespoole 5x5 asetuses.

3.7. Odra transformatsioon

Agrobakteri kultuuri, tüvi GV3101 plasmiidiga pICSL11059, kasvatati vedelas LB söötmes inkubatsioonikapis temperatuuril 28°C ja loksutil 160 rpm umbes 18 h. Enne nakatamist eelküpseid embrüod seisis üleöö pimedas ja toatemperatuuril. Embrüote nakatamine toimus, kui agrobakteri kultuuri lahuse optiline tihedus jäi vahemikku 0,7-1,13 OD₆₀₀, soovituslik vahemik aga oli 0,7-0,8. Nakatamise protsess viidi läbi laminaari all. 25 embrüo kohta kasutati 200 µl inokulaati, kasutades selleks 20-200 µl automaatpipetti. Iga embrüole sai tilk peale tilgutatud ja siis tassil lastud kuivada 5-10 minutit ja seejärel tõsteti embrüod ümber kooskultiveerimise tassidele skutellum allapoole. 3 päeva pärast aga embrüod tõsteti ümber selektiivtassidele, mis sisaldasid hügomütsiini 50 mg/l ja tikartsilliini 150 mg/l. Transgeensetele taimedele üleviidud T-DNA plasmiidist pICSL11059 annab taimetele resistentsuse hügomütsiini vastu ning tikartsilliin tapab vaba agrobakteri.

3.8. Kalluste kasvatamine ja selleks vajalikud söötmed

Embrüote nakatamiseks ja agrobakteriga kooskultiveerimiseks olid kasutusel kalluse induktsiooni söötmega agari tassid, mis sisaldasid 4,3 g/L MS (Duchefa Biochemie B.V., M0221), 30 g/L maltoosi, 1 g/l kaseiinühüdroolüsaati, 1 mg/l tiamiin vesinikkloriidi ehk B1 vitamiini, 350 mg/l müoinositol ehk B8 vitamiini, 690 mg/l proliini, 2,5 mg/l dikambat, 3,5 g/L agarit ja pH-ga 5,8. Kalluse kasvatamiseks

kasutati kalluse induktsiooni söötmega tasse, millele oli veel lisaks 1,25 mg/l vasksulfaati. Kallused kasvasid pimedas ja toatemperatuuril ning embrüogeneetiliste kalluste üle viimine uutele kalluse induktsiooni (CI) tassidele toimus iga kahe nädala tagant ja pärast 6-8 nädalat aga viidi need üle siirdetassidele (T). Esimesena olid embrüod CI-1' ja siis kallused viidi üle vastavalt CI-2, CI-3'le ja vajadusel veel ka CI-4'le j CI-5'le ning embrüogeensed kallused viidi üle T-1'le, vajadusel ka T-2'le.

Kalluste varajases regeneratsiooni etapis oli kasutusel siirde söötmega tassid, mis sisaldasid 2,7 g/L MS (Duchefa Biochemie B.V., M0238 ilma lämmastikuühendita), 20 g/L maltoosi, 165 mg/l NH_4NO_3 , 750 mg/l glutamiini, 0,4 mg/l tiamiini, 100 mg/l inositooli, 2,5 mg/l 2,4-D, 0,1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, 1 mg/l IAA, 1 mg/l IBA, 1,25 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g/L agarit ja pH-ga 5,8. Kallused viidi edasi arenemiseks kasvukappi, kus olid järgmised kasvutingimused: temperatuur oli nii päeval kui ka öösel 24°C, suhteline niiskus oli 80% juures ning valguse režiim oli 16 h valgust ja 8 h pimedust. Esimesel kasvunädalal olid tassid kaetud paberlehega valgusega kohanemiseks ja edaspidi tavavalguse käes. Diferentseeruvad kallused (väikeste roheliste kasvudega) viidi üle regeneratsiooni (R) söötmele. Muidu läks vaja ühte regeneratsiooni söödet, aga mõnda üksikut kallust oli vaja üle viia ka R-2'le.

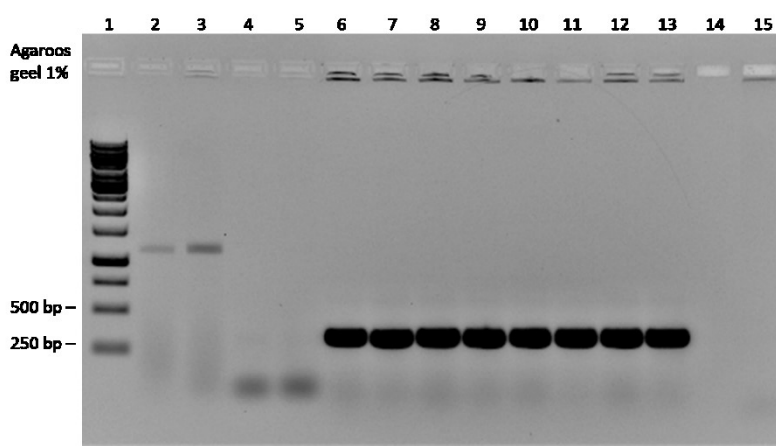
Regeneratsiooni sööde sisaldas 2,7 g/L MS (Duchefa Biochemie B.V., M0238 ilma lämmastikuühendita), 20 g/L maltoosi, 165 mg/l NH_4NO_3 , 750 mg/l glutamiini, 0,4 mg/l tiamiini, 100 mg/l inositooli, 1 mg/l NAA, 1 mg/l IAA, 1 mg/l IBA, 1,25 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g/L agarit ja pH-ga 5,8. Regeneereunud taimed, kui juured olid piisavalt pikad (alates 2 cm), potistati mulda. Regenerantide puhul kasutati sama substraati ja kasvutingimusi nagu emataimede kasvatamisel, kuid lampide valguse režiim oli 18h valgust ja 6h pimedust. Esimese nädala olid taimed isoleeritud keskkonnas välise kasvukeskkonnaga kohanemiseks.

Nakatatud embrüote ja nendest kalluste arenemiseks oli kasutusel selektiivtassid, millele oli lisatud antibiootikumid 150 mg/l tikartsilliini agrobakteri kasvamise takistamiseks ja 50 mg/l hügromütsiini transgeensete taimede arenguks, millel on tekkinud hügromütsiini resistentsus. Siirde tasside ja regeneratsiooni purkide puhul oli söötmele lisatud antibiootikume vähem, 80 mg/l tikartsilliini ja 25 mg/l hügromütsiini.

4. Tulemused

4.1. Agrobakteri GV3101 transformatsioon pICSL11059 plasmiidiga

Selleks, et teostada odra ebaküpsete embrüote agrobakteriga nakatamise katset, viidi läbi agrobakteri transformatsiooni etapp binaarse plasmiidiga pICSL11059 (lisa 1). See plasmiid on kaks korda väiksem CRISPR-Cas9 puhul kasutatavatest binaarsetest vektoritest ning omab taimede selektsioonimarkerina hüpromütsiini resistentsuse geeni. Esmalt loodi agrobakteri tüve GV3101 kompetentsed rakud. Seejärel elektroporeeriti rakke plasmiidiga pICSL11059 ning kontrolliti kaheksal koloonial konstrukti olemasolu (joonis 1). PCR'il amplifitseeriti plasmidi T-DNA regioonist 325 bp pikkune fragment praimeritega 35S-F ja Hygr-R. Geelektroforeesi pildilt võib välja lugeda, et kõigis väljavalitud kolooniates oli olemas lisatud plasmiid (joonis 1).



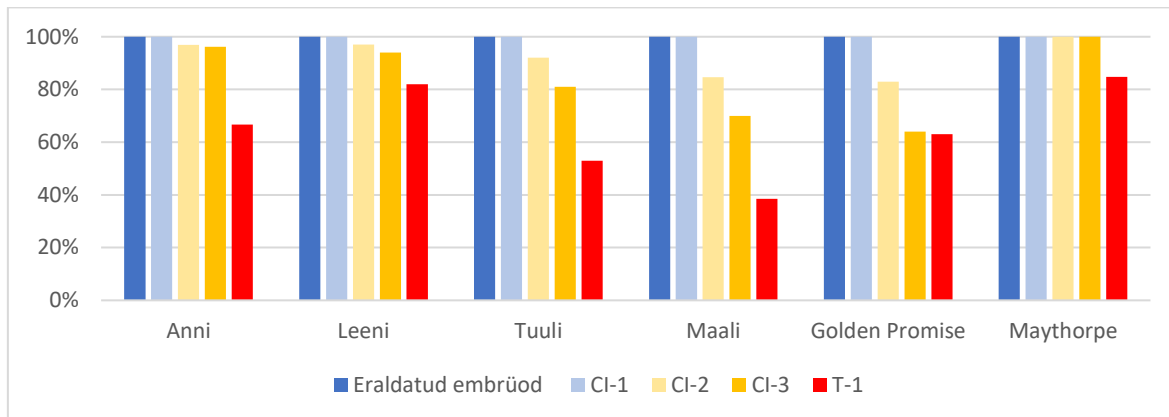
Joonis 1. Geelipilt agrobakteri kaheksast kolooniast. Rajal 1 on Solis BioDyne 1 kb DNA redel, radadel 6-13 on agrobakteri kolooniad, mis sisaldavad fragmenti plasmiidist pICSL11059 pikkusega 325 bp ja rajal 14 oli MilliQ vesi. Radadel 2-5 ja 15 on töö katsesse mittepuutuvad proovid.

4.2. Embrüogeensete kalluste induktsiooni efektiivsus

Töö esimeseks eesmärgiks oli määrata Eestis aretatud sortide kalluste induktsiooni efektiivsus ning võrrelda seda mudelsordiga 'Golden Promise' ning tema vanemsordiga 'Maythorpe'. Esmalt analüüsiti kalluse induktsiooni efektiivsust nakatamata embrüotest, et kindlaks teha, kas Eesti suviotra sortidele on omane regeneratsiooni võimekus. Seejärel analüüsiti ka agrobakteriga nakatatud embrüote arengut, et kindlaks teha need sordid, mille embrüoid oleks võimalik agrobakteri abil transformeerida.

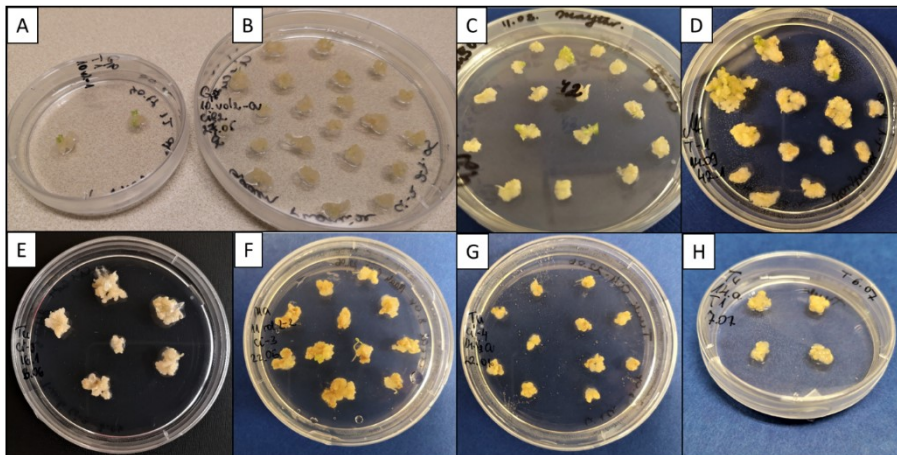
Nakatamata embrüote puhul toimus embrüogeensete kalluste areng kõikidel katses olnud odrasortidel. Kõige efektiivsema kalluse induktsiooniga oli sort 'Maythorpe', mille 85% eraldatud embrüotest andsid kallust (joonis 2) ehk 79 eraldatud embrüost kasvas 67 embrüogeenset kallust (lisa 2). Väga hea kalluse induktsiooni efektiivsusega oli ka Eesti suvioder 'Leeni', mille 82% eraldatud embrüotest andsid kallust (joonis 2) ehk 100 eksplantaadist kasvas 82 embrüogeenset kallust (lisa 2). Keskmise kalluse induktsiooni efektiivsusega olid 'Golden Promise' ja Eesti suvioder 'Anni', vastavalt 63% ja 67% (joonis 2) ehk nende embrüotest initsieeritud kalluste arv oli vastavalt

63 tk 100-st ja 88 tk 132-st (lisa 2). Madalam kalluse kasvu efektiivsus oli Eesti suviodral 'Tuuli' (53%) ja Eesti suviodral 'Maali' oli kõige väiksem kalluste osakaal (38%) (joonis 2). 'Maali' puhul eraldati 130 embrüot, millest arenes 50 indutseeritud embrüogeenset kallust (lisa 2). 'Maythorpe' ja 'Leeni' olid efektiivsema kalluse induksiooniga kui mudelsort 'Golden Promise', esimene neist oli tema vanem ja teine tema teise põlvkonna järglane.



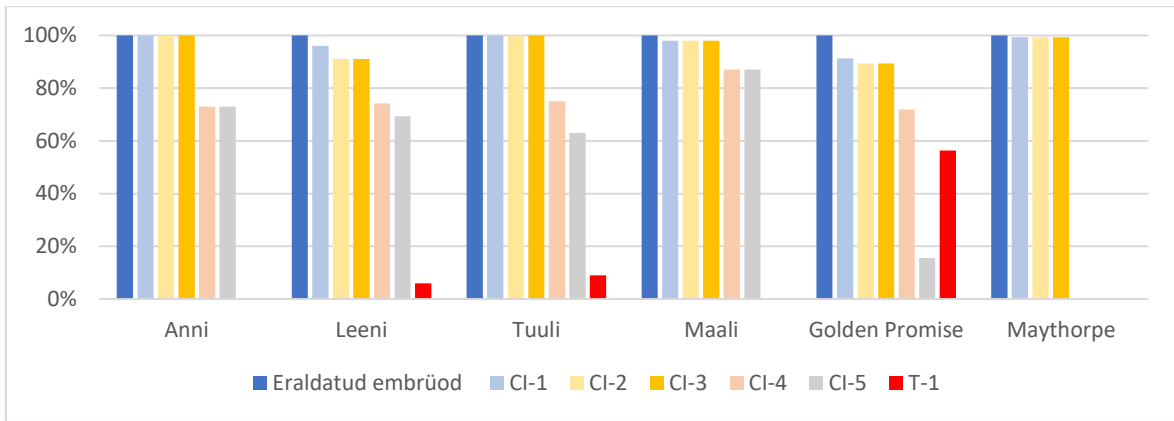
Joonis 2. Nakatamata embrüote ja embrüogeensete kalluste suhteline arv erinevatel söötmetel sortide võrdluses. CI – kalluseinduktsiooni söötmed, T – siirdesööde

Lisaks embrüogeensete kalluste induksiooni efektiivsusele, hinnati ka kalluste arengut visuaalselt. Kalluseid pildistati erinevates ajapunktides ning peeti järge nende arengule, vastavalt ülevaatlilikule tabelitele (joonis 2, 3). Nakatamata embrüote puhul kalluse kultuuri initsieerimise efektiivsus oli hea, aga nende kasv oli erinev (joonis 3). Näiteks joonise 3 pilt G 'Tuuli' 61 päeva vanused kallused on sama suured kui 'Golden Promise' 18 päeva vanused (joonis 3, pilt B) ja 'Maythorpe' 27 päeva vanused kallused (joonis 3, pilt C). Kuid samas osad 'Tuuli' kallused kasvasid hästi, olles 28 päeva vanuselt (joonis 3, pilt E) suuremad kui praktiliselt sama vanad 'Maythorpe' kallused (joonis 3, pilt C). Vastavalt protokollile „Agrobakteri vahendatud odra ebaküpsete embrüote transformatsioon“ (Hinchliffe and Harwood 2019), kasvasid kallused kuni 42 päeva kalluse induksiooni söötmel ja siis viidi üle siirdesöötmele. Olenevalt roheliste kasvude eksisteerimisest või nende suurusest, viidi kalluseid siirdesöötmele ka varem (joonis 3, pildid A ja B) või hiljem (joonis 3. pildid G ja H). Joonise 3 pildi H kallustest üks andis kaks regeneranti ja teine andis ühe regenerandi (lisa 3).



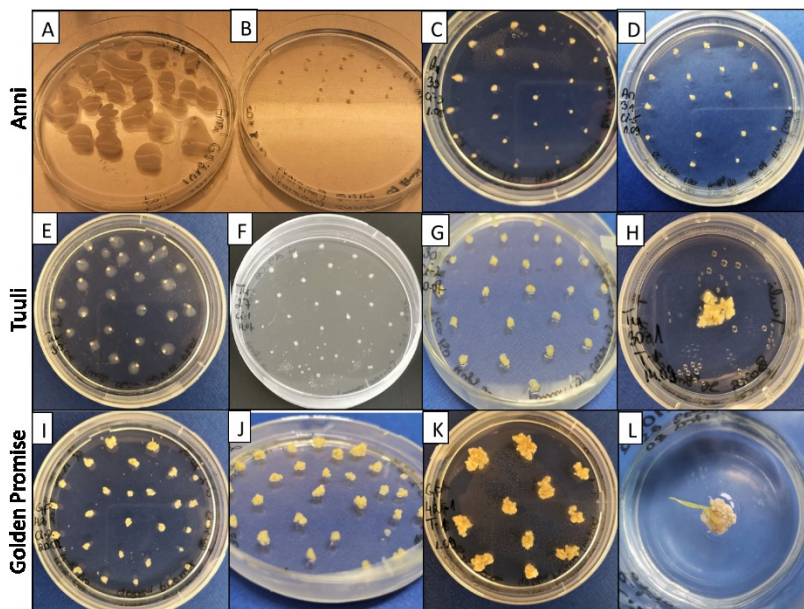
Joonis 3. Nakatamata kalluste areng erinevate suviotra sortide puhul: (A) 18 päeva vanused 'Golden Promise' regeneratiivsete kalluste üleviimine siirdesöötmele, (B) 18 päeva vanused 'Golden Promise' embrüogeensed kallused kalluse induktsiooni söötmel CI-2, (C) 27 päeva vanused 'Maythorpe' embrüogeensed kallused kalluse induktsiooni söötmel CI-2, (D) 61 päeva vanused 'Maythorpe' embrüogeensed kallused siirdesöötmel T-1 (34 päevane areng võrreldes pildiga C), (E) 28 päeva vanused 'Tuuli' embrüogeensed kallused kalluse induktsiooni söötmel CI-3, (F) 42 päeva vanused 'Maali' embrüogeensed kallused kalluse induktsiooni söötmel CI-3, (G) 61 päeva vanused 'Tuuli' embrüogeensed kallused kalluse induktsiooni söötmel CI-4, (H) 62 päeva vanused 'Tuuli' embrüogeensed kallused siirdesöötmel T-1.

Seejärel uuriti embrüogeensete kalluste arengut agrobakteriga nakatatud odra ebaküpsetest embrüotest. Esimesena paistis silma, et kalluste indutseerimise efektiivsus oli palju madalam embrüote nakatamise puhul kui nakatamata embrüote puhul. Embrüogeensete kalluste areng agrobakteriga nakatamise korral oli sorditi väga erinev (joonis 4). See erines ka oluliselt sordi piires mittenakatatud embrüogeensetest kallustest (joonis 2, 4). Mudelsordi 'Golden Promise' puhul oli näha head kalluse induktsiooni efektiivsust nii nakatamata embrüotest (63%) (joonis 2) kui ka nakatatud embrüotest (56%) (joonis 4). Samuti selgus, et odrasordid 'Anni', 'Maali' ja 'Maythorpe' ei allunud transformatsioonile ja et ühtegi embrüogeenset kallust ei kasvanud ehk ei olnud midagi üle viia siirdesöötmele T-1 (joonis 4). Kuid neid sorte viidi üle kalluse induktsiooni söötmetele CI-4 ja CI-5, et vaadelda, kas pikendatud ajaperioodil mingeid muutusi esineb, kuid embrüote edasist arengut ei toimunud (joonis 5 A-D). Suviotrade 'Tuuli' ja 'Leeni' puhul toimus vähesel määral kalluse induktsioon (joonis 4). 'Tuuli' 100-st eraldatud ja nakatatud embrüost kasvas 9 embrüogeenset kallust ja 'Leeni' kasvatas 101-st 6 kallust (lisa 4).



Joonis 4. Nakatatud embrüote ja embrüogeensete kalluste suhteline arv erinevatel söötmetel sortide võrdluses. CI – kalluseinduktsiooni söötmed, T – siirdesööde

Nagu jooniselt 5 vaadelda saab, siis agrobakteriga nakatatud embrüote puhul on kalluse induksioon sorditi väga erinev. 'Anni' on tõrges odrasort agrobakteri vahendatud transformatsioonile (joonis 5A-D) ja tema puhul ei toimunud kalluse induksiooni isegi 100 päeva vältel (joonis 5D). Sama toimus ka odrasortidega 'Maali' ja 'Maythorpe' (joonis 4). 'Tuuli' (joonis 5E-H) ja 'Leeni' puhul toimus aga kalluse induksioon. 'Tuuli' nakatatud embrüod arenesid edasi ja 28. päeval oli näha kalluse kasvamist (joonis 5G) ja mõnest arenesid embrüogeensed kallused (joonis 5H). 'Golden Promise' mudelsordina näitas vastuvõtlikkust agrobakteri vahendatud transformatsioonile (joonis 5I-L), et 24 päeva vanused kallused olid suuremad kui 'Tuuli' 28 päevased kallused (joonis 5 J ja G). Siirdesöötmel üle viidavaid embrüogeenseid kalluseid 'Golden Promise' puhul oli 58 (lisa 4) ning need kasvasid efektiivselt (joonis 5 K).



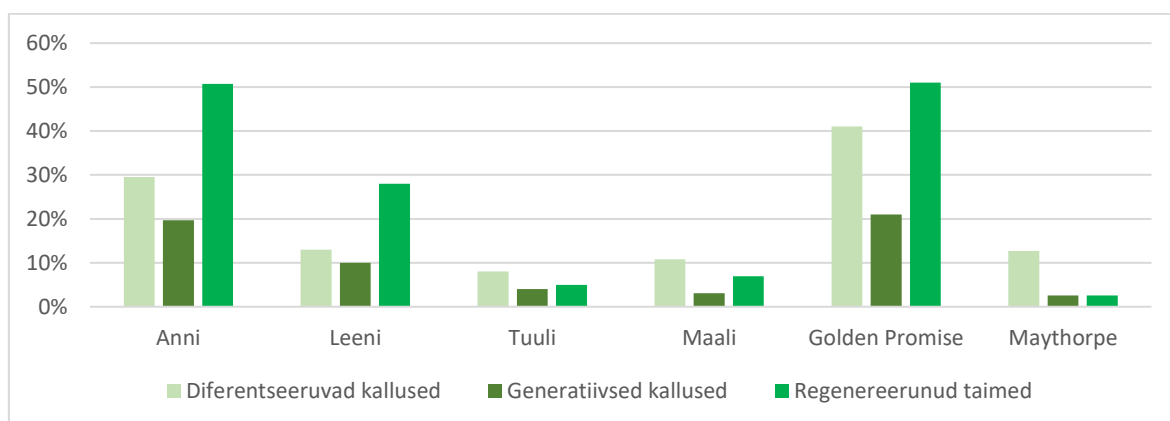
Joonis 5. Nakatatud kalluste areng suviodra sortide 'Anni', 'Tuuli' ja 'Golden Promise' puhul: (A) 3 päeva agrobakteriga (1,13 OD₆₀₀) kokultiveeritud embrüod, (B) selektiivsele söötmele CI-1 üle viidud nakatatud embrüod, (C) 28 päeva vanused nakatatud embrüod selektiivsöötmel CI-3, (D) 105 päeva vanused nakatatud embrüod selektiivsöötmel CI-5, (E) 3 päeva agrobakteriga (0,8 OD₆₀₀)

kokultiveeritud embrüod, (F) selektiivsöötmele CI-1 üle viidud embrüod, (G) 24 päeva vanused nakatatud embrüod selektiivsöötmel CI-2, (H) 68 päeva vanune kallus selektiivsel siirde söötmel T-1, (I) 12 päeva vanune nakatatud kallus selektiivsöötmel CI-2, (J) 24 päeva vanune nakatatud kallus selektiivsöötmel CI-2, (K) 55 päeva vanune kallus selektiivsel siirde söötmel T-1, (L) 94 päeva vanune nakatatud võrsega regeneratiivne kallus selektiivsel regeneratsiooni söötmel R-1.

4.3. Regeneratsiooni efektiivsus

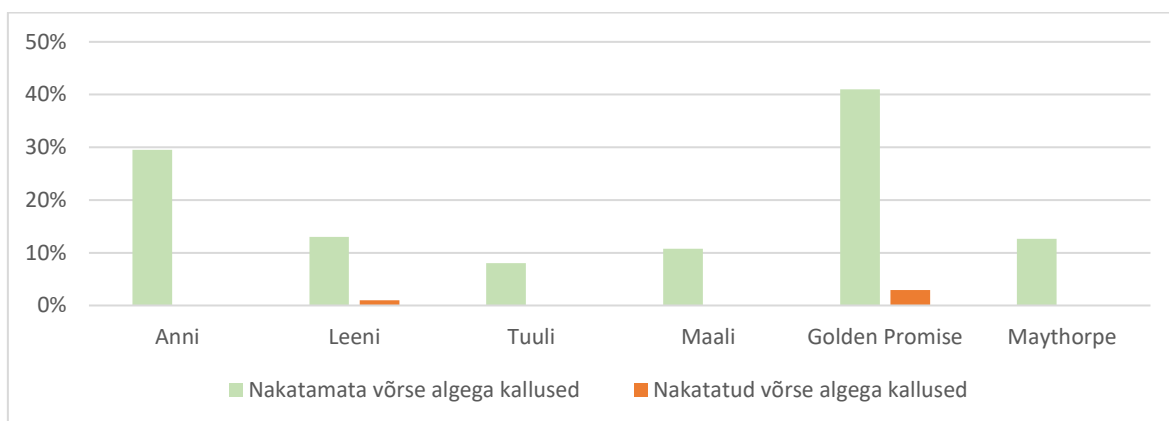
Agrobakteriga transformeerimise edukus sõltub saadud regenerantide arvust. Seega on transformatsiooni efektiivsuse hindamiseks vajalik analüüsida ka regeneratsiooni võimekust nakatamata embrüote korral (joonis 6). Kuigi regeneratsiooni söötmele üle viidavaid diferentseeruvaid kalluseid oli tunduvalt rohkem kui generatiivseid kalluseid, saab siiski öelda, et regeneratsiooni efektiivsus oli hea ehk kõikide katses olnud sortide ebaküpsetest embrüotest saadi regenerante (joonis 6, lisa 5).

Kui nakatamata embrüote puhul proportsionaalne kalluse arenemise efektiivsus oli kõrgeim odrasortidel 'Leeni' ja 'Maythorpe' (joonis 2), siis regeneratsiooni efektiivsus oli suurim odrasortidel 'Golden Promise' (21%) ja 'Anni' (20%) (joonis 6). 'Golden Promise' puhul saadi 51 regeneranti (lisa 5, 6) ehk 2,4 taime regeneratiivse kalluse kohta (lisa 6). 'Anni' puhul oli regeneereunud taimi 67 (lisa 5, 6), mis teeb 2,6 taime regeneratiivse kalluse ja kohta (lisa 6). Mõlema puhul oli aga regeneratsiooni efektiivsus sama, kui vaadelda taimede arvu eraldatud embrüote kohta (0,51) (lisa 6). Seevastu oli 'Maythorpe', mis oli efektiivseima kalluse induksiooniga odrasort (joonis 2), regeneratsiooni efektiivsus oli kõige madalam (3%) (joonis 6). 'Maythorpe' andis häid embrüogeenseid kalluseid nagu on näha jooniselt 3C-D, kuid lõpptulemuseks oli vaid 2 regeneranti (lisa 5, 6). Vaadeldes 'Leeni' proportsionaalset võsundite formatsiooni sagedust, siis see oli 28% (joonis 6). Kuid 10 generatiivset kallust andis 28 taime (lisa 5), mis aga teeb ühe generatiivse kalluse kohta 2,8 taime (lisa 6). Seega kalluse põhine regeneratsiooni efektiivsus on kõrgeim odrasordi 'Leeni' puhul (lisa 6). Odrasortide 'Maali' ja 'Tuuli' proportsionaalne võsundi formatsiooni sagedus oli madal, vastavalt 7% ja 5% (joonis6). Kuid vaadeldes saadud taimede arvu generatiivse kalluse kohta, siis 'Maali' (2,3) regeneratsiooni efektiivsus oli tunduvalt kõrgem 'Tuuli' omast (1,3; lisa 6).



Joonis 6. Nakatamata embrüote regeneratsiooni võimekus sortide võrdluses. Üks kallus võib anda rohkem kui ühe taime.

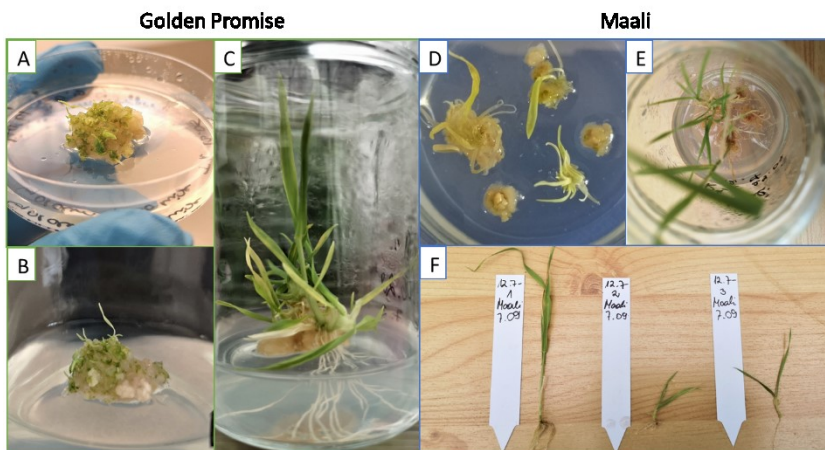
Nakatatud embrüote puhul oli generatiivsete kalluste areng oluliselt madalam kui nakatamata embrüote puhul (joonis 7). Kui sordi 'Golden Promise' puhul andsid mittenakatamise korral võrse algeid 41% kallustest (joonis 6, 7), siis agrobakteriga nakatades andsid võrse algeid kõigest 3% kallustest (joonis 7). See on pea 14-kordne regeneratsiooni võimekuse langus. Nelja sordi puhul ('Anni', 'Tuuli', 'Maali', 'Maythorpe') ei tekkinud ühtegi diferentseeruvat kallust nakatatud embrüotest (joonis 7, lisa 7). Seega on nimetatud sordid väga tõrksad agrobakteri T-DNA sisestamisele genoomi ehk agrobakteri vahendatud transformatsioonile. Ainsa Eestis aretatud sordina andis nakatatud embrüotest võrse algeid suviadra sort 'Leeni' (1%), mis oli 3 korda madalam regeneratsioonivõimekus kui standardsordil 'Golden Promise'. 'Leeni' puhul sai üle viia selektiivsele regeneratsiooni söötmele ainult ühe diferentseeruva kalluse ja 'Golden Promise' puhul kolm diferentseeruvat kallust (lisa 7), millest ühte on näha ka joonisel 5L.



Joonis 7. Regeneratsiooni söötmele üle viidud diferentseeruvad kalluste (võrse algega) suhteline arv nakatamata ja nakatatud embrüote korral sortide võrdluses.

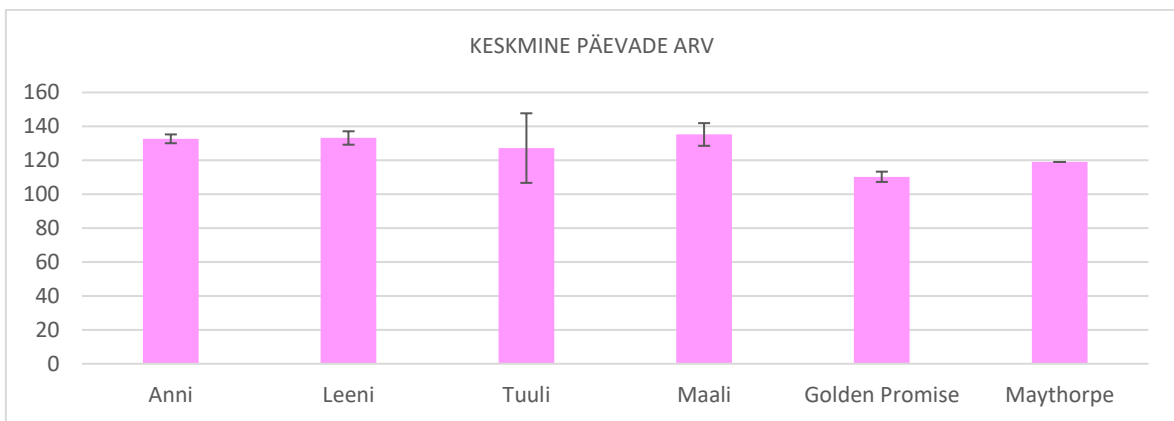
4.4. Regeneratsiooniaeg

Regeneratsiooni efektiivsust saab mõõta ka ajakuluga, mille jooksul toimus taime regeneratsioon. Selleks kuluv aeg oli sortide võrdluses väga erinev. Ebaküpsetest odraseemne embrüotest uuteks taimedeks areng toimus 'Golden Promise' puhul ühel juhul 96 päevaga (joonis 8A-C) ja 'Maali' ühe embrüo puhul 152 päevaga (joonis 8 D-F). See teeb regeneratsiooni erinevuseks peaaegu 56 päeva. Kogu katse kõige lühema ja pikima regeneratsiooni vahe oli 131 päeva. 'Golden Promise' oli kõige lühema (67 päeva) (joonis 3A-B, lisa 3) ja 'Tuuli' oli pikima (198 päeva) regeneratsiooni ajaga (lisa 3). Kui aga vaadelda keskmist päevade arvu sortide võrdluses, siis erinevus nii suur pole (joonis 9).



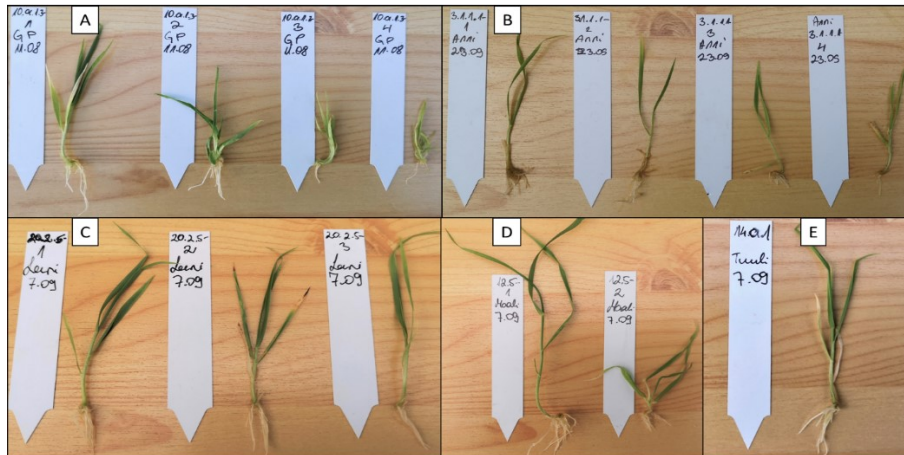
Joonis 8. Embrüogeensete kalluste regeneratsioon sortide 'Golden Promise' ja 'Maali' võrdluses: (A) 63 päeva vanune regeneratiivne kallus siirdesöötmel (kalluse nr 7.1), (B) regeneratsiooni söötmele üle viidud regeneratiivne kallus, (C) 96 päeva vanune regeneratsiooni söötmel kasvanud regeneratiivne taim, (D) 112 päeva vanusest kallusest eraldi jaotatud regeneratiivsed kallused regeneratsiooni söötmel, (E) 152 päeva vanused regeneratsiooni söötmel ühest kallusest arenenud võrsed, mille kasvuaeg oli 40 päeva, (F) kallusest ja söötimest puhastatud võrsed.

Efektivseima regeneratsiooni ajaga oli mudelsort 'Golden Promise' (110 ± 3 päeva) (joonis 9). Kuigi tema vanem odrasort 'Maythorpe' oli lähedase 119 päevase regeneratsiooni ajaga, siis seda ei saa arvestada, kuna regenereerunud taimi oli vaid kaks tükki (lisa 5, 6). Kõige varieeruvama regeneratsiooni ajaga oli Eesti odrasort 'Tuuli' varieerudes 87 – 198 päeva vahel (127 ± 21 päeva) (lisa 3, joonis 9). Odrasordid 'Anni', 'Leeni' ja 'Maali' regeneratsiooni ajad olid omavahel lähedased, vastavalt 133 ± 3 , 133 ± 4 ja 135 ± 7 päeva (joonis 9).



Joonis 9. Nakatamata embrüogeensetest kallustest arenenud taimede regeneratsiooniks läinud päevade arv sortide võrdluses.

Kokkuvõtvalt, kõigi katses olnud odrasortide puhul toimus regeneratsioon nakatamata ebaküpssetest embrüotest (joonis 10). Agrobakteriga nakatatud ebaküpssetest embrüotest ei regenereerunud ühtegi taime ühegi sordi puhul (lisa 7).



Joonis 10. Regenerandid nakatamata embrüotest sortide võrdluses: (A) Golden Promise 94 päeva vanused kallusest ja söötimest puhastatud taimed, (B) Anni 120 päeva vanused kallusest ja söötimest puhastatud taimed, (C) Leeni 132 päeva vanused kallusest ja söötimest puhastatud taimed, (D) Maali 152 päeva vanused kallusest ja söötimest puhastatud taimed, (E) Tuuli 124 päeva vanused kallusest ja söötimest puhastatud taimed.

5. Arutelu

Käesoleva töö praktiline pool põhines A. Hinchliffe ja W. A. Harwood „Agrobacterium-Mediated Transformation of Barley Immature Embryos“ 2019. aastal avaldatud protokollil. Kuna see protokoll on optimeeritud 'Golden Promise' nakatamiseks agrobakteri tüvega AGL1, siis võis võimalik olla, et see polnud sobilik Eesti odrasortide ega ka 'Golden Promise' nakatamiseks agrobakteri tüvega GV3101. Seega, võiks edaspidistest eksperimentides katsetada erinevate söötmete ja regeneratsiooni süsteemidega. Antud töös oli fütageeli asemel kasutuses fütogaar. Edaspidiste katsete puhul võiks proovida erinevate tardainetega nagu gelriit, fütageel, agar ja tärglised ning hinnata nende mõju kalluste kasvule ja regeneratsioonile.

Roheliste võrsete madal esinemine võis tingitud olla ka vase ühendi madalast kontsentratsioonist. Antud töös oli $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kontsentratsioon 1,25 mg/l ehk CuSO_4 0,8 mg/l. See teeb molaarseks kontsentratsiooniks 5 μM , mis võib olla liiga madal mõne genotüübi jaoks. Varasemast on teada, et sobivaim vase kontsentratsioon söötmes varieerub 5-50 μM CuSO_4 sõltuvalt odra sordist (Dahleen 1995). Edaspidistes regeneratsiooni katsetes Eesti odra sortidega võiks katsetada kõrgeimaid vaseühendi kontsentratsioone.

Kalluse kasv sõltub nii eraldatud embrüo suurusest kui ka kasvu ja stressi tingimustest. Nakatatud embrüote transformatsiooni vähenenud efektiivsus võis seisneda selles, et embrüod olid liiga väikesed, kuna eraldatud ebaküpsete embrüote diameeter jäi 0,5-1,5 mm vahemikku ning embrüonaalset telge ei eemaldatud (Tingay et al. 1997). Ka nakatamata embrüote puhul oli näha, et väiksemad embrüod kasvatasid küll kallust, kuid selle mõõtmed olid võrdlemisi väikesed ning vähesed nendest andsid taimi. Edaspidi saaks teha ka võrdlevat agrobakteriga nakatamise katset. Ühe ja sama agrobakteri tüvega nakatatakse suuremaid ebaküpseid embrüoid, mille mõõtmed jääksid vahemikku 1,5-2,0 mm ja millelt on eemaldatud embrüonaalne telg, ning väiksemaid ebaküpseid embrüoid, mille mõõtmed jääksid vahemikku näiteks 0,5-1,0 mm ja millelt pole eemaldatud embrüonaalset telge.

Samuti oleks soovitatav katsetada teisigi transformatsiooni meetodeid odra transformeerimiseks: kalluse nakatamine, mikrospooride nakatamine, biolistiline transformatsioon, mikrosüstimine. Lisaks võiks kasutada erinevaid agrobakteri tüvesid (AGL1, GV3101, LBA4404), millel on sama binaarne vektor. Katsesse võiks võtta rohkem Eestis kasvatatavaid odrasorte. Transformatsiooni edukuse mõjutamiseks võiks kaasata T-DNA'sse transformatsiooni vastuvõtlikust tõstvaid komponente, näiteks *Growth-Regulating Factor 4* (GRF4) ja selle kofaktor *GRF-Interacting Factor 1* (GIF1) (Debernardi et al. 2020).

Käesolev bakalaureuse töö saaks olla aluseks ühtseks, eestikeelse labori protokollide kokku panemiseks, mis oleks odra transformatsiooni kohta. See võimaldaks rakendada loodavat protokollid sordiaretuses ühe täppisaretuse tööriistana, et kutsuda uues sordis esile üksikuid soovitavaid mutatsioone ning kindlaid tunnuseid. Kliima ja keskkonna aina kiirem muutumine nõuab ka üha uusi kliimakoostunud sorte, mida on vaja aretada üha lühema ajaga. Täppisaretuse meetodid saavad siinkohal olla üheks vahendiks.

6. Kokkuvõte

Oder (*Hordeum vulgare*) on ülemaailmselt ja ka Eestis oluline teravili. Aastate jooksul on Eestis aretatud häid odrasorte nagu 'Anni', 'Leeni', 'Maali' ja 'Tuuli'. Uute täppisaretustehnikate näiteks CRISPR/Cas rakendamisel on selgunud, et Eesti odrasortide puhul *Agrobacterium tumefaciens* vahendatud transformatsioon ei õnnestu. Osadel sortidel toimus kalluse induktsioon kuid ükski ei regenereerunud. Regeneratsioon kalluskultuurist taimeks on võtmetähtsusega ja oluline etapp suviotra agrobakteri vahendatud transformatsiooni meetodi juures. Suviotrade regeneratsiooni võimekus ja efektiivsus sõltub genotüübist, söötme koostisest, embrüo suuruselt ja muudest faktoritest.

Käesolevas töös võrreldi nelja Eestis aretatud suviotra sordi kalluse induktsiooni efektiivsust mudelsordiga 'Golden Promise' ja tema vanemsordiga 'Maythorpe' nii nakatamata kui ka nakatatud embrüote korral. Lisaks võrreldi regeneratsiooni efektiivsust ja aega nakatamata embrüote korral sortide kaupa. Töö jaoks eraldati kuuest odrasordist kokku 1330 ebaküpset embrüot.

Nakatamata embrüote puhul toimus embrüogeensete kalluste areng kõikidel katses olnud odrasortidel. Kõige efektiivsema kalluse induktsiooniga oli sort 'Maythorpe', mille 85% eraldatud embrüotest andsid kallust ja kõige madalama efektiivsusega oli Eesti odrasort 'Maali' (vastavalt 38%). Kalluste indutseerimise efektiivsus oli palju madalam embrüote agrobakteriga nakatamise puhul kui nakatamata embrüote puhul. Nakatatud embrüote puhul toimus kalluse induktsioon kolmel sordil kuuest, mudelsordil 'Golden Promise' (56%) ning Eesti sortidel 'Leeni' (6%) ja 'Tuuli' (9%).

Kõikide katses olnud odrasortide puhul toimus regeneratsioon nakatamata ebaküpsetest embrüotest. Efektiivseima regeneratsiooniga olid 'Golden Promise' (51%) ja 'Anni' (51%) ning madalaima efektiivsusega oli 'Maythorpe' (3%). Agrobakteriga nakatatud ebaküpsetest embrüotest ei regenereerunud ühtegi taime ühegi sordi puhul. Nakatatud embrüotest arenes diferentseerunud kalluseid ainult mudelsordil 'Golden Promise' (3%) ja Eesti sordil 'Leeni' (1%).

Töö jooksul selgus, et agrobakteriga vahendatud transformatsiooni efektiivsus sõltub genotüübist ja on mõjutatav mitmetest protokollide komponentidest nagu söötmete koostised ja embrüo suurus. Lisaks oleks soovitatav katsetada teisi transformatsiooni meetodeid odra transformeerimiseks: kalluse nakatamine, mikrospooride nakatamine, biolüstiline transformatsioon või mikroüstimine.

7. Tänuavaldused

Tänan eriti kõiki oma juhendajaid nende panuse eest käesoleva bakalaureuse töö valmimisele. Tänan Maria Cecilia Sarmiento Guerin, kelle abiga sai tööst terviklik kirjatükk. Tänan Ljudmilla Timofejevat praktilise ja kirjaliku osa juhendamise eest. Tänan Liina Jakobsoni kirjaliku osa juhendamise eest. Tänan Kristiina Laanemetsa tõuke andmises poolelijäänud õpingute lõpetamiseks. Tänan Tallinna Tehnikaülikooli õpingute lõpetamise võimaluse eest. Tänan Eesti Taimekasvatuse Instituuti ja Maaelu Teadmuskeskust õpingute toetamise eest. Tänan METK Taimebiotehnoloogia osakonda katsematerjali eest. Tänan oma venda Einar Ilvest, kes aitas tööd üle vaadata.

8. Kasutatud kirjandus

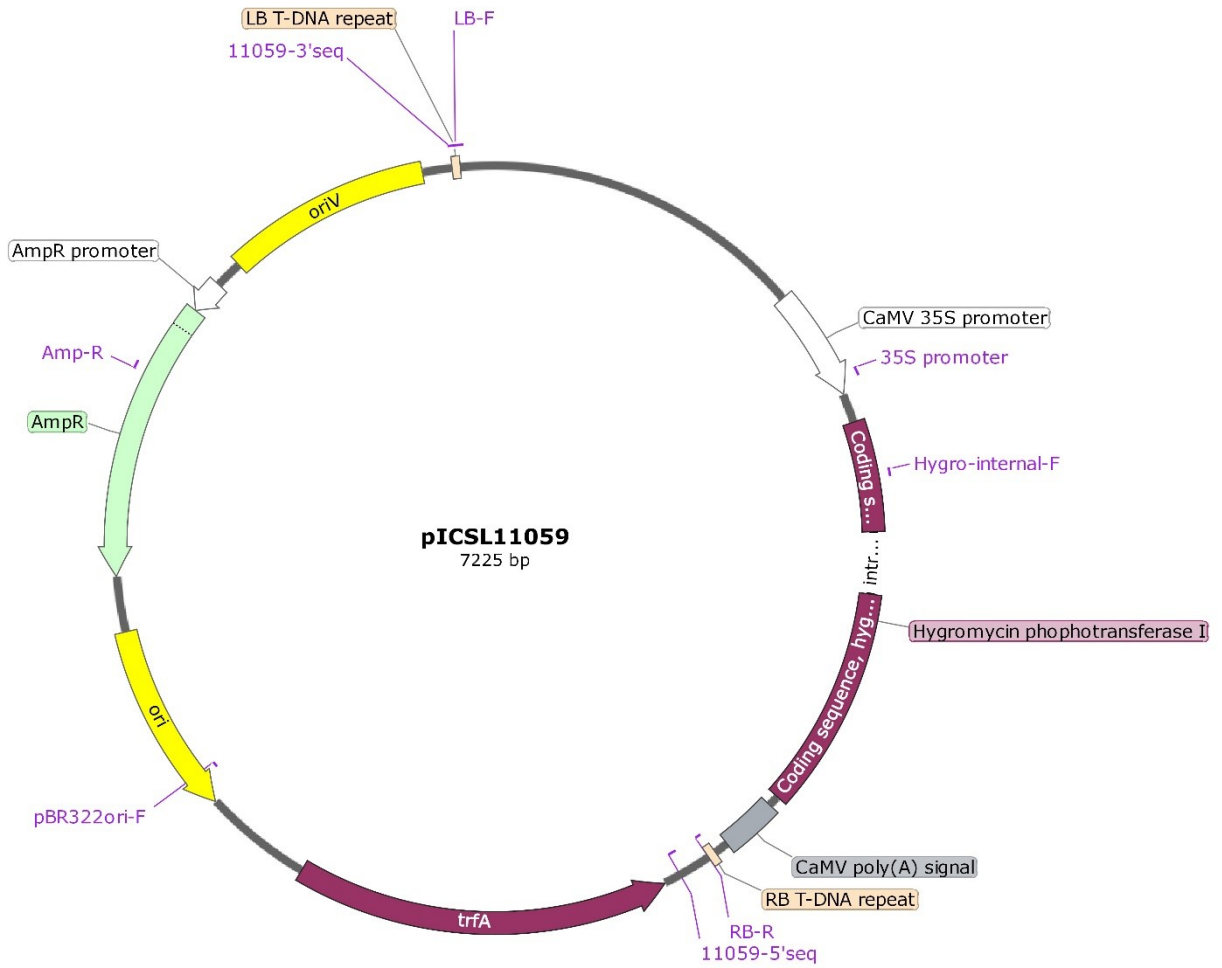
- Chang, Y., J. von Zitzewitz, P. M. Hayes, and T. H. H. Chen. 2003. "High Frequency Plant Regeneration from Immature Embryos of an Elite Barley Cultivar (*Hordeum Vulgare* L. Cv. Morex)." *Plant Cell Reports* 21 (8): 733–38. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0607-8>.
- Chetty, V. J., N. Ceballos, D. Garcia, J. Narváez-Vásquez, W. Lopez, and M. L. Orozco-Cárdenas. 2013. "Evaluation of Four *Agrobacterium Tumefaciens* Strains for the Genetic Transformation of Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) Cultivar Micro-Tom." *Plant Cell Reports* 32 (2): 239–47. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1358-1>.
- Dahleen, Lynn S. 1995. "Improved Plant Regeneration from Barley Callus Cultures by Increased Copper Levels." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43 (3): 267–69. <https://doi.org/10.1007/BF00039954>.
- Debernardi, Juan M., David M. Tricoli, Maria F. Ercoli, Sadiye Hayta, Pamela Ronald, Javier F. Palatnik, and Jorge Dubcovsky. 2020. "A GRF–GIF Chimeric Protein Improves the Regeneration Efficiency of Transgenic Plants." *Nature Biotechnology* 38 (11): 1274–79. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0703-0>.
- Harwood, Wendy A. 2014. "A Protocol for High-Throughput *Agrobacterium*-Mediated Barley Transformation." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1099: 251–60. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_20.
- Hensel, Goetz, and Jochen Kumlehn. 2019. "Genome Engineering Using TALENs: Methods and Protocols." In *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1900:195–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7_13.
- Hinchliffe, Alison, and Wendy A. Harwood. 2019. "Agrobacterium-Mediated Transformation of Barley Immature Embryos." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1900: 115–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7_8.
- Jähne, A., D. Becker, R. Brettschneider, and H. Lörz. 1994. "Regeneration of Transgenic, Microspore-Derived, Fertile Barley." *Theoretical and Applied Genetics* 89 (4): 525–33. <https://doi.org/10.1007/BF00225390>.
- Kumlehn, Jochen, Liliya Serazetdinova, Goetz Hensel, Dirk Becker, and Horst Loerz. 2006. "Genetic Transformation of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) via Infection of Androgenetic Pollen Cultures with *Agrobacterium Tumefaciens*." *Plant Biotechnology Journal* 4 (2): 251–61. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x>.
- Lawrenson, Tom, and Wendy A. Harwood. 2019. "Creating Targeted Gene Knockouts in Barley Using CRISPR/Cas9." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1900: 217–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7_14.
- Lazzeri, P. A. 1995. "Stable Transformation of Barley via Direct DNA Uptake. Electroporation- and PEG-Mediated Protoplast Transformation." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 49: 95–106. <https://doi.org/10.1385/0-89603-321-X:95>.
- Lee, Lan-Ying, and Stanton B. Gelvin. 2008. "T-DNA Binary Vectors and Systems." *Plant Physiology* 146 (2): 325–32. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>.
- Narusaka, Yoshihiro, Mari Narusaka, Satoshi Yamasaki, and Masaki Iwabuchi. 2012. "Methods to Transfer Foreign Genes to Plants." In *Transgenic Plants*, edited by Yelda Özden Çiftçi, Ch. 9. Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32773>.
- Novak, Stephen. 2019. "Plant Biotechnology Applications of Zinc Finger Technology." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1864: 295–310. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_20.
- Ohnoutkova, Ludmila. 2019. "Mutation Breeding in Barley: Historical Overview." In *Barley: Methods and Protocols*, edited by Wendy A. Harwood, 7–19. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7_2.

- Ren, Zhongqing, Qin Liao, Xheni Karaboja, Ian S. Barton, Eli G. Schantz, Adrian Mejia-Santana, Clay Fuqua, and Xindan Wang. 2022. "Conformation and Dynamic Interactions of the Multipartite Genome in *Agrobacterium Tumefaciens*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119 (6): e2115854119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115854119>.
- Serhantova, V., J. Ehrenbergerova, and L. Ohnoutkova. 2004. "Callus Induction and Regeneration Efficiency of Spring Barley Cultivars Registered in the Czech Republic." *Plant, Soil and Environment* 50 (10): 456–62.
- Sung, Shi-Joon, Sang Hyun Min, Kuk Young Cho, Seongnam Lee, Youn-Jin Min, Young Il Yeom, and Jung-Ki Park. 2003. "Effect of Polyethylene Glycol on Gene Delivery of Polyethylenimine." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26 (4): 492–500. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.492>.
- Tiidema, Anu, and Erkki Truve. 2004. "Efficient Regeneration of Fertile Barley Plants from Callus Cultures of Several Nordic Cultivars." *Hereditas* 140 (3): 171–76. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01757.x>.
- Tingay, Sonia, David McElroy, Roger Kalla, Sarah Fieg, Mingbo Wang, Sarah Thornton, and Richard Brettell. 1997. "Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Barley Transformation." *The Plant Journal* 11 (6): 1369–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061369.x>.
- Townsend, Jeffrey A., David A. Wright, Ronnie J. Winfrey, Fengli Fu, Morgan L. Maeder, J. Keith Joung, and Daniel F. Voytas. 2009. "High-Frequency Modification of Plant Genes Using Engineered Zinc-Finger Nucleases." *Nature* 459 (7245): 442–45. <https://doi.org/10.1038/nature07845>.
- Trifonova, Adelina, Sten Madsen, and Annette Olesen. 2001. "Agrobacterium-Mediated Transgene Delivery and Integration into Barley under a Range of in Vitro Culture Conditions." *Plant Science* 161 (5): 871–80. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00479-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00479-4).
- Van Montagu, M., and P. Zambryski. 2013. "Agrobacterium and Ti Plasmids." In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, edited by Stanley Maloy and Kelly Hughes, 55–57. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01542-4>.
- Wan, Y., and P. G. Lemaux. 1994. "Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants." *Plant Physiology* 104 (1): 37–48. <https://doi.org/10.1104/pp.104.1.37>.
- Wei, Chuanxian, Jiyong Liu, Zhongsheng Yu, Bo Zhang, Guanjun Gao, and Renjie Jiao. 2013. "TALEN or Cas9 – Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications." *Journal of Genetics and Genomics* 40 (6): 281–89. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.013>.
- Wolter, Felix, Patrick Schindele, and Holger Puchta. 2019. "Plant Breeding at the Speed of Light: The Power of CRISPR/Cas to Generate Directed Genetic Diversity at Multiple Sites." *BMC Plant Biology* 19 (1): 176. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1775-1>.
- Zhang, Youjun, Moxian Chen, Beata Siemiatkowska, Mitchell Rey Toleco, Yue Jing, Vivien Strotmann, Jianghua Zhang, Yvonne Stahl, and Alisdair R. Fernie. 2020. "A Highly Efficient Agrobacterium-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species." *Plant Communications* 1 (5): 100028. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100028>.

Lisad

Lisa 1. Plasmidi pICSL11059 kaart

Created with SnapGene®



Lisa 2. Nakatamata embrüogeensete kalluste arv erinevatel söötmetel sortide võrdluses

Sort	Eksplantaat, arv	Kalluste arv söötmetassidel			
		CI-1	CI-2	CI-3	T-1
Anni	132	132	128	127	88
Leeni	100	100	97	94	82
Tuuli	100	100	92	81	53
Maali	130	130	110	91	50
Golden Promise	100	100	83	64	63
Maythorpe	79	79	79	79	67

CI – kalluseinduktsiooni söötmed ja T – siirdesööde. Eraldatud embrüote arv ja kalluste arv CI-1 söötmel on samad, kuna nakatamata embrüote puhul embrüod lähevad kohe CI-1 söötmele kasvama.

Lisa 3. Nakatamata embrüotest saadud taimede arv kalluste ja sortide kaupa

Petri tassi nr	Odra sort	Kalluse number	Taimede arv	Regeneratsiooni aeg, päev	Petri tassi nr	Odra sort	Kalluse number	Taimede arv	Regeneratsiooni aeg, päev
3	Anni	3.1.2	3	120	7	Golden Promise	7.1	5	96
	Anni	3.1.1.1	5	120		Golden Promise	7.2	4	96
	Anni	3.1.1.2	1	137		Golden Promise	7.3	4	112
	Anni	3.1.1.3	1	155		Golden Promise	7.a.1.2	1	105
4	Anni	4.1.1	1	142		Golden Promise	7.a.2	1	112
5	Anni	5.1.1	2	101		Golden Promise	7.a.4	2	105
	Anni	5.1.3	5	147		Golden Promise	7.a.5	4	96
	Anni	5.1.4	3	161	8	Golden Promise	8.1.1.1	2	130
	Anni	5.2.1.2	1	132		Golden Promise	8.2.2	4	115
6	Anni	6.1.4	4	132		Golden Promise	8.2.3.2	3	137
	Anni	6.1.1.1	4	161	9	Golden Promise	9.1.1	1	105
	Anni	6.1.1.2	3	111		Golden Promise	9.2.1	2	119
	Anni	6.1.2.1	2	111		Golden Promise	9.2.2	2	119
	Anni	6.1.2.2	2	132		Golden Promise	9.a.1	1	119
	Anni	6.1.3.2	3	168		Golden Promise	9.a.3	2	119
	Anni	6.1.3.1	1	171	10	Golden Promise	10.1.1	2	67
	Anni	6.2.1	2	101		Golden Promise	10.1.2	1	74
21	Anni	21.1.2	2	112		Golden Promise	10.a.1.1	2	154
	Anni	21.1.3	5	126		Golden Promise	10.a.1.3	4	158
	Anni	21.2.1	1	133		Golden Promise	10.a.1.4	1	84
	Anni	21.2.2	3	136		Golden Promise	10.a.1.5	3	94
	Anni	21.2.3	2	154	17	Leeni	17.1.1.1	1	147
	Anni	21.1.4.1	3	103		Leeni	17.1.2.1	3	154
	Anni	21.1.4.2	2	133		Leeni	17.1.2.2	2	189
	Anni	21.1.5.2	4	119	18	Leeni	18.1.3	3	101
	Anni	21.2.6.1	2	133	19	Leeni	19.2.5	4	132
11	Maali	11.2.1	1	121	20	Leeni	20.1.3.1	5	95
12	Maali	12.1	3	112		Leeni	20.1.3.2	2	132
	Maali	12.5	2	152		Leeni	20.1.4	3	132
	Maali	12.7	3	152		Leeni	20.2.4	2	132
14	Tuuli	a.14.2	2	87		Leeni	20.2.5	3	155
	Tuuli	14.a.1	1	124	42.a	Maythorpe	42.a.2.1.1	1	119
	Tuuli	14.a.2	1	140	42.a	Maythorpe	42.a.2.1.2	1	119
15	Tuuli	15.2.3	1	198					

Lisa 4. Nakatatud embrüote ja embrüogeensete kalluste arv erinevatel söötmetel sortide võrdluses

Sort	Eksplantaat, arv	Embrüote ja kalluste arv söötmetassidel					
		CI-1	CI-2	CI-3	CI-4	CI-5	T-1
Anni	100	100	100	100	73	73	0
Leeni	101	97	92	92	75	70	6
Tuuli	100	100	100	100	75	63	9
Maali	101	99	99	99	88	88	0
Golden Promise	103	94	92	92	74	16	58
Maythorpe	156	155	155	155	0	0	0

CI – kalluseinduktsiooni söötmed ja T – siirdesööde.

Lisa 5. Nakatamata embrüote regeneratsiooni võimekus sortide kaupa

Sort	Eksplantaat, arv	Embrüogeenne kallas, arv	Diferentseeruv kallas, arv	Generatiivne kallas, arv	Taimed, arv
Anni	132	88	39	26	67
Leeni	100	82	13	10	28
Tuuli	100	53	8	4	5
Maali	130	50	14	4	9
Golden Promise	100	63	41	21	51
Maythorpe	79	67	10	2	2

Embrüogeensete kalluste arv näitab kalluse induktsiooni söötmelt siirdesöötmele üle viidavate kalluste hulka. Diferentseeruvate kalluste arv näitab siirdesöötmelt regeneratsiooni söötmele üle viidavate kalluste hulka. Generatiivsete kalluste arv näitab nende kalluste hulka, millest toimus taime regeneratsioon. Taimede arv näitab kõiki saadud taimede hulka odrasordi kohta ja üks kallas võib anda rohkem kui ühe taime.

Lisa 6. Nakatamata kalluste puhul taimede arv regeneratiivse kalluse kohta

Sort	Eksplantaat, arv	Generatiivne kallus, arv	Taimed, arv	Taimi generatiivse kalluse kohta	Taimi eksplantaadi kohta
Anni	132	26	67	2.58	0.51
Leeni	100	10	28	2.80	0.28
Tuuli	100	4	5	1.25	0.05
Maali	130	4	9	2.25	0.07
Golden Promise	100	21	51	2.43	0.51
Maythorpe	79	2	2	1.00	0.03

Generatiivsete kalluste arv näitab nende kalluste hulka, millest toimus taime regeneratsioon. Taimede arv näitab kõiki saadud taimede hulka odrasordi kohta ja üks kallus võib anda rohkem kui ühe taime.

Lisa 7. Nakatatud embrüote regeneratsiooni võimekus sortide võrdluses

Sort	Eksplantaat, arv	Embrüogeenne kallus, arv	Diferentseeruv kallus, arv	Generatiivne kallus, arv	Taimed, arv
Anni	100	0	0	0	0
Leeni	101	6	1	0	0
Tuuli	100	9	0	0	0
Maali	101	0	0	0	0
Golden Promise	103	58	3	0	0
Maythorpe	156	0	0	0	0

Embrüogeensete kalluste arv näitab kalluse induktsiooni söötmelt siirdesöötmele üle viidavate kalluste hulka. Diferentseeruvate kalluste arv näitab siirdesöötmelt regeneratsiooni söötmele üle viidavate kalluste hulka. Generatiivsete kalluste arv näitab nende kalluste hulka, millest toimus taime regeneratsioon. Taimede arv näitab kõiki saadud taimede hulka odrasordi kohta ja üks kallus võib anda rohkem kui ühe taime.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Liina Raudva

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „ Eesti odrasortide sobivus agrobakteri vahendatud transformatsiooniks“,

mille juhendajad on: Maria Cecilia Sarmiento Guerin, Ljudmilla Timofejeva ja Liina Jakobson,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

31.05.2023

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.