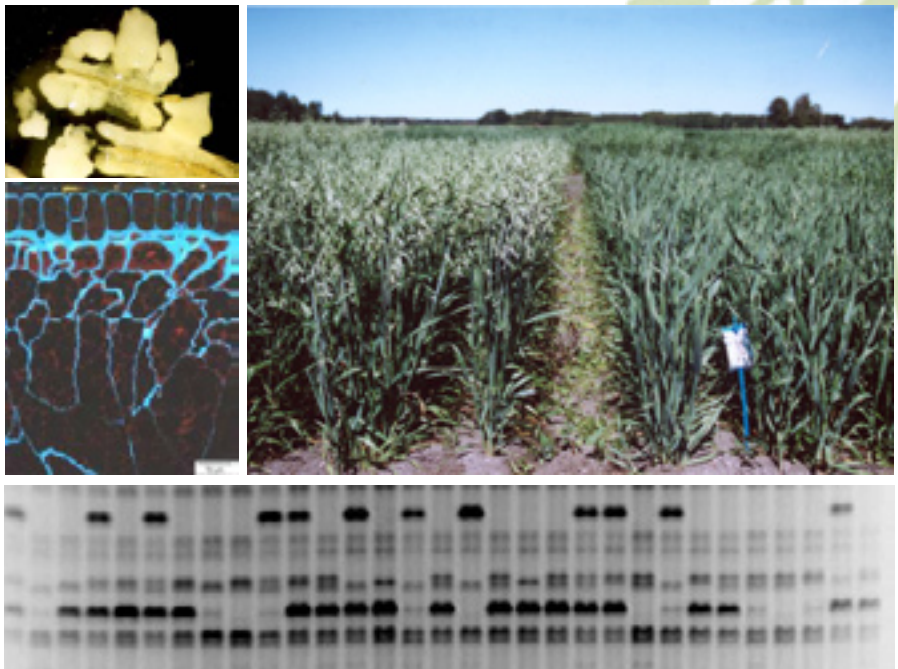




Biotekniikka kauran jalostuksessa

Uudet menetelmät laadun parantamiseksi

Elina Kiviharju, Anneli Ritala, Alan Schulman,
Leena Pietilä, Pirjo Tanhuanpää (toim.)



Maa- ja elintarviketalous 99
76 s.

Biotekniikka kauran jalostuksessa

Uudet menetelmät laadun parantamiseksi

Elina Kiviharju, Anneli Ritala, Alan Schulman,
Leena Pietilä ja Pirjo Tanhuanpää (toim.)

ISBN 978-952-487-100-6 (Painettu)
ISBN 978-952-487-099-3 (Verkkójulkaisu)
ISSN 1458-5073 (Painettu)
ISSN 1458-5081 (Verkkójulkaisu)
www.mtt.fi/met/pdf/met99.pdf

Copyright

MTT

Kirjoittajat

Julkaisija ja kustantaja

MTT, 36100 Jokioinen

Jakelu ja myynti

MTT, Tietohallinto, 36100 Jokioinen

Puhelin (03) 4188 2327, Fax (03) 4188 2339

Julkaisuvuosi

2007

Kannen kuvat

Elina Kiviharju MTT, Pirjo Tanhuanpää MTT, Tapani Suortti VTT

Painopaikka

Dark Oy

Biotekniikka kauran jalostuksessa

Elina Kiviharju¹⁾, Anneli Ritala²⁾, Alan Schulman^{1,3)}, Leena Pietilä⁴⁾ ja Pirjo Tanhuanpää¹⁾

¹⁾ MTT, Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

²⁾ VTT, PL 1000, 02044 VTT, etunimi.sukunimi@vtt.fi

³⁾ MTT / BI Kasvigenomiikan laboratorio, Biotekniikan instituutti, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

⁴⁾ Boreal Kasvinjalostus Oy, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@boreal.fi

Tiivistelmä

Kauran lajikejalostuksella pyritään tuottamaan entistä satoisampia ja laadukkaampia lajikkeita. Bioteknisiä menetelmiä hyödyntämällä mahdollisuudet vastata rehu- ja elintarviketeollisuuden sekä viljelijöiden toivomuksiin paranevat. Tässä hankkeessa kehitettiin ja sovellettiin biotekniikan menetelmiä kotimaisen kauranjalostuksen tueksi. Tutkittaviksi ominaisuuksiksi valittiin kauran sisältämä terveysvaikutteinen ravintokuitu β -glukaani, rehun energiaarvon kannalta tärkeä öljypitoisuus ja viime vuosina Suomeen levinnyt kauran lehtilaikkutauti. Lisäksi tutkittiin maaperän myrkyllisen raskasmetallin kadmiumin kertymistä jyviin.

Tutkimuksessa koottiin yli kuusisataa DNA-merkkiä käsittävä geenikartta käyttäen pohjoismaista kauran risteytysjälkeläistöä, joka oli muokattu solukoviljelyssä haploidiavaiheen avulla täysin yhtenäisiksi DH-linjoiksi. Kartan avulla paikannettiin tutkittuihin ominaisuuksiin vaikuttavia geneejiä. Tutkimuksessa löydettiin muun muassa seitsemän öljypitoisuuteen, kaksi β -glukaaniin ja monta lehtilaikkutautiin vaikuttavaa kromosomialuetta sekä kadmiumin kertymiseen vaikuttava suurivaikutteinen kromosomialue. Lisäksi kartoitettiin viljelyominaisuuksiin vaikuttavia geneejiä. Ominaisuuteen vaikuttavan geenin lähellä sijaitsevia DNA-merkkejä voidaan käyttää näiden ominaisuuksien merkkiavusteisessa valintajalostuksessa.

Geeninsiirrot mahdollistavat niin sanotun täsmäjalostuksen eli vain halutun ominaisuuden aiheuttavan geenin siirtämisen lajikkeeseen. Lisäksi voidaan ylittää lajinsisäisen luonnollisen vaihtelun mahdollisuudet käyttämällä geeniä, jota ei saada lajikkeeseen risteyttämällä. Tässä tutkimuksessa selvitettiin, voidaanko kauran β -glukaanipitoisuutta nostaa siirtämällä siihen tehokkaampi β -glukaanisyntaasigeeni. Tulosten perusteella suomalaisella kauranjalostuksella on käytettävissään toimiva geeninsiirtomenetelmä.

Haploidijalostustekniikat, DNA-merkkiavusteinen valintajalostus ja geeninsiirtotekniikka ovat tämän päivän kauranjalostuksen ulottuvilla. Tulevaisuudessa nopeasti kehittyvät, koko genomien tutkimuksen eli genomiikan menetelmät tarjoavat lisävälineitä kaurankin ominaisuuksien periytymisen ymmärtämiseen ja jalostukseen.

Avainsanat: kaura, Avena sativa, solukoviljely, geenit, geenikartoitus, geenitekniikka, DNA, jalostus, molekyylibiologia, bioteknologia

Biotechnology in oat breeding

Elina Kiviharju¹⁾, Anneli Ritala²⁾, Alan Schulman^{1,3)}, Leena Pietilä⁴⁾ ja Pirjo Tanhuanpää¹⁾

¹⁾ MTT, Biotechnology and Food Research, Myllytie 10, FIN-31600 Jokioinen, first name.last name@mtt.fi

²⁾ VTT, PL 1000, 02044 VTT, first name. last name@vtt.fi

³⁾ MTT / BI Plant Genomics Laboratory, Institute of Biotechnology, PL 56, 00014 University of Helsinki, first name.last name@helsinki.fi

⁴⁾ Boreal Plant Breeding ltd, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, first name.last name@boreal.fi

Abstract

Oat cultivar breeding aims at higher yields and better quality. Novel biotechnological methods give tools to breeders enabling more efficient responses to the demands of both the feed and food industries and the farmers and consumers. In this project, biotechnological methods were developed for oat cultivar breeding. The breeding aims that were chosen included: oat soluble bran β -glucan, which has positive health benefits in the diet; high oil content, which increases the energy value of feed; resistance to the oat leaf blotch disease, which has spread to the Finnish fields recently; and accumulation of the poisonous heavy metal cadmium in oat grains.

A genetic linkage map consisting of over six hundred DNA markers was constructed for a Nordic oat cross population, which was developed into DH lines using the anther culture technique. Genes affecting the desired traits were mapped. Two chromosomal regions related to the β -glucan content, seven regions related to the oil content and several regions related to the leaf blotch disease were found. In addition, chromosomal region strongly affecting cadmium accumulation was identified. In addition, genes associated with agronomic traits were mapped. DNA markers linked closely to the gene making the effect can be used for marker assisted selection of these traits in cultivar breeding.

Genetic transformation enables “targeted breeding”, whereby only the desired genes are transferred to the elite cultivar. In addition, valuable genes of other species can be used. The possibilities to improve oat β -glucan content by a more efficient β -glucansynthase transgene, was studied.

Haploid breeding technologies, DNA-assisted selection and genetic transformation techniques are available for the oat breeding already today. In future, rapidly developing possibilities to study the whole genomes (genomics) will open up new views to understand inheritance of the traits and breed better oat cultivars.

Keywords: oats, Avena sativa, tissue culture, genes, gene mapping, genetic engineering, DNA, breeding, molecular biology, biotechnology

Alkusanat

Suomi on kansainvälisesti yksi tärkeimmistä kaurantuottajamaista. Kaura on Suomelle tärkeä rehukasvi, mutta myös elintarvikekäytön toivotaan lisääntyvän, koska kauran jyvä sisältää runsaasti terveydelle edullisia ainesosia. Kauran lajikejalostuksen tehtävänä on huolehtia, että laatuominaisuuksiltaan hyviä, terveitä ja satoisia kauralajikkeita on saatavilla. Teollisuus, viljelijät ja kuluttajat vaikuttavat toiveillaan siihen mitä ominaisuuksia jalostetaan. Perinteisen jalostuksen tueksi on kehitetty bioteknisiä menetelmiä tehostamaan lajikejalostuksen mahdollisuuksia vastata uusiin haasteisiin. Kauran osalta biotekniikkaosaaminen on ollut suhteellisen vaatimatonta, mutta viime vuosina molekyylogeneettistä tietoa on julkaistu enenevässä määrin.

Jotta Suomi pysyisi jatkossakin kauranjalostuksen eturintamassa, olemme MTT:llä ja VTT:llä kehittäneet kauran bioteknisiä jalostustekniikoita. Tämä hanke perustuu MTT:llä kehitetyn kauran haploiditeknikan ja geenikartotusosaamisen, VTT:llä kehitetyn kauran geeninsiirtomenetelmän, MTT:n ja Biotekniikan instituutin kasvigonomiikan yhteistoimintalaboratorion genomiikkaosaamisen ja Boreal Kasvinjalostus Oy:n risteytys- ja kenttäkoetaitojen hyödyntämiseen. Hankkeessamme ”Täsmäjalostusta teollisuuden tarpeisiin – uudet menetelmät kauran laatujalostuksessa” (vuodet 2003-2006) pyrittiin kauran laadullisten ominaisuuksien parantamiseen kehitettyjen menetelmien avulla. Hanke jakautui kahteen osaprojektiin, 1) Kaksoishaploidit (DH) linjat kauran laatuominaisuuksien geenikartoituksessa, ja 2) Geeninsiirtojen hyödyntäminen jalostuksessa. Osaprojektissa 1) päävastuu oli MTT:llä ja tavoitteena oli löytää laatuominaisuuksiin (korkea β -glukaani-pitoisuus, korkea öljypitoisuus, alhainen kadmiumin kertyminen ja lehtilaikkutaudin kestävyys) liittyviä DNA-merkkejä käytettäväksi DNA-merkkiavusteisessa valinnassa. Osaprojektissa 2) päävastuu oli VTT:llä ja tavoitteena oli nostaa kauran β -glukaanipitoisuutta geeninsiirron avulla.

Tutkimusryhmään kuuluivat FT Elina Kiviharju, FT Pirjo Tanhuanpää, FT Outi Manninen ja professori Ph.D. Alan Schulman MTT Biotekniikka- ja elintarvike tutkimuksesta; FaT Anneli Ritala, FT Heidi Holkeri, FT Marjatta Salmenkallio-Marttila, FT Tapani Suortti, Dos Anna Maria Nuutila ja Dos Kirsi-Marja Oksman-Caldentey VTT:sta; Ph.D. FT Ruslan Kalendar ja Alan Schulman MTT:n ja Biotekniikan instituutin Kasvigonomiikan yhteistoimintalaboratoriosta; kauranjalostaja FK Leena Pietilä ja FT Nigel Kilby Boreal Kasvinjalostus Oy:stä sekä FM Veli Hietaniemi ja ETM Merja Eurola MTT Palvelulaboratoriosta. Lisäksi hankkeen toteuttamiseen osallistuvivat lukuisat laborantit ja tekniset apulaiset, joiden panos tutkimuksen onnistumiselle oli äärimmäisen välttämätön. Hankkeen vastuullisena johtajana toimi FT Elina Kiviharju (sijaisena 3.9.2004- 1.1.2006 FT Pirjo Tanhuanpää).

Tutkimuksen ohjausryhmän puheenjohtajana toimi Maa- ja metsätalousministeriöstä maatalousneuvos Leena Vestala (v. 2003) ja ylitarkastaja Tuula Pehu (v. 2004 alkaen). Muut jäsenet olivat tutkimus- ja kehitysjohtaja Ilmo Aronen (Raisio yhtymä), professori Arne Kurppa (MTT), professori Kaisa Poutanen (VTT), jalostusjohtaja Eero Nissilä (Boreal Kasvinjalostus Oy), teknologiajohtaja Ilkka Lehtomäki (Suomen Viljava Oy vuodet 2003-04), tutkimusryhmänjohtaja Petri Auvinen (Helsingin yliopisto) ja johtaja Pasi Lähdetie (Elintarviketeollisuusliitto ry).

Toimijaorganisaatioiden lisäksi hanketta rahoitti Maa- ja metsätalousministeriö, sekä kadmiumitutkimuksen osalta Raisio Yhtymän Tutkimussäätiö s.r., joille tutkimuksen toteuttajat haluavat lausua parhaimmat kiitokset.

Jokioisissa huhtikuussa 2007

Elina Kiviharju

MTT Biotekniikka- ja elintarviketutkimus

Sisällysluettelo

Kauran laatuominaisuuksien geenikartoitus, <i>Pirjo Tanhuanpää, Outi Manninen, Alan Schulman, Ruslan Kalendar, Veli Hietaniemi, Merja Eurola, Leena Pietilä ja Elina Kiviharju</i>	8
Geeninsiirtojen hyödyntäminen jalostuksessa, <i>Anneli Ritala, Tapani Suortti, Ruslan Kalendar, Marjatta Salmenkallio-Marttila, Kirsi-Marja Oksman-Caldentey, Alan Schulman ja Anna Maria Nuutila</i>	34
Biotekniikan mahdollisuudet kauranjalostuksessa, <i>Elina Kiviharju, Anneli Ritala, Pirjo Tanhuanpää, Outi Manninen, Alan Schulman, Leena Pietilä</i>	59

Kauran laatuominaisuuksien geenikartoitus

Pirjo Tanhuanpää¹⁾, Outi Manninen¹⁾, Alan Schulman^{1,3)}, Ruslan Kalendar³⁾, Veli Hietaniemi²⁾, Merja Eurola²⁾, Leena Pietilä⁴⁾ ja Elina Kiviharju¹⁾

¹⁾ MTT, Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

²⁾ MTT, Palveluyksikkö, Laboratoriot, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

³⁾ MTT / BI Kasvigenomiikan laboratorio, Biotekniikan instituutti, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

⁴⁾ Boreal Kasvinjalostus Oy, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@boreal.fi

Johdanto

Kauran (*Avena sativa* L.) molekyylogeneettinen tutkimus on kehittynyt hitaasti verrattuna maailmanlaajuisesti tärkeämpiin viljalajeihin, kuten ohraan, vehnään ja riisiin, oletettavasti siksi, että sen viljelyalat ovat huomattavasti pienemmät. Vähäisemmän panostuksen lisäksi kauran molekyylogeneettistä tutkimusta on hankaloittanut sen suuri heksaploidi perimä eli kromosomiston seitsemän kromosomin perussetti vastinpareineen on perimässä kolminkertaisena (yhteensä 42 kromosomia). Kauran genomin DNA:n kokonaispituuden on arveltu olevan jopa 11 300 000 000 emäsparia.

DNA-merkit eli geenimerkit ovat molekyylibiologian työkaluja, joiden avulla voidaan muun muassa paikantaa tärkeisiin ominaisuuksiin vaikuttavia geenejä. Toivottuun ominaisuuteen riittävän läheisesti kytkeytyneen DNA-merkin avulla voidaan tätä ominaisuutta edustavat jalostuslinjat valita lajikejalostusohjelmassa jo ennen kuin toivottu ominaisuus, tai sen puute, voidaan havainnoida kasviyksilön ilmiössä. Kauran molekyylogeneettistä tietoa on viime vuosina julkaistu enenevässä määrin. Heksaploidista kaurasta on jo olemassa geenikarttoja ja niitä on käytetty eri ominaisuuksiin vaikuttavien geenien paikantamiseen (O'Donoghue ym. 1995; Bush & Wise 1996; Holland ym. 1997; Jin ym. 2000; Wight ym. 2003; Kianian ym. 1999, 2000; Groh ym. 2001a ja b; De Koyler ym. 2004; Portyanko ym. 2001, 2005; Zhu & Kaeppler 2003; Zhu ym. 2003).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tehdä geenikartta käyttäen pohjoismaista kauran risteytysjälkeläistöä ja edistää geenimerkkiavusteisen valinnan käyttöönottoa Suomen lajikejalostuksessa. Tarkoituksena oli helpottaa jalostuslinjojen valintaa toivottuihin ominaisuuksiin kytkeytyneiden DNA-merkkien avulla. Sen lisäksi, että valintaa voidaan tehdä varhaisessa kasvun vaiheessa ilman aikaa vieviä ja kalliita kemiallisia analyysejä ja kasvitaudin tartutuskoikeita, välttytään ympäristöolosuhteiden kuten säätökijöiden valintaa hanka-

loittavalta vaikutukselta: vaikka toivottu ominaisuus ei jonain vuonna näkyisi kasvin ilmiössä, sen aiheuttava geeni voidaan DNA-merkein todeta kasvin perimästä. Kaksoishaploideista jalostuslinjoista eli DH-linjoista (doubled haploid) koostuva geenikartoituspopulaatio helpottaa geneettisen analyysin tekemistä (Graner 1996). Hyöty perustuu linjojen täydelliseen yhtenäisyyteen eli homotsygotiaan ja korostuu tutkittaessa perimältään kauran kaltaista lajia. DH-linjoja voidaan kauralla tuottaa ponsiviljelyn avulla (Kiviharju ym. 2005).

Jalostustavoitteita on monia riippuen sadon käyttökohteista. Elintarviketeollisuutta kiinnostaa mm. β -glukaani, jota kaura sisältää runsaasti. Se on pääosin liukoinen ravintokuitu, joka vähentää riskiä sairastua sydän- ja sepelvaltimotauteihin. Terveydelle ehkä haitallisin raskasmetalli on maaperän kadmium. Sen kertyvyydessä eri kauralajikkeisiin on havaittu eroja, ja kuivina ja lämpiminä vuosina tietyillä maalajeilla kasvatetun kauran kadmiumpitoisuudet voivat hipoa sallittua 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ raja-arvoa ja jopa ylittää sen. Elintarvikeraaka-aineiden raskasmetalliraja-arvoissa tähdätään mielellään alle lastenruokien ohjeistettujen 20-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ maksimipitoisuuksien (Hietaniemi ym. 2002, Hautala 2002). On tärkeää karsia lajikejalostuksessa jalostuslinjat, jotka keräävät korkeita kadmiumpitoisuuksia.

Noin 80 % kaurasta käytetään rehuksi ja rehulaadun kannalta tärkeimpiä jalostustavoitteita on energiamäärän lisääminen (Pullinen 1998). Tähän päästään kauran öljypitoisuutta nostamalla. Etu on erityisen suuri hevosten rehusissa (Kempe ym. 2001), joka on yksi vientikauran pääkohteista.

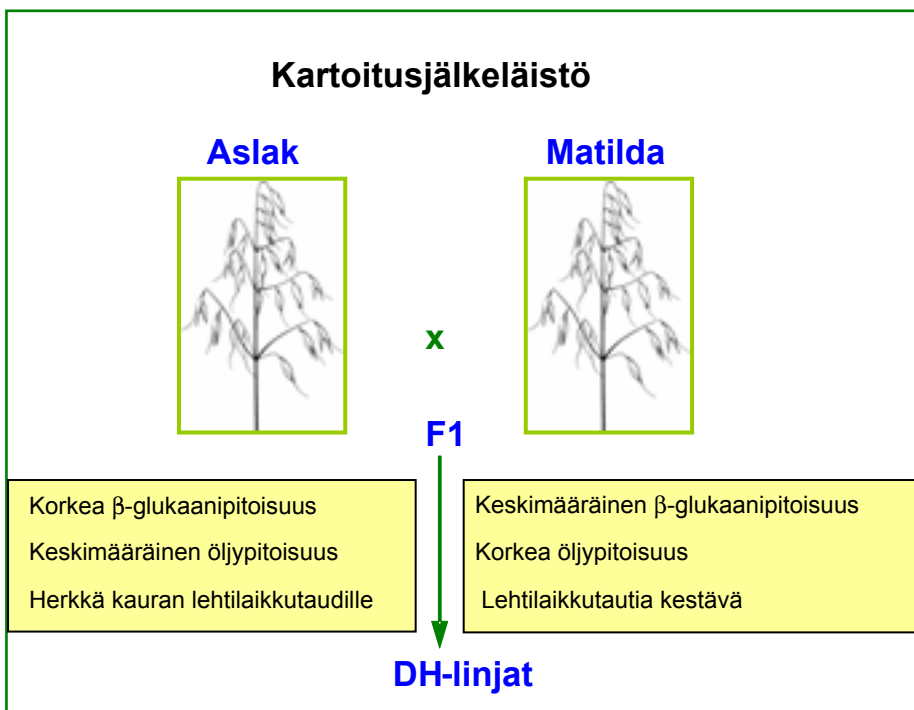
Suomalainen kaura on ollut hyvin tervettä ja sitä on ollut helppo markkinoida laadukkaana ja puhtaana raaka-aineena. Muutaman viimevuoden aikana kauran lehtilaikkutauti (*Drechslera avenae*) on kuitenkin vallannut jalansijaa Suomessa (Kangas ym. 2002). Mahdollisen kasvavan kemiallisen kasvinsuojelutarpeen kustannukset ja torjunta-ainejäämät voidaan välttää jalostamalla taudinkestäviä lajikkeita ja niiden tarve on erityisen suuri torjunta-aineita välttävissä luomutuotannossa, johon kaura myös hyvin soveltuu.

Tässä tutkimuksessa rakennettiin geenikartta pohjoismaiselle kauran DH-jälkeläistölle ja etsittiin yllämainittuihin ominaisuuksiin liittyviä DNA-merkkejä suomalaisen kauranjalostuksen geenimerkkiavusteisen valinnan tueksi.

Aineisto ja menetelmät

Risteytysaineisto β -glukaani- ja öljypitoisuuden sekä kauran lehtilaikkutaudin kestävyuden geenikartoitusta varten

Geenikartoitusta varten tarvitaan risteytysjälkeläistö, jossa on riittävän suuri vaihtelu kartoitettavien ominaisuuksien, β -glukaanipitoisuuden, öljypitoisuuden, kadmiumin kertymisen ja kauran lehtilaikkutaudin kestävyuden suhteen. Pyrimme saamaan kartoituksen kohteena olevat ominaisuudet yhteen risteytykseen vähentääksemme risteyttämiseen, DH-linjojen tekemiseen sekä DNA-merkkien testaamiseen ja analysointiin kuluvaan aikaa. Tarkoitukseen valittiin Matilda \times Aslak -risteytys (Kuva 1). Aslak on Boreal Kasvinjalostus Oy:n ja Matilda Svalöf-Weibull Ab:n lajike. Kadmiumin kertymisen osalta tiedossamme oli, että Matilda olisi vähän kadmiumia keräävä ja Aslak keskitasoinen, mutta koska tiedot eivät olleet samoissa olosuhteissa tehdyistä koikeista, perustettiin astiakoe asian selvittämiseksi.



Kuva 1. Aslak \times Matilda kartoitusjälkeläistön rakentuminen ja kartoitettavien ominaisuuksien ilmeneminen vanhemmissa (Saastamoinen 1999, Hietaniemi ym. 2002, Kangas ym. 2002).

Risteytysaineisto kadmiumin kertymiseen vaikuttavien geenien kartoittamiseksi - Astiakoe kadmiumin kertymisestä lajikkeisiin

Kadmiumin kertymisen lajikevaikutuksen selvittämiseksi tehtiin kasvihuoneella astiakoe, jossa kasvatusalustaan lisättiin kylvön yhteydessä kadmiumia $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka) sisältävänä vesiliuoksena. Koe tehtiin neljällä kerranteella käyttäen koejärjestelyä, joka huomioi astian sijainnin pöydällä. Aslak keräsi hieman Matilda enemmän kadmiumia kaikilla tasoilla (0, 0,5 ja 5,0 mg/kg Cd:tä lisätty) (Taulukko 1). Keräälajikkeeksi tiedetty Salo keräsi kuitenkin erittäin merkittävästi enemmän kadmiumia kuin Aslak tai Matilda.

Mitatut kadmiumpitoisuudet nousivat yllättävän suuriksi siihen nähden, että elintarvikekauran kadmiumrajana on 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Lisäämäämme 0,5 mg kadmiumia kilossa kasvualustaa pidetään maaperästä mitattuna kohonneena pitoisuutena, mutta se on vielä pitoisuus jota tavataan paikoin peltomaassa. Keskimäärin Suomen maaperän kadmiumpitoisuus on vuonna 1998 kerätyissä maanäytteissä ollut 0,18 mg/kg, tulosten vaihdellessa välillä 0,02-0,75 mg/kg (Mäkelä-Kurtto ym. 2003). Kokeemme tulokset eivät ole vertailukelpoisia peltomaan tuloksien kanssa, koska kadmium on luultavasti ollut hyvin helposti kasvien saatavilla käyttämästämme turve-kivennäismaa seoksesta, kun luonnonoloissa se on sitoutuneena maaperän ainesosiin. Koe sopii kuitenkin lajikkeiden välisten erojen selvittämiseen.

Astiakokeen tulosten perusteella päätettiin kasvattaa Aslak \times Salo -jälkeläistö kadmiumin kertymisen tutkimista varten. Aslak risteytettiin Salon kanssa ja yhden F_1 -yksilön itsepölytyssemenistä peräisin olevaa F_2 -jälkeläistöä (150 kpl) käytettiin ominaisuuteen vaikuttavien geenien etsimiseen.

Taulukko 1. Kadmiumin kertyminen kolmen eri kauralajikkeen pääryhyn jyvien esikokeessa, jossa kasvualustaan oli lisätty kadmiumnitraattia.

Cd lisäys mg kg ⁻¹	Jyvien Cd pitoisuus $\mu\text{g kg}^{-1} \pm \text{SE}$		
	Aslak	Matilda	Salo
0	29,2 \pm 2,8	26,2 \pm 4,4	36,9 \pm 4,5
0.5	695 \pm 79	672 \pm 107	1058 \pm 61
5	6275 \pm 353	6078 \pm 458	9465 \pm 966

SE= keskivirhe

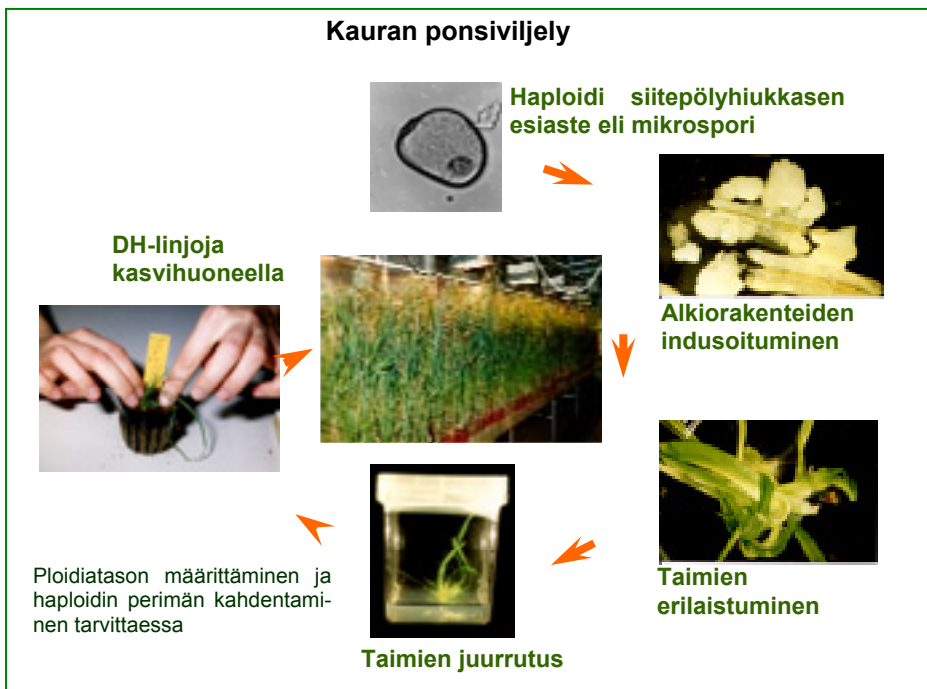
Aslak \times Matilda DH-linjojen tuotto ja lisäys

Geenikartoituspopulaatio edustaa Aslakin ja Matildan välille rekombinaatiossa muodostuvia geneettisiä vaihtoehtoja, ja sen pitäisi sisältää vähintään sata linjaa ollakseen riittävän kattava. DH-linjat tuotettiin ns. ponsiviljelymenetelmän (synonyymi hedeviljely) avulla. Siinä siitepölyhiukkasen esiasteet saadaan solukkoiviljelmissä erilaistumaan alkiorakenteiksi ja taimiksi. Näillä taimilla on vain yksinkertainen (haploidi) perimäannos (21 kromosomia kau-

ralla) eli munasolun kautta tulevat vastinkromosomit puuttuvat. Perimä kahdentuu tavanomaiseksi (42 kromosomia) joko itsestään tai antimitoottisesti vaikuttavan kolkisiinin avulla. Aikaisempien ponsiviljelykokeiden perusteella Aslakin tiedettiin toimivan ponsiviljelyssä hyvin.

Boreal Kasvinjalostus Oy toimitti käyttöömme 200 Aslak × Matilda F₁-risteytyssementä. Tarvittava määrä DH-linjoja tuotettiin kolmessa ponsiviljelyerässä. Ponsiviljely tehtiin aiemmin kehittämällämme menetelmällä hiukan modifioiden (Kiviharju ym. 2005).

Menetelmä oli pääpiirteittäin seuraava (Kuva 2): risteytyssemenet kylvettiin, versot leikattiin siitepölyhiukkasten ollessa myöhäisessä yksitumavaiheessa, versot kylmäkäsiteltiin pimeässä +4°C:ssä 7 vrk, pintasteriloitiin 70% etanolilla ja heteiden ponnet eristettiin kiinteään ja nestefaasin omaaville steriloituille induktioalustoille (W14 –suolat (Ouyang ym. 1987), MS-rauta (Murashige & Skoog 1962), 5 mg/l, 2,4-D + 0,5 mg/l BAP + 20 mg/l Ethephon, 50 mg/l L-kysteini ja 500 mg/l myo-inositoli, 10% maltoosi, nestefaasi sisälsi 10% Ficolia ja kiinteä 0,3% Phytagelia), ponnet lämpökäsiteltiin pimeässä +32°C:ssä 5 vrk ja viljelyä jatkettiin pimeässä +28°C:ssä. Koska meillä oli viitteitä eräällä lajikkeella himmeän valon (noin 40 μmol m⁻² s⁻¹, 16/8 tunnin fotoperiodi) edullisesta vaikutuksesta induktiovaiheessa, kokeilimme sitä keskimmaisessa viljelyerässämme. Noin viiden viikon kuluttua



Kuva 2. Kauran ponsiviljelyn päävaiheet.

kehittyneitä alkiorakenteita alettiin siirrostaa erilaistumisalustoille (W14-suolat, MS-rauta, 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l kinetiini, 2% sakkaroosi, kiinteä alusta) valoon +25°C:een jatkamaan kehitystään taimiksi. Erilaistuneet taimet poimittiin pinseteillä juurrutuslustoille lasiputkiin tai tarkoitusta varten kehitettyihin muovipurkkeihin himmeään valoon. Alusta sisälsi MS-suolat, 0,2 mg/l NAA ja 2% sakkaroosia. Erilaistuneiden taimien ploidiatasot mitattiin lehdistä eristetyistä protoplasteista virtausytometrillä (Becton Dickinson FACSORT) (Kiviharju ym. 2000, Immonen ym. 1999). Haploidin perimäärän omaavat kasvit käsiteltiin kolkisiinilla perimän kahdentamiseksi. Taimet siirrettiin kasvihuoneelle turve-kivennäismaaseosta sisältäviin verkopohjaruukkuihin, aluksi muovikuvun alle. Juurtuneet ja vahvistuneet taimet siirrettiin 10-12 cm ruukkuihin ja kasvatettiin kasvihuonepöydillä altakastelussa. Tarkemmat ohjeet löytyvät yllä mainitusta julkaisusta. Siemensadot kerättiin talteen ja aineistoa lisättiin kenttäkokeita ja ominaisuusanalyysijä varten ensin kasvihuoneella ja vuodesta 2004 alkaen myös kentällä.

DNA:n eristykset

Aslak × Matilda DH-jälkeläistön lehdistä eristettiin DNA:t hieman muokatulla CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) -menetelmällä (Poulsen ym. 1993). Aslak × Salo F₂-jälkeläistön DNA:t eristettiin käyttäen DNEasy® Plant Mini Kit:iä. Ennen eristystä lehdet murskattiin FastPrep™ FP120 –laitteella. DNA-pitoisuudet mitattiin GeneQuant II RNA/DNA Calculator –spektrofotometrillä.

Kenttäkokeet

Boreal Kasvinjalostus Oy teki Aslak × Matilda DH-linjoilla kenttäkokeet vuosina 2005 ja 2006. Vuonna 2005 aineisto riitti yhden neliömetrin ruuduille neljänä kerranteena. Varsinainen kenttäkoe tehtiin vuonna 2006 kuuden neliömetrin ruuduilla kolmella kerranteella. Kasvukausien säät poikkesivat huomattavasti toisistaan: vuoden 2006 kesä oli poikkeuksellisen lämmin.

Ominaisuuksien analysointi

Aslak × Matilda DH-aineiston β-glukaani- ja öljypitoisuudet (raakarasva) määritettiin MTT:n Palvelulaboratoriossa vuosien 2005 (yhdistetty näyte) ja 2006 (kolme kerrannetta erikseen) kenttäkokeista. β-Glukaanipitoisuus määritettiin kuorituista kauran ytimistä entsyymaattis-spektrofotometrisesti McClearyn ja Coddin (1991) -menetelmällä. Öljypitoisuus määritettiin gravimetrisesti (näytteet hydrolysoitiin vahvalla suolahapolla ja rasva uutettiin dietyylieetterillä). β-Glukaani- ja öljypitoisuudet esitetään prosentteina kuiva-aineesta.

Menetelmät ja tauti-isolaatit kauran lehtilaikkutaudin kestävyuden kasvihuonetestaukseen tuotettiin MTT:n projektissa: ”Pitkäkestoista lehtilaikkutautien kestävyyttä suomalaisen ohraan ja kauraan”. Taudinkestävyudet määritettiin kasvihuonekokeessa infektoimalla DH-linjat kahdella eri lehtilaikkutauti-isolaatilla. Boreal Kasvinjalostus Oy määritti lisäksi viljelyominaisuuksiin ja muita laatuun liittyviä ominaisuuksia. Vuoden 2006 kenttäkokeesta määritettiin pituusluokan lisäksi myös todelliset pituudet (cm). Aslak × Salo F₂-jälkeläistön kadmiumin kertyminen määritettiin kasvihuoneessa satunnaistettussa astiakokeessa käyttäen 0,5 mg/l Cd-lisäystä kasvatusalustassa. Vanhemmista kylvettiin neljä kerrannetta, mutta koska F₂-linjojen kaikki yksilöt ovat ainutkertaisia, niistä ei kerranteita ollut mahdollista käyttää. Kadmium mitattiin jyvistä, ja myös vanhempaislajikkeiden korsista ja juurista ICP-MS-menetelmällä (induced coupled plasma massaspektrometri) MTT:n Palvelulaboratoriossa.

DNA-merkit

Tutkimuksessa käytettiin erilaisia PCR (Polymerase Chain Reaction) -pohjaisia DNA-merkkejä: mikrosatelliitteja, REMAP- (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), IRAP- (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR- (Inter Simple Sequence Repeat), SRAP- (Sequence-Related Amplified Polymorphism), AFLP- (Amplified Fragment Length Polymorphism) ja SNP (Single Nucleotide Polymorphism)- ja SCAR- (Sequence Characterised Amplified Region) merkkejä. PCR-pohjaiset merkit ovat helppokäyttöisiä ja soveltuvat hyvin myös käytännön jalostustyöhön. REMAP-, IRAP-, RAPD-, SCAR- ja ISSR-merkit havainnoitiin agarosigeelillä, muut merkit sen sijaan automaattisella sekvensointilaitteella fluoresoivan leiman avulla.

Mikrosatelliitit ovat muutaman emäksen toistojaksoista koostuvia alueita genomissa. Mikrosatelliitti monistetaan PCR:n avulla käyttäen sitä reunustavalle alueelle suunniteltua alukeparia. Eri alleelien tunnistaminen perustuu toistojaksojen lukumäärän vaihteluun. Mikrosatelliitit ovat hyvin vaihtelevia ja niitä voidaan käyttää ns. ankkurimerkkeinä verrattaessa eri risteytysten pohjalta tehtyjä geenikarttoja toisiinsa. Kauralle kehitettyjä mikrosatelliitti-merkkejä on vielä suhteellisen vähän (Li ym. 2000, Holland ym. 2001, Pal ym. 2002, Jannink & Gardner 2005), mutta myös ohran (Becker & Heun 1995, Liu ym. 1996, Ramsay ym. 2000) ja rukiin (Hackauf & Wehling 2002) mikrosatelliitteja käytettiin tutkimuksessa. ISSR-merkit monistetaan käyttäen yhtä toistojakson sisältävää aluketta (Zietkiewicz ym. 1994).

Retrotransposonimerkit perustuvat perimässä oleviin retroviruksia muistuttaviin sekvensseihin. Niitä on kehitetty MTT:n ja Biotekniikan instituutin Kasvigenomiikan yhteistoimintalaboratoriossa Viikin Biokeskuksessa (Kalendar ym. 1999, Kalendar & Schulman 2006). REMAP-merkki on alue retrotrans-

posonin ja mikrosatelliitin välillä, IRAP-merkki on taas alue kahden retrotransposonin välillä. Työssä käytettiin sekä ohran retrotransposonimerkkejä että projektin aikana kauralle kehitettyjä spesifisiä retrotransposonimerkkejä (yhteensä kehitettiin 52 aluketta, joista 32 tuotti yksittäin käytettynä IRAP-merkkejä).

RAPD-merkit monistuvat satunnaisilta alueilta lyhyitä alukkeita (10-11 emästä) käyttämällä, SRAP-geenimerkit intronien ja eksonien raja-alueille suunniteltujen alukkeiden avulla (Li & Quiros 2001). AFLP-merkit perustuvat DNA:n pilkkomiseen ja monistumiseen (Vos ym.1995).

Projektin aikana sekvensoitiin kadmiumin kertymiseen liittyvät RAPD- ja REMAP-merkit, joitakin kadmiumin kertymisen kandidaattigeenejä sekä öljypitoisuuteen vaikuttava kandidaattigeeni ACCaasi (asetyyli-CoA karboksylaasi) (Kianian ym. 1999). Sekvensointia varten monistetut bändit leikattiin geeliltä ja puhdistettiin (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit). Puhdistetut DNA-fragmentit liitettiin vektoriin ja transformoitiin kemiallisesti TOP10 -soluihin (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing). Plasmidi-DNA puhdistettiin (FastPlasmid Mini kit) ja sekvensoitiin kummastakin suunnasta (MegaBACE™ 500 Sequencer).

RAPD- ja REMAP-merkkien sekvenssien (sekvenssit geenipankissa) perusteella suunniteltiin spesifiset alukkeet ja näin merkit saatiin muutettua luotettavimmiksi ja helpommin tulkittaviksi SCAR-merkeiksi (Sequence Characterised Amplified Region).

Kianian ym. (1999) ovat julkaisseet kauralta rasvahapposynteesissä toimivan ACCaasi-entsyymin geenin sekvenssin. Tämän geenin vaikutus kauran öljypitoisuuteen on aiemmin todettu suureksi (siihen liittynyt QTL vastasi jopa 48% öljypitoisuuden vaihtelusta). Julkaistua sekvenssiä hyödyntämällä pyrittiin pääsemään öljypitoisuuteen vaikuttavaan geeniin käsiksi. ACCaasi-geeni sekvensoitiin osittain ja vanhempien väliltä löytyneiden erojen perusteella kehitettiin kaksi SNP-merkkiä, jotka tunnistivat spesifisesti Aslakin ja Matildan alleelit kahdesta eri ACCaasi-lokuksesta.

Tilastolliset analyysit

Geenikartta laadittiin JoinMap 3.0 (van Ooijen & Voorrips 2001) -ohjelmalla käyttäen kytkentäkriteerinä LOD (logarithm of odds) -arvoa 8.0 – 10.0. Geneettiset etäisyydet (cM=centiMorgan) laskettiin käyttäen Kosambin kartoitusfunktiota. Laatuominaisuuksiin vaikuttavien kvantitatiivisten geenilokusten paikantamiseen käytettiin NQTL-ohjelmistoa (Tinker&Mather 1995). Merkkien segregaatio testattiin χ^2 -analyysin avulla. Ominaisuusdatan kuvailuun käytettiin SAS-ohjelmaa (Univariate Procedure, SAS Institute Ins., Cary, NC).

Aslak ja Salo –lajikkeiden välinen ero kadmiumin kertymisessä, sekä DNA-merkkien kytkäytyminen kadmiumin kertymiseen analysoitiin tilastollisesti käyttäen yleistä lineaarista mallia (GLM Procedure, SAS Institute Ins., Cary, NC) ja logaritimuunnosta. Merkitsevyyden rajana käytettiin $P \leq 0.05$. Kadmiumin kertymiseen liittyvien merkkien kytkentäanalyysi tehtiin MAP-MAKER 3.0 (Lander ym. 1987) –ohjelmalla. Geneettiset etäisyydet laskettiin käyttäen Haldanen kartoitusfunktiota. Kadmiumin kertymiseen liittyvän QTL:n (quantitative trait locus) paikantamiseen käytettiin MAPMAKER/QTL-ohjelmaa. Cd:n kertymiseen liittyvien DNA-merkkien sekvenssejä verrattiin GenBank- ja EMBL-tietokannoissa oleviin sekvensseihin BLAST-ohjelmalla (Altschul ym. 1997).

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Aslak × Matilda DH-linjojen tuotto

Aslak × Matilda DH-linjat tuotettiin kolmessa ponsiviljelyerässä (Taulukko 2). Kaiken kaikkiaan heteen ponsia eristettiin 26 070 kappaletta, alkiorakenteita indusoitui 1393 ja niistä 13 % erilaistui vihreiksi taimiksi. Erilaistuneista taimista menetettiin osa juurrutuksessa ja kasvihuonesopeutuksessa, joten röyhylle asti kehittyi 148 tainta. Taimista 39% (58 kpl) oli virtausytometri-analyysin perusteella kahdentanut kromosomistonsa (heksaploideja) ja 90 sai haploideina kolkisiinikäsittelyn. Albiinokasveja regeneroitui vain muutamia.

Taimien tuottotehokkuus jäi tällä risteytysjälkeläistöllä alhaiseksi. Aslakista olemme parhaimmillaan tuottaneet 8 tainta sataa eristettyä pontta kohden ja Aslak × Lisbeth –risteytysjälkeläistöstä 30 tainta sataa pontta kohden, kun nyt tulos jäi 0,6:een kasviin sataa eristettyä pontta kohden. Taimientuottotehokkuutta pudotti oletettavasti Matildan huono ponsiviljelyvaste: testasimme sen ponsiviljelyssä, eikä taimia saatu. Keskimmaisessä erässä (koe 2) testattu valon vaikutus induktiovaiheessa ei ollut eduksi tällä aineistolla. Ilman sitä

Taulukko 2. Ponsiviljelytulokset Aslak x Matilda ponsiviljelystä.

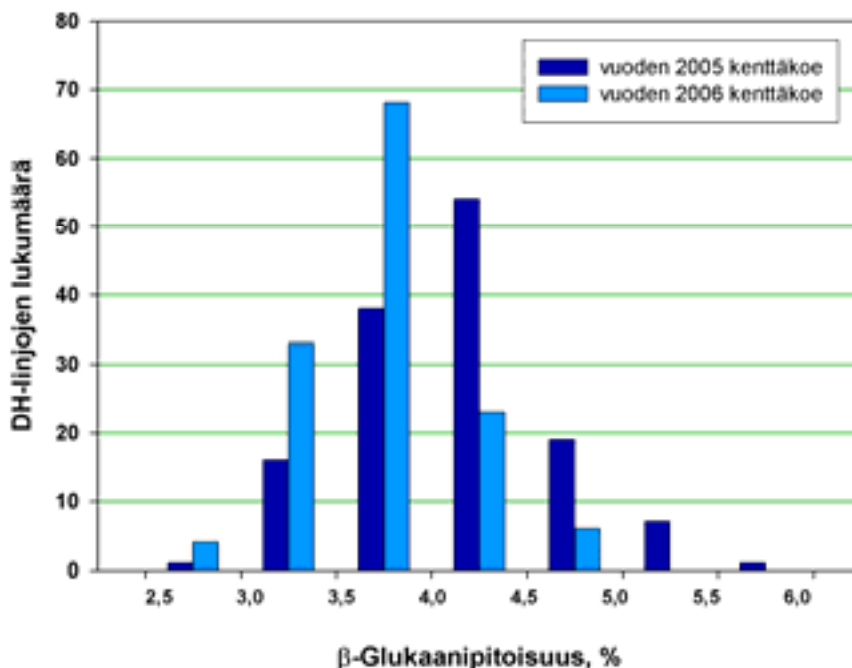
Koe	Ponsia	Alkiorakenteita		Erilaistuneita vihreitä taimia		Taimia alkioista	Kasveja kasvihuoneella	
		kpl	/100 pontta	kpl	/100 pontta		%	kpl
1	7770	589	7,6	63	0,8	11	49	0,6
2 pimeä	3000	136	4,5	23	0,8	17	17	0,6
2 valo	11340	234	2,1	33	0,3	14	29	0,3
3	3960	434	11,0	67	1,7	15	53	1,3
Yht.	26070	1393	5,3	186	0,7	13	148	0,6

vihreitä taimia olisi saatu keskimäärin 0,8 sataa ponna kohden ja tarvittava ponsimäärä olisi kutistunut 70 prosenttiin nyt eristetyistä. Lopullisen kytken-täkartan kokoamiseen käytettiin 137 DH-linjaa.

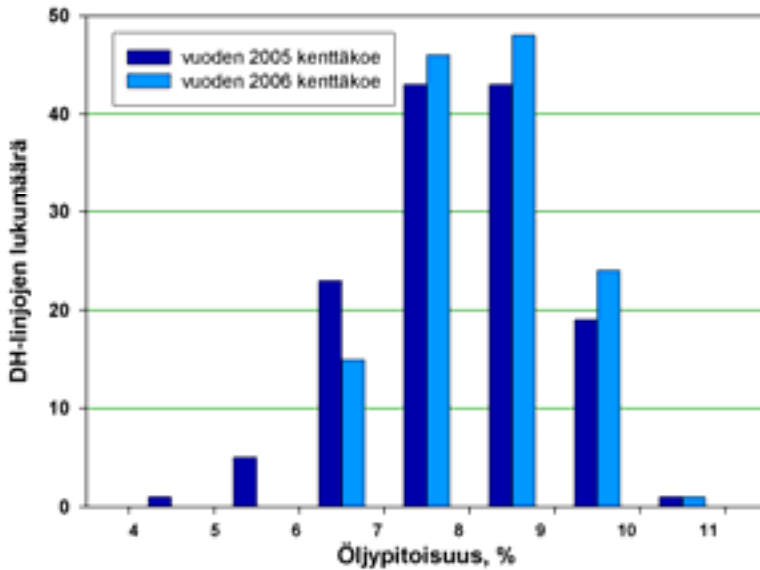
Ominaisuuksien analysointitulokset

Aslak × Matilda DH-linjojen β -glukaanipitoisuudet vuoden 2005 kenttäko-keesta vaihtelivat välillä 2,8 - 5,9 % (keskiarvo 4,1 %). Vuoden 2006 kenttä-kokeen sadosta vaihteluväli oli 2,7 - 4,8 % (keskiarvo 3,7 %). Vuoden 2006 osalta arvot on laskettu kerranteiden keskiarvoista. Aslak × Matilda DH-linjojen jakautuminen β -glukaanipitoisuuksien suhteen sekä vanhempien pitoisuudet on esitetty kuvassa 3.

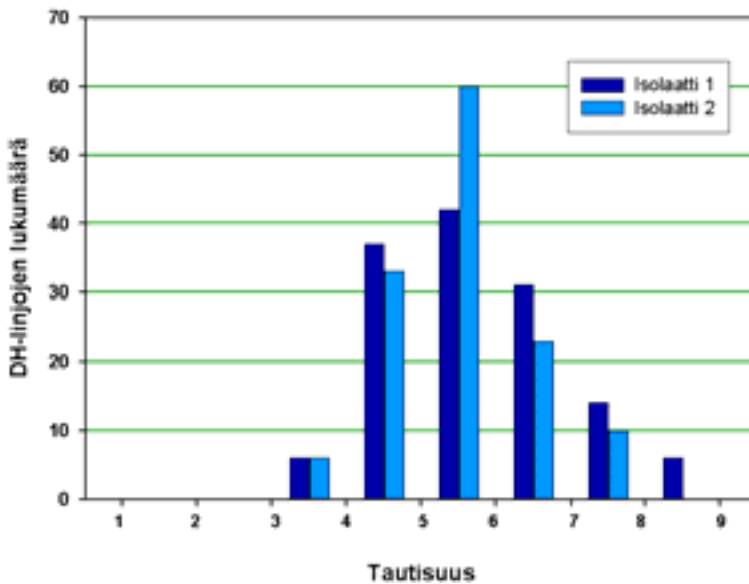
Öljypitoisuuden suhteen vaihteluväli oli suurempi (Kuva 4). Jälkeläislinjojen öljypitoisuus vaihteli vuonna 2005 välillä 4,9 - 10,2 % (keskiarvo 7,8 %) ja vuonna 2006 välillä 6,2 - 10,1 % (keskiarvo 8,1 %). Korkean β -glukaanin ja erityisesti muutamat erittäin korkean öljypitoisuuden omaavat Aslak × Matilda DH-linjat ovat ponsiviljelyn avulla saavutetun geneettisen yhtenäisyytensä vuoksi hyvin kiinnostavaa aineistoa kauran lajikejalostukseen.



Kuva 3. Aslak × Matilda DH-kartoitussjälkeläistön β -glukaanipitoisuudet vuosien 2005 ja 2006 kenttäkokeiden sadosta luokiteltuina puolen prosenttiyksikön välein. Vanhempien pitoisuudet olivat vuonna 2005 Aslak 4,6 % ja Matilda 3,7 %, sekä vuonna 2006 Aslak 3,7 % ja Matilda 3,4 %.

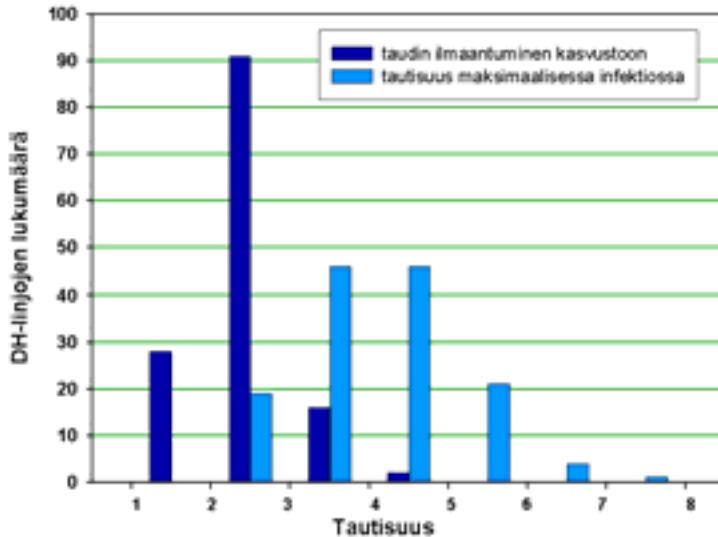


Kuva 4. Aslak × Matilda DH-kartoitusjälkeläistön öljypitoisuudet vuosien 2005 ja 2006 kenttäkokeiden sadosta luokiteltuna prosenttiyksikön välein. Vanhempien pitoisuudet olivat vuonna 2005 Aslak 6,8 % ja Matilda 9,7 %, sekä vuonna 2006 Aslak 7,4 % ja Matilda 9,6 %.



Kuva 5. Aslak × Matilda DH-kartoitusjälkeläistön lehtilaikkutaudin kestävyys kasvihuonealtistuskokeessa kahdella eri tauti-isolaatilla. Vanhempien tautisuusluokat olivat isolaatilla 1 tartutettuna Aslak 7,6 ja Matilda 3,2, sekä isolaatilla 2 tartutettuna Aslak 5,7 ja Matilda 3,8. Luokitteluasteikon mukaan pienet arvot osoittavat kestävyyttä ja suuret alltiutta.

Lehtilaikkutaudin kasvihuonealtistuksessa jälkeläislinjojen tautisuus vaihteli isolaatti 1:tä käyttäen välillä 3,0 – 8,5 (keskiarvo 5,6) ja isolaatti 2:sta käyttäen välillä 3,3 – 7,7 (keskiarvo 5,2). Jälkeläislinjojen jakaumat tautisuuden suhteen on esitetty kuvassa 5. Kenttäkoehavaintojen osalta vuoden 2005 tulokset on esitetty kuvassa 6. Tautisuus vaihteli tauti-infektion ilmenemisvaiheessa välillä 1,3 – 4,3 (keskiarvo 2,3) ja taudin maksimaalisessa esiintymisvaiheessa välillä 2,0 – 7,0 (keskiarvo 4,0). Lehtilaikkutautia ei esiintynyt vuonna 2006. DH-linjojen agronomisten ominaisuuksien mittaustuloksia on esitetty taulukossa 3.



Kuva 6. Aslak × Matilda DH-kartoitussjälkeläistön lehtilaikkutaudin kestävyys kenttäkokeessa vuonna 2005. Varhaisen vaiheen havainto Aslakista oli käytetyllä luokitteluasteikolla 3 ja Matildasta 1,5. Maksimaalisen infektiövaiheen havainto Aslakista 5,3 ja Matildasta 2,8.



Kuva 7. Boreal Kasvinjalostus Oy:n perustama kenttäkoe Joki-oisten Kalsussa (kuva E. Kiviharju).

Taulukko 3. Aslak × Matilda DH-kartoitusjälkeläisten agronomisia ominaisuuksia tilastollisin luvuin kuvailtuna vuosien 2005 ja 2006 kenttäkokeista. Hlp=hehtolitraino, Tjp= tuhannen jyvän paino, Ka=keskiarvo, Med=mediaani, Min=pienin arvo, Max=suurin arvo, Q1= alakvartiili, Q3=yläkvartiili, KH=keskihajonta, SE=keskivirhe.

Ominaisuus	Vuosi	Aslak	Matilda	DH-linjat				Q1	Q3	KH	SE
				Ka	Med	Min	Max				
Sato, kg/ha	2005	16 024	10 233	11 776	12 016	(1214) 4669	16 011	13 660	2690	229,8	
Sato	2006	5188	4778	4359	4409	1083	6491	5106	1025	51	
Hlp, kg	2005	58,5	56,5	55,0	56,0	49,2	59,8	56,9	6,95	0,59	
Hlp	2006	51,6	54,1	52,4	52,5	41,5	58,7	54,3	2,79	0,14	
Tjp, g	2005	31,4	35,6	33,6	34,2	27,8	40,1	35,4	5,00	0,43	
Tjp	2006	28,3	31,7	28,5	28,4	24,5	33,3	29,8	1,86	0,16	
Valkuainen, %	2005	14,9	14,2	13,8	14,1	10,0	17,4	15,2	2,62	0,22	
Valkuainen	2006	16,7	17,8	17,2	17,2	13,5	21,6	18,2	1,69	0,15	
Kasvu aika, pv	2005	95	113	102,9	103,0	93	114	108	5,75	0,49	
Pituusluokka	2005	8	8	7,58	8,0	5	9	8	1,07	0,09	
Pituus, cm	2006	71,0	69,7	67,0	67,0	44	89	73	8,83	0,44	
Tähkälletulo, pv	2006	54,3	58,0	56,2	56	54	60	58	1,7	0,08	

Geenikartoitus

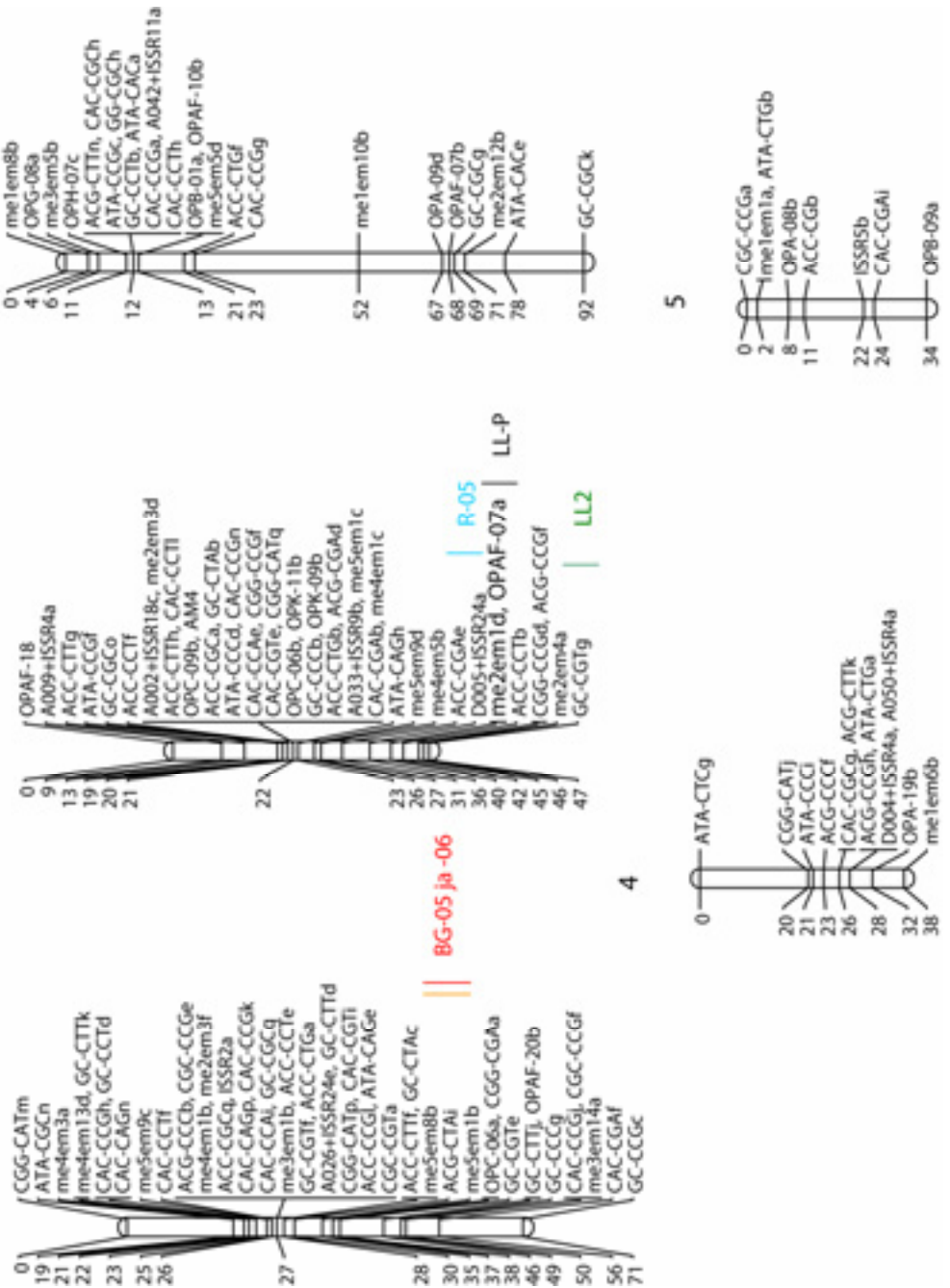
Aslak × Matilda DH – jälkeläistä: β -glukaani- ja öljypitoisuuteen sekä kauran lehtilaikkutaudin kestävyteen vaikuttavien geenien kartoitus

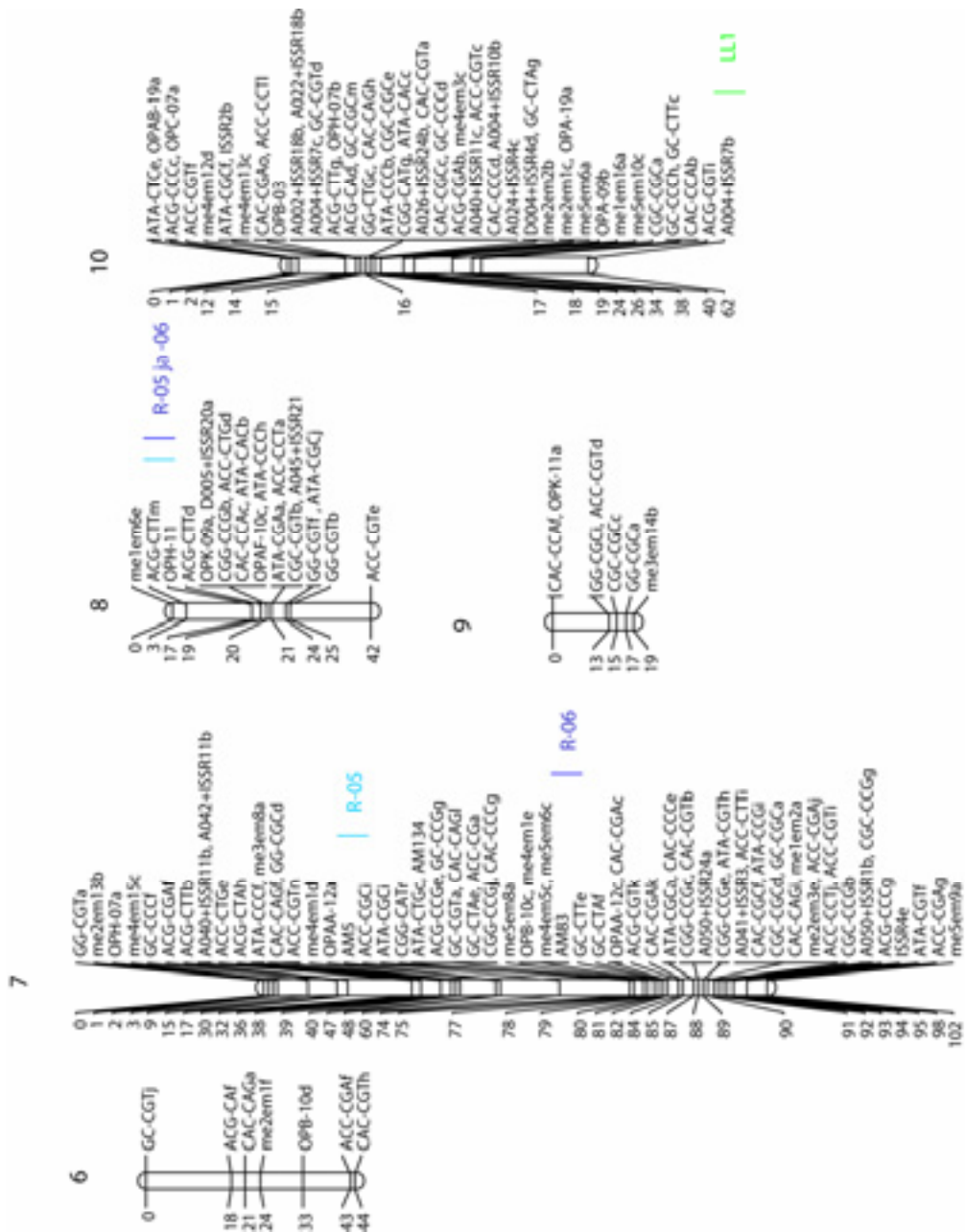
Geenikartoituksessa etsittiin ensin risteytysvanhemmissa monimuotoisia DNA-merkkejä, joilla sitten analysoitiin koko jälkeläistö. Kartoituksessa käytettyjen yksilöiden määrä oli 137. DH-jälkeläistö analysoitiin yhteensä 723 DNA-merkillä. Merkeistä 628 (377 AFLP-, 106 SRAP-, 59 REMAP-, 57 RAPD-, 12 ISSR-, 3 IRAP- ja 2 SNP-merkkiä sekä 12 mikrosatelliittia) sijoittui 28 kytKentäryhmään (ryhmissä enemmän kuin 4 merkkiä ja pituus yli 10 cM). Kartta on esitetty kuvassa 8, ja yhteenveto siitä Taulukossa 4. Merkkien määrä ryhmissä vaihteli 6:sta 71:een. Kartan kokonaispituus oli 1545 cM. Viljellyllä kauralla on 21 kromosomiparia, mikä tarkoittaa, että jotkut löytämistämme ryhmistä kuuluvat samaan kromosomiin, mutta todennäköisesti sijaitsevat kromosomin eri varsissa. Kartan kokoamisessa käytettiin LOD-arvoa 9.0 muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. LOD-arvoa 8.0 käytettiin järjestettäessä ryhmät 8, 23 ja 25, koska korkeampaa arvoa käyttämällä ne hajoaisivat, vaikka merkit kytkeytyvät toisiinsa vahvasti. Ryhmät 5 ja 6 sen sijaan järjestettiin käyttämällä LOD-arvoa 10.0, koska alemmalla arvolla ne menivät yhteen ja näytti siltä, että vain yksi merkki piti ryhmiä yhdessä.

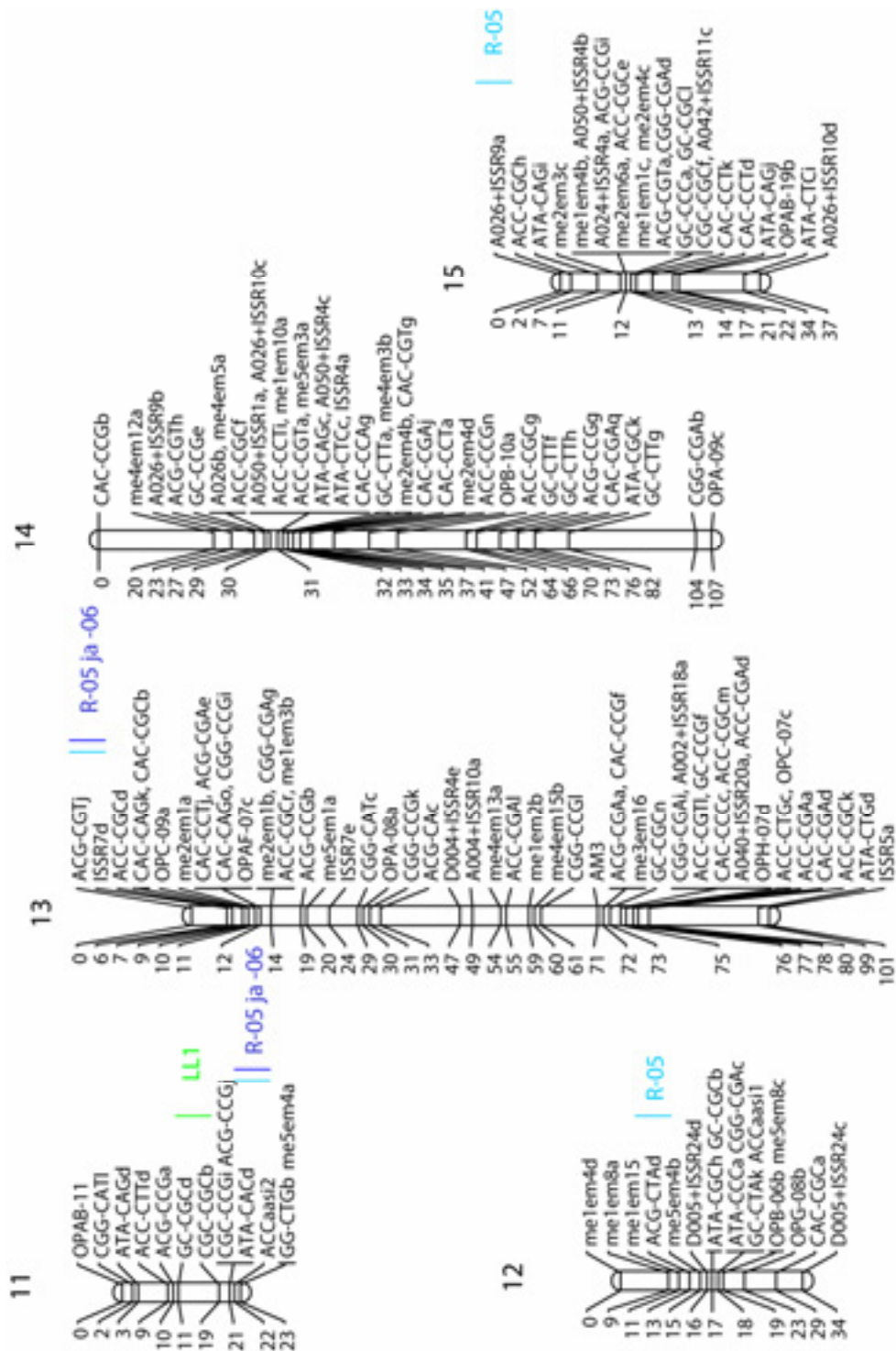
Suuri osa merkeistä (55 %) segregoitui DH-jälkeläistössä poiketen odotetusta lukusuhteesta 1:1. Vinoutuneet merkit kasaantuivat usein tiettyihin kytKentäryhmiin tai tietyille alueille kytKentäryhmissä. Suurin osa vinoutuneesti segregoituvista merkeistä oli vinoja Aslakin alleelin suuntaan (89 %). Tämä oli odotettavissa, koska Aslak toimii paremmin ponsiviljelyssä ja tällöin valintaa tapahtui solukkoviljelyasteella Aslakin suuntaan. Vinosti segregoituneet merkit sijaitsevat siis todennäköisesti kromosomialueilla, joissa on genejä, jotka vaikuttavat elinkykyyn ponsiviljelyssä. Ilmiö on yleisesti tunnettu eri lajien DH-jälkeläistöissä (Foisset & Delourme 1996, Manninen 2000).

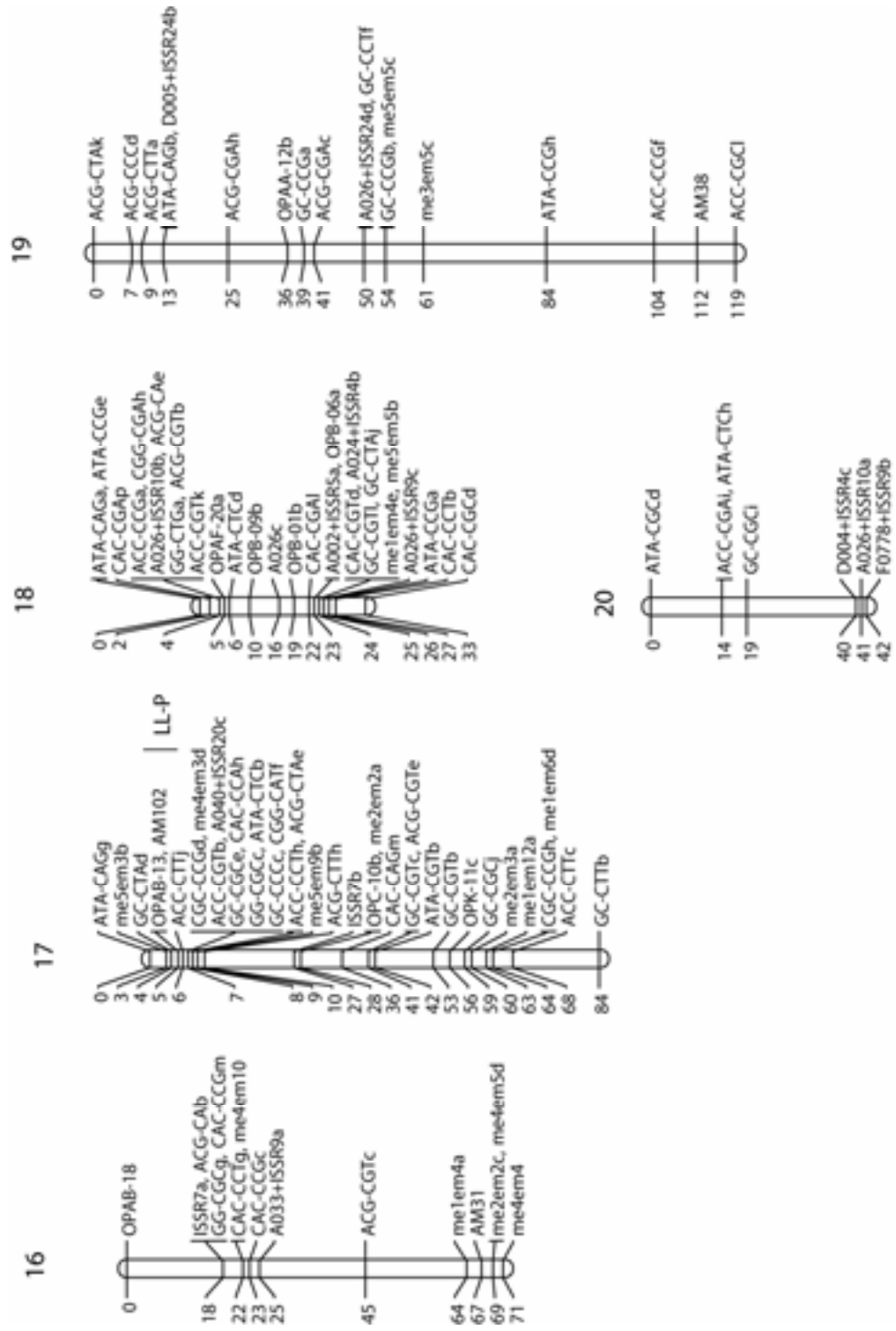
Eri kytKentäkartoja voidaan verrata toisiinsa ankkurimerkkien avulla. Ne ovat usein RFLP-merkkejä (Restriction Fragment Length Polymorphism) tai mikrosatelliitteja. Koska kaikkiin kauran kromosomeihin ei ole mikrosatelliitteja sijoitettu, voidaan meidän kytKentäryhmiämme verrata jo olemassa oleviin karttoihin vain osittain. Kuuden ryhmän vastaavuus olemassa oleviin karttoihin voitiin todentaa. Kartan laatimisessa käytettiin paitsi kauralle kehitettyjä mikrosatelliitteja, myös ohran, vehnän ja rukiin mikrosatelliitteja. Nämä toimivat kohtuullisesti, mutta monimuotoisuus oli vähäistä: 37 testatusta mikrosatelliitista vain kolme oli monimuotoista vanhempien välillä.

Kuva 8. Kauran geenikartta, joka sisältää 28 kytentäryhmää. DNA-merkkien nimet on esitetty kunkin kytentäryhmän oikealla puolella ja etäisyys ryhmän päästä vasemmalla puolella. β -Glukaanipitoisuuteen (vuonna 2005: BG-05 ja vuonna 2006: BG-06), öljypitoisuuteen (vuonna 2005: R-05 ja vuonna 2006: R-06) ja lehtiläikkautautiin (kasvihuoneella isoalaatti 1: LL1 ja isoalaatti 2: LL-2 sekä pelillä 2005: LL-P) vaikuttavien geenialueiden summittainen paikka merkitty pvstviivoilla.

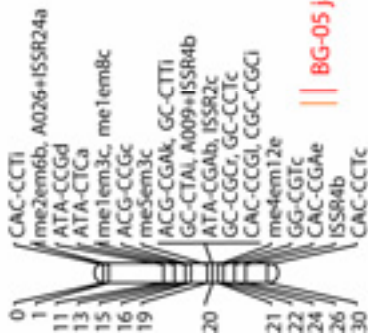




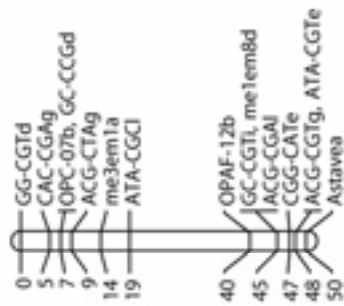




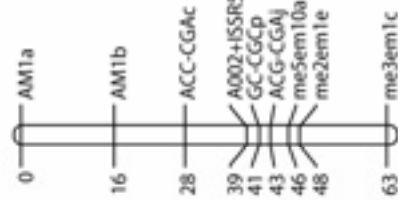
21



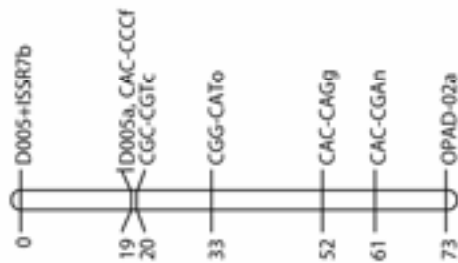
23



24



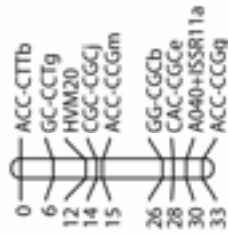
25



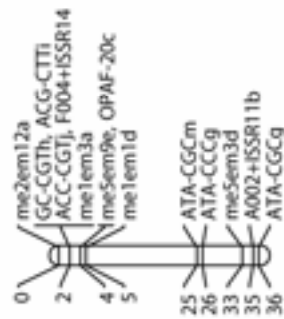
27



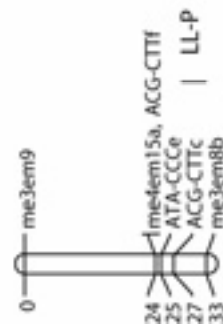
28



26



22



Taulukko 4. Yhteenveto kauran geenikartasta.

Ryhmä	Merkkien määrä	Pituus (cM)	Vinosti segregoituvat merkit		yht.
			liikaa Aslakia	liikaa Matilda	
1	47	71	9	0	9
2	42	47	0	7	7
3	25	92	20	0	20
4	12	38	11	0	11
5	8	34	5	0	5
6	7	44	7	0	7
7	71	102	62	0	62
8	20	42	20	0	20
9	7	19	7	0	7
10	52	62	19	0	19
11	13	23	2	1	3
12	17	34	17	0	17
13	51	101	17	0	17
14	37	107	9	0	9
15	24	37	21	0	21
16	15	71	0	6	6
17	36	84	25	0	25
18	28	33	28	0	28
19	18	119	0	3	3
20	7	42	3	0	3
21	24	30	0	21	21
22	6	33	1	1	2
23	15	50	0	0	0
24	9	63	5	0	5
25	8	73	4	0	4
26	14	36	0	0	0
27	6	25	5	0	5
28	9	33	7	0	7
yht.	628	1545	304	39	343

QTL-analyysit (Kuva 8) pohjautuivat vuoden 2005 ja 2006 kenttäkokeiden ominaisuustietoihin. Öljypitoisuuden vaikuttavia kromosomialueita löytyi seitsemän, näistä neljä oli samoja kumpanakin havainnointivuotena. Kukin QTL selitti 12 – 29 % öljypitoisuuden vaihtelusta ja Matildan alleelit lisäsivät öljypitoisuutta. Matilda on vanhemmista se, jonka öljypitoisuudet olivat korkeammat. Öljypitoisuuden vaikuttavaan kandidaattigeeniin, ACCaasiin, kehitettyjen SNP-merkkien avulla, pystyttiin paikantamaan öljypitoisuuden vaikuttavat kromosomialueet suhteessa ACCaasi-geeneihin. Kaksi öljypitoisuuden vaikuttavista QTL-lokuksista sijoittui samoihin kytkentäryhmiin kuin

ACCaasi-lokukset, mikä vahvistaa ACCaasi-geenin vaikuttavan öljypitoisuuden myös meidän kaurajälkeläistössämme. β -Glukaaniin vaikuttavia kromosomialueita löytyi kaksi, jotka yhdessä selittävät 37 % ominaisuuden vaihtelusta populaatiossa. Aslakin alleeleilla on odotetusti β -glukaania lisäävä vaikutus, onhan Aslak risteytysjälkeläistön vanhemmista se, jolla on korkeampi β -glukaanipitoisuus. Sekä β -glukaanin että öljypitoisuuden suhteen edulliset alleelit tulevat vain toiselta vanhemmalta; näin ollen tästä risteytyksestä ei ole odotettavissa geenikombinaatioita, jotka nostaisivat jälkeläislinjan ko. ominaisuudessa vanhempaislajiketta paremmaksi. Tämä näkyy erityisen selvästi öljypitoisuudessa, jonka suhteen jälkeläistöstä ei juurikaan löydy Matilda parempia linjoja (Kuva 4).

Lehtilaikkutaudin kestävyyttä testattiin kasvihuoneella kahdella eri isolaatilla ja havainnointiin peltokokeissa. Kasvihuoneella toista isolaattia kohtaan löytyi kaksi vaikuttavaa kromosomialuetta (vaikutus 15 - 34 %) ja toista isolaattia kohtaan yksi (vaikutus 24 %). Vaikuttavat kromosomialueet olivat isolaattispesifisiä. Peltokokeissa löytyi kolme vaikuttavaa aluetta, joista yksi oli sama kuin kasvihuoneella löytynyt. Matildan alleelit lisäsivät lehtilaikkutaudinkestävyyttä. Virallisten lajikekokeiden perusteella oli odotettavissa eroja Aslakin ja Matildan kenttäkestävyydessä, Matildan ollessa kestävämpi, vaikka varsinaisia suurivaikutteisia kestävyysgeenejä lehtilaikkutautia vastaan ei kummassakaan lajikkeessa tiettävästi ole. Peltokokeissa löytyneillä kromosomialueilla saattaa siis esim. olla geenejä, jotka hidastavat taudin etenemistä. Kauran lehtilaikkutautia on tutkittu vähän ja saamiemme tulosten tulkitseminen vaatii lisätutkimuksia. Mikäli kauraan halutaan jalostaa tehokkaasti lehtilaikkutaudin kestävyyttä, tulisi etsiä hyviä kestävyyslähteitä ja takaisinristeyttää suurivaikutteiset kestävyysgeenit kauran jalostusmateriaaliin. Tätä prosessia kyettäisiin suuresti helpottamaan kestävyysgeeneihin liittyvillä DNA-merkeillä.

Myös agronomisia ominaisuuksia määritettiin ja niihin vaikuttavia geenilokuksia voitiin sijoittaa geenikartalle (Taulukko 5). Eri vuosina saattoi löytyä eri määrä ominaisuuteen vaikuttavia lokuksia, mikä on ymmärrettävää silloin, kun kyseessä ovat monimutkaisesti määräytyvät ominaisuudet, joihin ympäristöolosuhteet vaikuttavat. Vuodet 2005 ja 2006 olivat sääoloiltaan varsin erilaiset. Myös koeruudut olivat eri kokoisia, vuonna 2005 yhden neliön ruutuja ja vuonna 2006 kuuden neliön ruutuja, mikä vaikutti varsinkin sato-ominaisuuksien määrittämiseen. Tietyt kromosomialueet vaikuttivat useaan eri ominaisuuteen, esim. kytkentäryhmissä 7 ja 11 olevat QTL:t vaikuttivat sekä rasva- että valkuaisainepitoisuuteen. Jalostajan kannalta jalostettaviin ominaisuuksiin vaikuttavien geenien sijainti lähekkäin voi olla sekä etu että haitta. Jos edulliset geenimuodot eli alleelit tulevat ristetyksessä samalta vanhemmalta, kuten tässä tapauksessa öljy- ja proteiinipitoisuutta kohottavat alleelit Matildalta, ne on risteytyksissäkin helpompi säilyttää mukana kun ne sijaitsevat samalla kromosomialueella. Jos taas halutaan yhdistää kahden eri vanhemman edulliset ominaisuudet jälkeläistössä, ominaisuuksiin vaikuttavi-

en geenien sijaitseminen lähekkäin tekee jalostuksen työläemmäksi. Tarvi-
taan hyvin suuri jälkeläistö, jotta kyetään löytämään jälkeläislinja, jossa re-
kombinaatio on tapahtunut juuri noiden lähekkäin sijaitsevien geenien välis-
sä.

Silloin kun ominaisuuteen vaikuttivat useat lokukset, ominaisuutta lisäävä
alleeli saattoi olla peräisin kummalta vanhemmalta hyvänsä. Tällaisia omi-
naisuuksia olivat mm. valkuaispitoisuus, tuhannen jyvän paino, kasvuaika ja
satoisuus. Näissä tapauksissa jälkeläistöstä on mahdollista löytää linjoja,
jotka ovat tiettyssä ominaisuudessa geneettisesti molempia vanhempiaan pa-
rempia. Merkkiavusteisen jalostuksen avulla on mahdollista erottaa jälkeläi-
sistä ne, jotka kantavat mahdollisimman suurta määrää edullisia alleleita.
Pitkälle edistyneessä merkkiavusteisessa jalostuksessa voitaisiin valita jo
vanhemmiksi sellaiset lajikkeet, joiden geenit täydentävät hyvin toisiaan ja
tuottavat vanhempiaan parempia jalostuslinjoja.

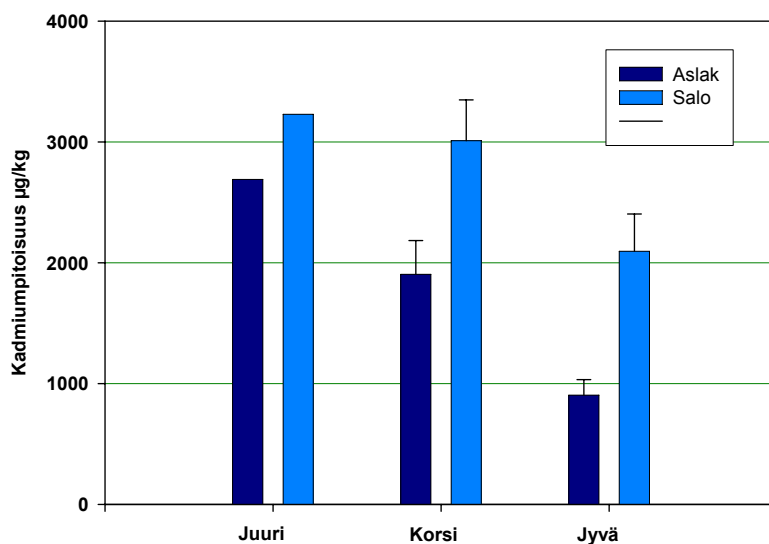
Taulukko 5. Agronomisiin ominaisuuksiin vaikuttavien geenilokusten sijoittu-
minen geenikartalle. Ominaisuudet mitattiin kahtena vuotena kolmea ominai-
suutta lukuun ottamatta.

Ominaisuus	Kytkentä- ryhmä 2005	Kytkentä- ryhmä 2006	Ominaisuut- ta lisäävä alleeli	yksittäisen QTL:n vai- kutuksen (%)
Valkuaisainepi- toisuus	7, 11, 12, 19, 21	7, 11, 19, 21	Aslakilta ja Matildalta	11 - 35
Hehtolitraino	15, 19	12	Aslakilta	10 - 16
Tuhannenjy- vänpaino	7, 17, 27	27	Aslakilta ja Matildalta	9 - 13
Kasvuaika	12, 17, 19	-	Aslakilta ja Matildalta	11 - 35
Pituus	-	7, 9, 17	Aslakilta	17 - 32
Sato	-	12, 19	Aslakilta ja Matildalta	14 - 41

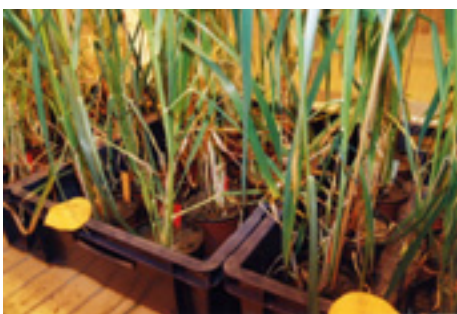
Aslak × Salo F₂ – jälkeläistö: kadmiumin kertymiseen vaikuttavi- en geenien kartoitus

Kadmiumin kertymiseen Aslak ja Salo lajikkeisiin vaikuttivat lajike ja kas-
vinosa (Kuvat 9 ja 10). Kadmiumpitoisuudet olivat suurimmat juurissa ja
pienimmät jyvässä. Lajikkeiden välinen ero oli pienin juurissa ja suurin jyvis-
sä.

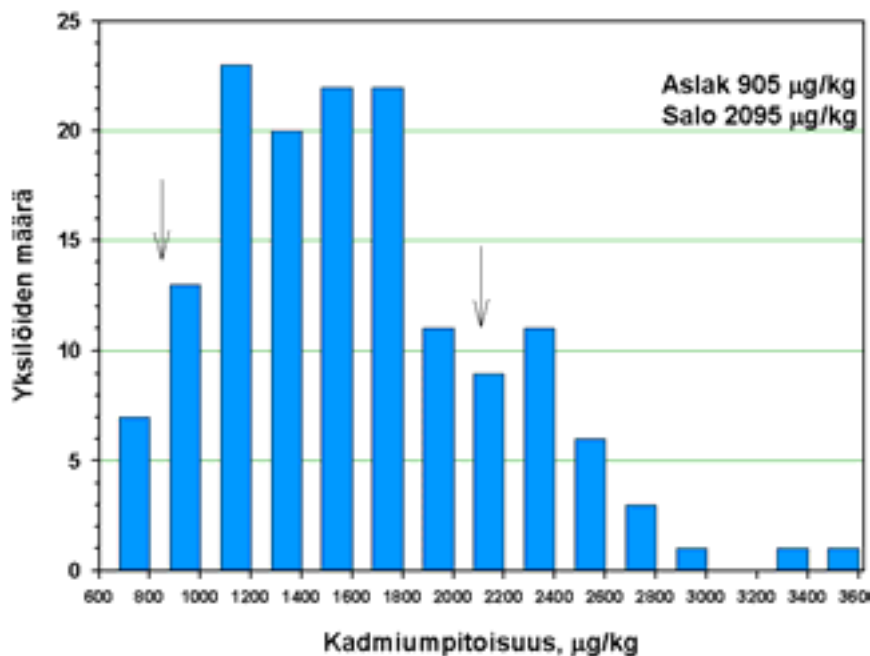
F₂-kasvien jyviin kertyi kadmiumia keskimäärin 1575 µg/kg ja linjojen pitoi-
suudet vaihtelivat välillä 650 - 3490 µg/kg. Yksilöiden jakautuminen ominai-
suuden suhteen (Kuva 11) viittaa siihen, että kadmiumin kertymistä säätelee
yksi suurivaikutteinen geeni yhdessä muutamien pienivaikutteisempien gee-
nien kanssa.



Kuva 9. Kadmiumin kertyminen Aslakin ja Salon juuriin, korsiin ja jyviin kasvihuoneessa suoritetussa astiakokeessa, kun kasvatusalustana käytettyyn turve-kivennäismaa seokseen oli lisätty 0,5 mg/kg kadmiumia.



Kuva 10. Astiakoe jossa tutkittiin kauralajikkeiden kadmiuminkeittämisokyä kasvatusalustassa, johon oli lisätty kadmiumnitraattia. (kuvat E. Kiviharju)



Kuva 11. Kadmiumin kertyminen jyviin Aslak × Salo F₂-jälkeläisissä. Vanhemmista on ilmoitettu neljän kerranteen keskiarvo. Kadmiumpitoisuus analysoitiin ICP-MS –menetelmällä.

Kadmiumiin liittyvää DNA-merkkiä etsittiin kandidaattigeenien sekä BSA-menetelmän (Bulked Segregant Analysis, Michelmore ym. 1991) avulla. Erot Aslakin ja Salon kadmiumin kertymisessä voivat johtua useastakin eri syystä. Astiakokeen tulokset viittasivat siihen mahdollisuuteen, että erot voisivat liittyä kadmiumin kulkeutumiseen kasvin sisällä (jyvissä suurempi ero kertymisessä kuin juurissa). Kandidaattigeeneiksi valittiin sen vuoksi kuljettaja-proteiineja (Clemens 2001): IRT2 riisiltä (vastaa Arabidopsiksen IRT1:tä, joka mahdollisesti kuljettaa kadmiumia), ZIP4 Arabidopsikselta (kuljettaa sinkkiä ja kadmiumia), LCT1 vehnältä (kuljettaa kalsiumia ja kadmiumia), Nramp3 riisiltä (kuljettaa rautaa ja kadmiumia), lisäksi fytokelatiinisyntaasigeeni, joka inaktivoi kadmiumia. Näiden geenien sekvensseihin perustuen suunniteltiin alukkeita ja yritettiin monistaa vastaavia geenejä kauralta. Osa geeneistä ei monistunut lainkaan ja osasta monistui tuote, joka ei kuitenkaan sekvensointituloksen perusteella näyttänyt olevan haluttu geeni. Syynä on todennäköisesti se, että kun alukkeet on suunniteltu toisen lajin sekvenssin perusteella, täytyy monistettaessa käyttää melko alhaista kiinnittymislämpötilaa, jolloin saattaa monistua väriäkin geenejä. Kandidaattigeenilähestymistapa ei siis tuottanut tulosta.

BSA-menetelmässä yhdeksän mahdollisimman vähän kadmiumia keräävän F₂-yksilön ja yhdeksän mahdollisimman paljon kadmiumia keräävän F₂-yksilön DNA:t yhdistettiin kahdeksi bulkkinäytteeksi. Bulkkeja testattiin

DNA-merkeillä ja jos löytyi bulkeissa monimuotoinen DNA-merkki, se analysoitiin bulkkien yksittäisissä kasveissa. Mikäli merkki näytti liittyvän kadmiumin kertymiseen, se lopulta analysoitiin koko F₂-jälkeläistössä. Aluksi kuitenkin testattiin Aslakia ja Saloa monimuotoisten DNA-merkkien löytämiseksi yhteensä 218 RAPD-, 31 SRAP- ja 337 REMAP-alueyhdistelmällä. Vanhemmissa monimuotoisista DNA-merkeistä (78 RAPD-, 26 SRAP- ja 73 REMAP-merkkiä) myös bulkeissa monimuotoisiksi todettiin kaksi RAPD-, 5 SRAP- ja 4 REMAP-merkkiä, jotka analysoitiin bulkkien yksittäisissä kasveissa. Kadmiumin kertymiseen näytti kytkeytyvän neljä merkkiä (kaksi RAPD-merkkiä: AF15 ja AF20, yksi SRAP: me1em6 ja yksi REMAP: A002+(AC)₉G), jotka analysoitiin koko F₂-populaatiossa ja niiden liittyminen kadmiumin kertymiseen varmistui (Taulukko 6). Muut paitsi SRAP-merkki muutettiin helppokäyttöisemmiksi SCAR-merkeiksi. RAPD AF20 muuttui kodominoivaksi SCAR-merkinä. Kaikki neljä merkkiä kartoittuvat lähelle toisiaan lyhyelle alueelle (10.2 cM), joka sisälsi kadmiumin kertymiseen vaikuttavan geenilokuksen. Locus selitti kadmiumin vaihtelusta yli 50 % eli on suurivaikutteinen locus.

Taulukko 6. DNA-merkkien liittyminen kadmiumin kertymiseen (keskiarvo ± keskihajonta; yksilömäärä suluisissa) varianssianalyysillä testattuna (F= testisuure, R² = se osa fenotyypisistä vaihtelusta, joka voidaan selittää merkin avulla, P < 0.0001). A = yksilöt, joilla on merkki, C = yksilöt, joilta merkki puuttuu; poikkeuksena SCAR AF20, joka oli kodominoiva, ja sen vuoksi A ja C edustavat yksilöitä, joilla on eri kokoiset alleelit ja B heterotsygootteja.

DNA-merkki	Cd:n kertyminen (µg/kg)			F	R ²
	A	B	C		
SCAR AF20	1151 ± 332 (37)	1463 ± 384 (69)	2107 ± 508 (44)	54,21	0,42
SCAR AF15	1702 ± 539 (118)	-	1103 ± 257 (32)	44,05	0,23
SCAR A002+(AC) ₉ G	1371 ± 411 (109)	-	2117 ± 506 (41)	71,82	0,33
SRAP me1em6 ₄₉₀	1388 ± 421 (104)	-	2051 ± 549 (43)	66,79	0,31

Merkit sekvensoitiin ja verrattiin geenipankissa oleviin sekvensseihin. SCAR AF15 oli homologinen (nukleotidivastaavuus 225/267 = 87 %) vehnän WAK3 (wall-associated kinase) – geenin kanssa. WAKit kuuluvat reseptorinkaltaisten kinaasien geeniperheeseen, ja niillä on monenlaisia tehtäviä mm. Arabidopsiksella WAK vaikuttaa alumiinitoleranssiin (Sivaguru ym. 2003) ja WAKin kaltainen proteini (WAKL4) indusoituu kuparilla, nikkelillä ja sinkillä (Hou ym. 2005). WAK3 saattaa siis olla Cd:n kertymisen kandidaattigeeni, mutta asia vaatii lisäselvityksiä.

Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa laadittiin kauran geenikartta käyttäen pohjoismaista Aslak × Matilda risteytysjälkeläistöä. Kartta on ainutlaatuinen myös siksi, että siinä käytettiin ponsiviljelyssä tuotettua DH-jälkeläistöä. Karttaan paikannettiin useita laatu- ja taudinkestävyysominaisuuksiin vaikuttavia kromosomialueita, ja alustavissa analyyseissä löytyi myös viljelyominaisuuksiin vaikuttavia alueita. Kauranjalostaja voi käyttää karttaa apuna uusien lajikkeiden jalostamisessa, koska sen avulla saadaan tietoa näiden hyödyllisten ominaisuuksien periytymisestä. Lisäksi lähellä toivottuun ominaisuuteen positiivisesti vaikuttavaa geeniä olevia DNA-merkkejä voidaan käyttää merkkiavusteisessa valinnassa. Kaikki kartalle paikannetut ominaisuudet ovat sellaisia, joihin vaikuttaa useampi kuin yksi geeni, jolloin yksittäisen geenin vaikutus ei välttämättä ole kovin suuri. Tällöin DNA-merkeillä kannattaa valita useampaa geeniä yhtäikää.

Toista risteytysjälkeläistöä käyttäen (Aslak × Salo F₂-jälkeläistö) löydettiin kadmiumin kertymiseen kytkeytyneitä DNA-merkkejä. Varsinkin SCAR AF15-merkki olisi erityisen sopiva käytettäväksi merkkiavusteisessa valinnassa, koska se tunnistaa alhaisen keräytymisen suhteen homotsygootit yksilöt. Merkki ei antanut risteytysjälkeläistössämme yhtään jalostajan kannalta 'haitallisen' väärää tulosta eli osoittanut alhaiseksi kerääjäksi kasvia, joka itse asiassa olisikin kerännyt paljon kadmiumia.

Geeninsiirtojen hyödyntäminen jalostuksessa

Anneli Ritala¹⁾, Tapani Suortti¹⁾, Ruslan Kalendar²⁾, Marjatta Salmenkallio-Marttila¹⁾, Kirsi-Marja Oksman-Caldentey¹⁾, Alan Schulman^{2,3)} ja Anna Maria Nuutila¹⁾

¹⁾ VTT, Valtion teknillinen tutkimuskeskus, PL 1000, Tietotie 2, 02044 VTT, Espoo, etunimi.sukunimi@vtt.fi;

²⁾ MTT / BI Kasvigenomiikan laboratorio, Biotekniikan instituutti, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

³⁾ MTT, Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Kasvigenomiikka, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

Johdanto

Perinteinen viljelykasvien lajikejalostus on aikaa vievää. Nykyaikaisen biotekniikan avulla voidaan kuitenkin tehostaa ja lyhentää lajikkeenjalostusohjelmia. Lisäksi avautuu kokonaan uusia mahdollisuuksia muuttaa viljelykasvien perimää. Näin viljelijöiden, kuluttajien ja teollisuuden toiveisiin voidaan vastata entistä nopeammin.

Elintarviketeollisuutta kiinnostavat kauran terveysvaikutukset. Yhdysvalloissa FDA hyväksyi kauratuotteisiin terveysväittämän "Runsaasti kauralesettä tai kaurahiutaleita sisältävä vähärasvainen ja -kolesterolinen ruokavalio voi alentaa sydäntautiriskiä". Tämä oli seurausta The Quaker Oats Companyn vuonna 1995 tekemästä anomuksesta, jonka tueksi he esittivät 37 tutkimusta vuosilta 1981 - 1994 (Paul ym. 1999). Kauran terveysvaikutukset yhdistetään pääosin kauran sisältämään β -glukaaniin. β -Glukaani on ravintokuitua, joka ei pilkkoudu ruuansulatusentsyymien vaikutuksesta. Suurin osa β -glukaanista (n. 60%) on ns. liukoista ravintokuitua, joka aiheuttaa seerumin kolesterolin alenemisen sekä tasapainottaa veren aterianjälkeistä glukoosi- ja insuliinipitoisuuden nousua. Nämä terveysvaikutukset taas vähentävät riskiä sairastua sydän- ja sepelvaltimotauteihin.

Ensimmäiset geeninsiirrot kasveihin tehtiin jo 1980-luvun alussa, mutta menetelmät geenien siirtämiseksi viljoihin kehitettiin vasta 1990-luvulla partikkelipommituksen tullessa laajaan käyttöön. Ensimmäisinä tuotettiin siirtogeeninen maissi vuonna 1990 (Fromm ym. 1990) ja riisi vuonna 1991 (Christou ym. 1991). Somers ja työtoverit (1992) tuottivat ensimmäisen siirtogeenisen kauran käyttämällä embryogeenistä soluviljelmää partikkelipommituksen kohdemateriaalina. Myöhemmin Gless ja työtoverit (1998) raportoivat käyttäneensä menestyksekkäästi myös kauran lehdentyvisolukkoa geeninsiirron kohteena. Useat ryhmät käyttävät edelleen embryogeenistä soluviljelmää kohdemateriaalina (Kaepler ym. 2000).

Geeninsiirtojen avulla voidaan tehdä ns. täsmälajostusta, eli kasviin voidaan siirtää ainoastaan juuri haluttu geeni. Lisäksi menetelmä mahdollistaa sen, että haluttua ominaisuutta koodaava geeni voidaan etsiä lajista, joka ei perinteisillä menetelmillä risteytyisi esimerkiksi kauran kanssa. Tällaisella täsmälajostuksella voidaan vaikuttaa kasvin moniin eri ominaisuuksiin, mm. laatu-tekijöitä voidaan parantaa elintarvikekäyttöä varten.

Risteytysjalostuksella voidaan vaikuttaa kauran β -glukaanipitoisuuteen kauralajikkeissa esiintyvän vaihteluun rajoissa (Holthaus ym. 1996, Humphreys & Mather 1996, Baur & Geisler 1996a, Baur & Geisler 1996b, Kibite & Edney 1998). Moderni biotekniikka tarjoaa mahdollisuuden ominaisuuden täsmälajostukseen. Kauraan voidaan siirtää tehokkaampi β -glukaanisyntaasia koodaava geeni, ja siten nostaa β -glukaanipitoisuus korkeammalle tasolle kuin perinteisen risteytysjalostuksen keinoin on mahdollista.

Kuluttajahyväksyntää GM-kasveja kohtaan voidaan todennäköisesti parantaa, kun sovellusgeeni on kasviperäinen, eikä kasveissa ole halutun sovellusgeenin lisäksi merkkigenejä. Lisäksi laatuominaisuuksien parantaminen, esimerkiksi korkeamman β -glukaanipitoisuuden omaava kaura, lienee kuluttajille hyväksyttävämpi tavoite kuin esimerkiksi torjunta-aine tai viruskestävyyden parantaminen. Heinäkasveissa esiintyvän (1->3)(1->4)- β -D-glukaanin biosynteesiä oltiin projektin alkaessa vasta selvittämässä, eikä sen tutkimisessa oltu vielä päästy geenitasolle (Buckeridge ym. 1999). Toisaalta, ongelmaa oli lähestytty perinteisen biokemian keinoin. Geenikartoitus ja EST-krjastot (Expressed Sequence Tag) avasivat työhön uusia mahdollisuuksia. Tavoitteena oli etsiä ohran EST-kirjastosta β -glukaanisyntaasigeeni homologiahauulla ja käyttää kasviperäistä geeniä geeninsiirroissa.

Aineisto ja menetelmät

Kauran mikrosporiviljely

Kauran mikrosporiviljelymateriaalina käytettiin kotimaisia kauralajikkeita Aslak ja Veli. Materiaali kerättiin kasvihuoneelta mikrosporien ollessa keskiyksituma – aikaisessa kaksitumavaiheessa. Shokkikäsittelyinä käytettiin 1-6 viikon +4°C -kylmäsäilytystä avaamalla röyhyt petrimaljoille kostean suodatinpaperin päälle. Mikrosporien eristyksessä tähkylöiden hienontamisessa käytettiin tehosekoitinta. Tähkylöiden kärjistä leikattiin puolet pois ja loppuosa paloiteltiin mahdollisimman pieniksi paloiksi. Eristysliuoksena käytettiin 0,3M mannitolia ja mikrosporit kerättiin siivilöimällä ja sentrifugoimalla (85 g, 10 min) erilleen muusta solukkojätteestä. Elävien mikrosporien fraktio rikastettiin maltoosigradianttifuugauksella (25 % (w/v) maltoosi). Kasvatusalustoina ja viljelymenetelminä käytettiin sekä Kiviharju ym. (2005) kauran ponsiviljelylle optimoimia olosuhteita, että ohran mikrosporiviljelylle optimoituja alustoja ja olosuhteita (Ritala ym. 2001).

Kauran solukkoviljely

Kauran solukkoviljelmiä tuotettiin lajikkeista Kolbu, Aslak ja Veli käyttäen Somersin ja työtovereiden menetelmää (1992). Kypsät jyvät pintasteriloitiin seuraavan käsittelyn mukaisesti: 70 % etanoli kolme minuuttia, 8-10 % natriumhypokloriitti 20 minuuttia ja viisi huuhtelua steriilillä vedellä. Jyvien annettiin itää 2-3 vuorokautta pimeässä +22°C lämpötilassa. Jyvien kasvupisteet eristettiin MS-pohjaiselle kasvualustalle (2mg/l 2,4-D, Murashige ja Skoog 1962, Bregitzer ym. 1989, Kaepler ym 2000) ja kasvatettiin pimeässä +22°C lämpötilassa. Noin kolmen viikon kuluttua kasvupisteistä oli indusoitunut embryogeenistä kallusta. Solukot siirrostettiin noin kuukauden välein uusille kasvualustoille.

Kaurasolujen soluseinien mikroskooppinen tarkastelu

Kaurasolujen soluseinien mikroskooppinen tarkastelu suoritettiin Salmenkalio-Marttila ym. (2004) mukaan. Mikroskooppista tarkastelua varten kaurasolukkoa levitettiin ohueksi kerrokseksi objektilasille ja näytteiden annettiin hiukan kuivahtaa. Sivelynäytteet värjättiin 0,001 % (w/v) Calcofluor White:lla (Fluorescent brightener 28, Aldrich, Saksa). Jyvät fiksoitiin 1 % glutaraldehydillä 0,1 M fosfaattipuskurissa pH 7,0, pestiin vedellä, kuivattiin nousevassa etanolisarjassa (50 % - 70 % - 94 %), imeytettiin muoviin ja polymeroitiin valmistajan ohjeiden mukaan (Historesin Embedding Kit, Reichert-Jung, Saksa). Näytteistä leikattiin mikrotomilla 4 µm leikkeitä. Leikkeet värjättiin 0,1 % hapan fuksiinilla (Gurr BDH Chemicals Ltd, Poole, UK) ja 0,01 % Calcofluorilla. Näytteitä tarkasteltiin Olympus BX-50 mikroskoopilla UV-valossa (epifluoresenssi: eksitaatio 400–410 nm, emissio >500 nm): hapan fuksiini värjää proteiinin punaiseksi, calcofluorilla värjätyt soluseinät erottuvat vaalean sinisenä, tärkkelys ei värjäydy vaan erottuu tummana. Fluoresoivassa valossa β-glukaanin sisältävät soluseinät näkyvät vaalean sinisinä: heikko fluoresenssi indikoi matalaa β-glukaanin pitoisuutta, voimakas fluoresenssi indikoi suurempaa β-glukaanin pitoisuutta. Näytteet valokuvattiin käyttäen SensiCam PCO CCD kameraa (Kelheim, Saksa) ja AnalySIS 3.0 -ohjelmaa (Soft Imaging System, Münster, Saksa).

β-Glukaanimääritykset HPLC-menetelmällä

Solukkojen ja jyvien β-glukaanimääritykset tehtiin Suortti (1993) mukaan. Näytteet jauhettiin hienoksi ja liuotettiin 0,1N NaOH- 0,1% NaBH₄ liuokseen. Nestekromatografialaitteisto koostui Alliance-nestekromatografista ja M474-fluoresenssidetektorista (eksitaatio 410 nm ja emissio 430 nm). Kolonnit olivat µHydrogel 2000, 500 ja 250 (60°C lämpötilassa) ja eluenttina käytettiin 50 mM NaOH (500 µL/min virtausnopeudella). Kolonnin jälkeen eluenttiin sekoitettiin Calcofluor-reagenssia (400 µL/min, 120 mg/l väkevyi-

senä) ja muodostuneen fluoresoivan kompleksin fluoresenssi mitattiin. Kvantitatiivisen analyysin pohjana käytettiin kaupallisen ohran β -glukaanin eri väkevyisiä standardiliuoksia. Molekyylipainon määrittämisen pohjana käytettiin eri molekyylipainoisia β -glukaanistandardeja, joiden molekyylipaino oli määritetty valonsirontadetektorilla.

Siirtogeenisten kaurasolukkojen tuottaminen

Mikrobiaalisen geta-glukaanisyntaasin ekspressoimiseksi kaurassa rakennettiin geeninsiirtovektori pARM01, jossa mikrobiaalista 1,3- β -D-glukaanisyntaasia koodaava geeni (*GSCI*, Inoe ym. 1995) vietiin BamHI-fragmenttina konstitutiivisen maissin ubikitiini promoottorin (*ubi*) ja ensimmäisen intronin (*I*) säätelyyn. Embryogeenistä kallusta (n. 16 – 18 viikkoa kasvupisteiden eristyksestä) pommitettiin pARM01- plasmidilla yhdessä pKRA-plasmidin kanssa. Jälkimmäinen sisältää siirtogeenisten solujen selektioapuvälineenä käytetyn herbisidiresistenssigeenin (*bar*) myös ubikitiini promoottorin ja ensimmäisen intronin säätelyssä. Geeninsiirto pommittamalla tehtiin laitteella Bio-Rad, PDS-1000/He käyttäen Wan & Lemaux (1994) ja Kaeppler ym (2000) menetelmiä. Pommitusta varten solukko siirrostettiin osmoosialustalle (0.2M mannitoli ja 0.2M sorbitoli) n. neljä tuntia ennen pommitusta (Kaeppler ym. 2000). Pommitettua solukkoa inkuboitiin osmoosialustalla n. 16 - 18 tuntia, jonka jälkeen se siirrettiin normaalille MS-pohjaiselle alustalle. Noin viikon kuluttua pommituksesta solukko siirrostettiin 3 mg/l fosfinotrisiini-selektiolle. Solukkoja kasvatettiin pimeässä +22°C:ssa. Selektiolla kasvamaan lähteneet solulinjat siirrostettiin uusille alustoille 3-4 viikon välein.

Siirtogeenisten kaurasolukkojen regenerointi kasveiksi

Siirtogeenisiksi PCR-analyysillä osoitetut solukot maljattiin MS-pohjaiselle alustalle (0,2 mg/l BAP, 2 mg/l NAA, 3 mg/l fosfinotrisiini; Bergitzer ym. 1989) valoon +22°C. Pienet regenerantit siirrettiin MS-pohjaiselle juurrutuslualustalle (ei kasvuhormoneja, 2 mg/l fosfinotrisiini; Bergitzer ym. 1989). Juurtuneiden versojen siirtogeenisyys varmennettiin PCR-analyysillä ja ne siirrettiin multaan kasvihuoneelle.

Siirtogeenisten kaurasolukkojen ja kasvien analysointi PCR ja Southern blot –tekniikoilla

Siirtogeenisyyden varmentamiseksi kalluksista ja kasvien lehdistä eristettiin totaali-DNA käyttäen CTAB-menetelmää (Murray ja Thompson 1980).

Polymeraasiketjurektioanalyysiä (PCR) varten *GSCI*-geenille suunniteltiin seuraavat alukkeet: *GSCI*L 5'-AACCTTATCAGGGCCAAACG ja *GSCI*R 5'-GATATGACGA ACTCTTCCAGGG, joiden avulla PCR-ajossa amplifoidaan 899 bp-fragmentti. PCR-ajot tehtiin Peltier Thermal Cycler – laitteella

8PTC-2000, MJ Research), primerien kiinnittymislämpötilana (annealing) käytettiin 56°C ja syklejä ajettiin 35.

Southern blot hybridisaatio – analyysiä varten digestoitiin 100 µg genomista DNA:ta Eco RI entsyymillä. Digestoitu DNA eroteltiin elektroforeesin avulla 0,8 % agarosigeelissä. Geeli blotattiin Hybond-N (Amersham) kalvolle. Hybridisaatiokoettimena käytettiin digi-leimattua 899bp *GSC1*-fragmenttia (DIG High Prime DNA Labelling and Detection Kit, 1585614 Roche). Hybridisaatiot, filtterien pesut ja detektiot tehtiin DIG-leimauskitin ohjeiden mukaan.

Siirtogeenin ilmenemisen analysointi RT-PCR-tekniikan avulla

Siirtogeenin ilmeneminen analysoitiin semi-kvantitatiivisen RT-PCR avulla Sasaki ym. (2005) mukaan. Solukoista eristettiin kokonais-RNA käyttäen Qiagen Rneasy Plant Mini Kittiiä (74904). Seuraavaksi eristetty RNA käänteistranskriptoitiin (RT) SuperScript III Rnase H transkriptaasilla (Invitrogen). RT-tuotetta käytettiin templaattina PCR:ssa ja alukkeina toimivat *GSC1L* ja *GSC1R* ja DNA-polymeraasina käytettiin *Taq*. Semi-kvantitatiivisessa RT-PCR:ssa käytettiin kontrollina aktiinia.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

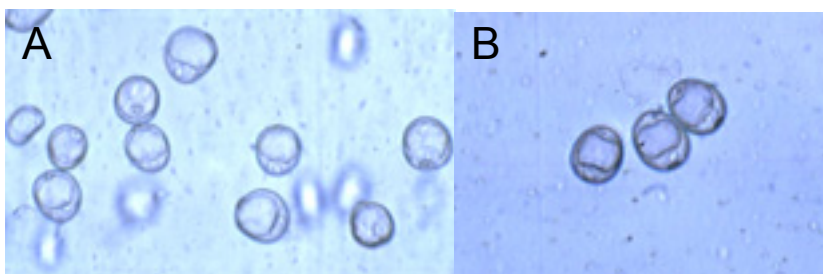
Kauran mikrosporiviljely

Yleisesti ottaen geeninsiirto haploideihin soluihin nopeuttaa siirtogeenisten kasvien tuottamista, koska siirtogeeni saadaan perimän kahdentamisen seurauksena suoraan molempiin vastinkromosomeihin heti ensimmäisessä sukupolvessa. Projektissa "Kasvibioteekniikan soveltaminen kauranjalostuksessa" tehtiin alustavia geeninsiirtokokeita haploideihin embryogeenisiin solukkolinjoihin. Nämä linjat oli aloitettu ponsiviljelyssä tuotetuista haploideista kalluksista. Haploidien soluviljelmien tuottoa voidaan nopeuttaa, kun aikavievä heteen ponsien eristämisvaihe jätetään pois ja viljellään eristettyjä mikrosporeja. Eristettyjä mikrosporeja voidaan käyttää myös suoraan geeninsiirron kohdesolukkona. Toimiva mikrosporiviljelymenetelmä tehostaa kaksoishaploidien kasvien tuottoa myös jalostus- ja tutkimustarkoituksiin. Mikrosporiviljelymenetelmiä on jo kehitetty useille muille viljalajeille, mm. ohralle ja vehnälle (Jähne ja Lörz 1995, Mordhost and Lörz 1993, Salmenkallio-Marttila & Kauppinen 1995, Touraev ym. 1996, Kunz ym. 2000, Ritala ym. 2001), mutta kauran mikrosporiviljelymenetelmää ei vielä ole julkaistu.

Kauran mikrosporiviljelytekniikkaa lähdettiin kehittämään kotimaisille kauralajikkeille Aslak ja Veli. Näistä Aslak toimii hyvin ponsiviljelyssä ja Veli

geeninsiirroissa. Menetelmänkehitys pohjautui MTT:n kauran ponsiviljely (Kiviharju ym. 2005) ja VTT:n ohran ponsi- ja mikrosporiviljelyosaamiseen (Salmenkallio & Kauppinen 1995, Ritala ym. 2001)

Kauran tähkylän kukkien kehitysvaihe oli hyvin erilainen, joten materiaali jaoteltiin tähkylän uloimman kukan heteiden mikrosporien kehitysvaiheen perusteella a) keski- ja myöhäisyksitumavaiheeseen ja b) myöhäisyksituma – aikainen kaksitumavaiheeseen materiaaliin. Kauran mikrosporieristyksissä onnistuttiin eristämään eläviä mikroporeja, mutta niitä ei saatu jakaantumaan (Kuva 1). Keskimäärin saanto oli 9000 elävää mikrosporia lähtömateriaaliröyhyä kohden. Materiaalin elävyydessä oli kuitenkin havaittavissa vaihtelua - heinäkuun lopussa ja elokuun alussa kylvetyn materiaalin ollen paras-ta. Tällöin saanto oli parhaimmillaan 20 000 – 30 000 elävää mikrosporia lähtömateriaaliröyhyä kohti. Eristyksistä on kooste taulukossa 1. Viljelyvaste jäi kuitenkin puuttumaan ja eri parametrien vertailu oli mahdotonta. Toimiva kauran mikrosporiviljelytekniikkaa ei saatu kehitettyä.



Kuva 1. Eristettyjä kauran mikroporeja A) Aslak B) Veli

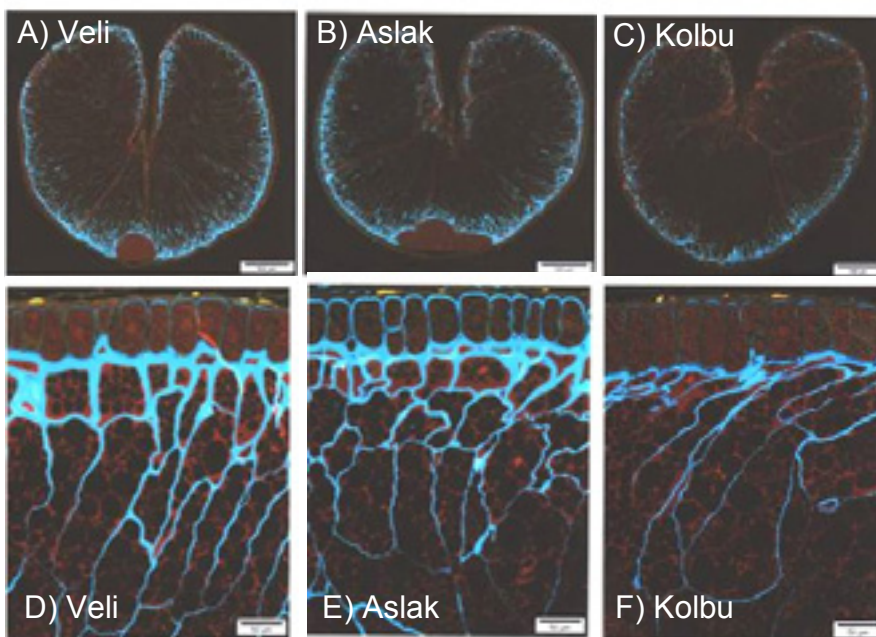
Taulukko 1. Kauran mikrosporieristykset.

Lähtömateriaalin kylvö-aika	Veli a) keski- myöhäis- yksituma- vaihe	Veli b) myöhäis- yksituma- aikainen kaksituma- vaihe	Aslak a) keski- myöhäis- yksituma- vaihe	Aslak b) myöhäis- yksituma- aikainen kaksituma- vaihe
Eristettyjen röyhyjen määrä (kpl)				
Heinäkuu	89	75	113	86
Elokuu	243	69	258	99
Syyskuu	169	18	59	-
Yhteensä	501	162	430	185
Aseptisuus	94 %	65 %	77 %	56 %

Solukkoviljelmien ja niiden aloitusmateriaalien karakterisointi

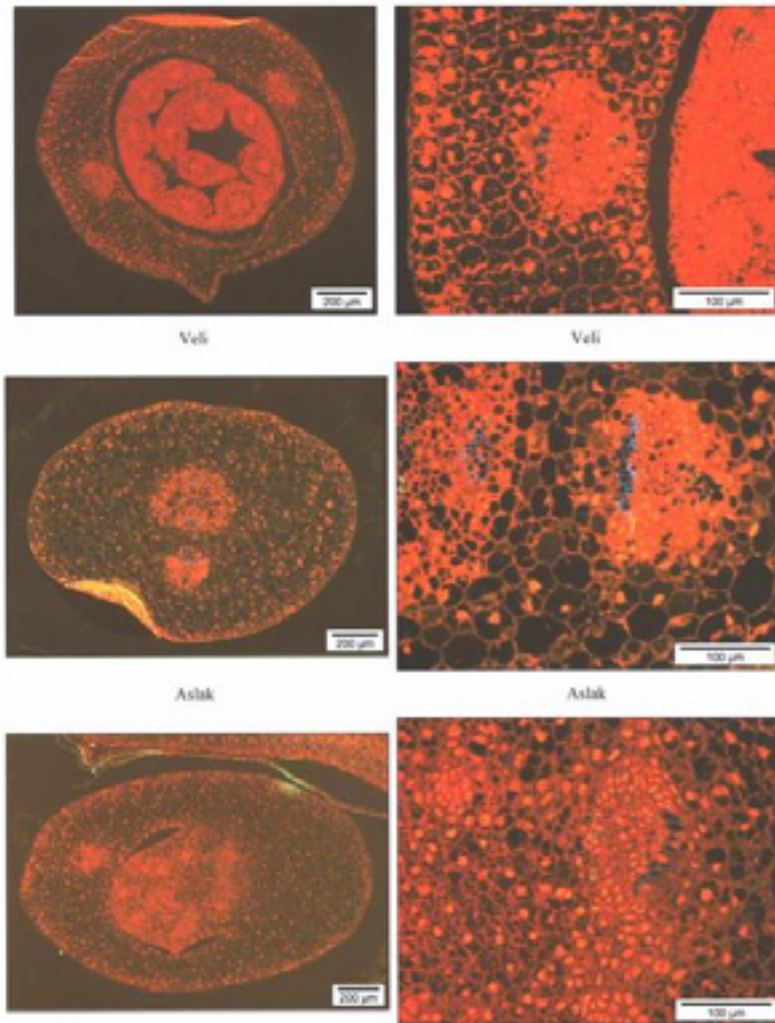
Solukkoviljelmien aloitusmateriaalina käytettyjen Aslak, Veli Ja Kolbu lajikkeiden jyvien ja apikaaliset meristeemien eli kasvupisteiden β -glukaanit määritettiin sekä Calcofluor-värjäyksellä että HPLC-menetelmällä. Lajikkeiden jyvistä tehtiin poikkileikkaukset, joista värjättiin β -glukaani (Kuva 2). β -Glukaania oli jyvän endospermin soluseinissä, erityisen runsaasti β -glukaania oli tärkkelysendospermin subaleuronikerroksen paksuissa soluseinissä. Calcofluor-värjäyksen perusteella arvioitiin, että Kolbu-lajikkeen jyvissä olisi vähemmän β -glukaania kuin Veli- ja Aslak-lajikkeiden jyvissä. HPLC-menetelmällä määritettiin kuorittujen ja jauhettujen jyvien β -glukaanin määrä ja molekyylipainojakauma (Kuva5). Jyvien β -glukaani oli molekyylipainoltaan 1-2 miljoonan luokkaa ja eniten β -glukaania oli lajikkeessa Aslak (60 g/kg). Kolbussa (40 g/kg) ja Velissä β -glukaania oli saman verran (45 g/kg).

Apikaalisista meristeemistä tehdyissä poikkileikkauksissa perussolukon soluseinissä ei erottunut värjäytynyttä β -glukaania (Kuva 3). β -Glukaani oli värjäytynyt ainoastaan johtojänteiden puutuneissa paksuissa soluseinissä. Myöskin HPLC-menetelmällä todettiin kasvupisteiden sisältävän ainoastaan hyvin pieniä määriä β -glukaania (Kuva 5).



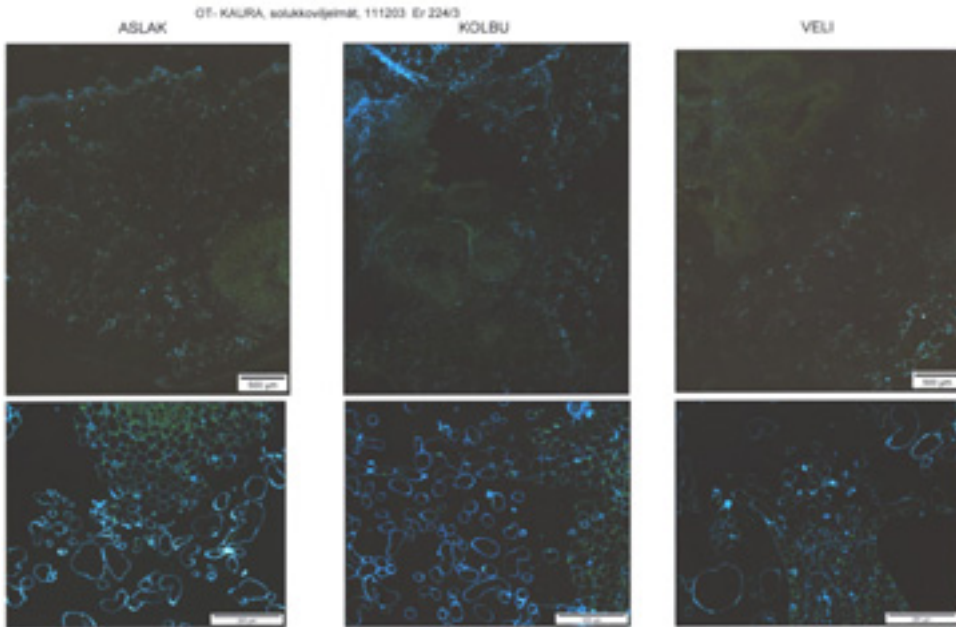
Kuva 2. Kauran jyvän poikkileikkaus. a-c) Yleiskuva, d-f) erikoiskuva aleuroni- ja subaleuronikerroksesta; β -glukaani erottuu sinisenä, proteiini on värjätty punaiseksi.

KAURAN KASVUPISTE

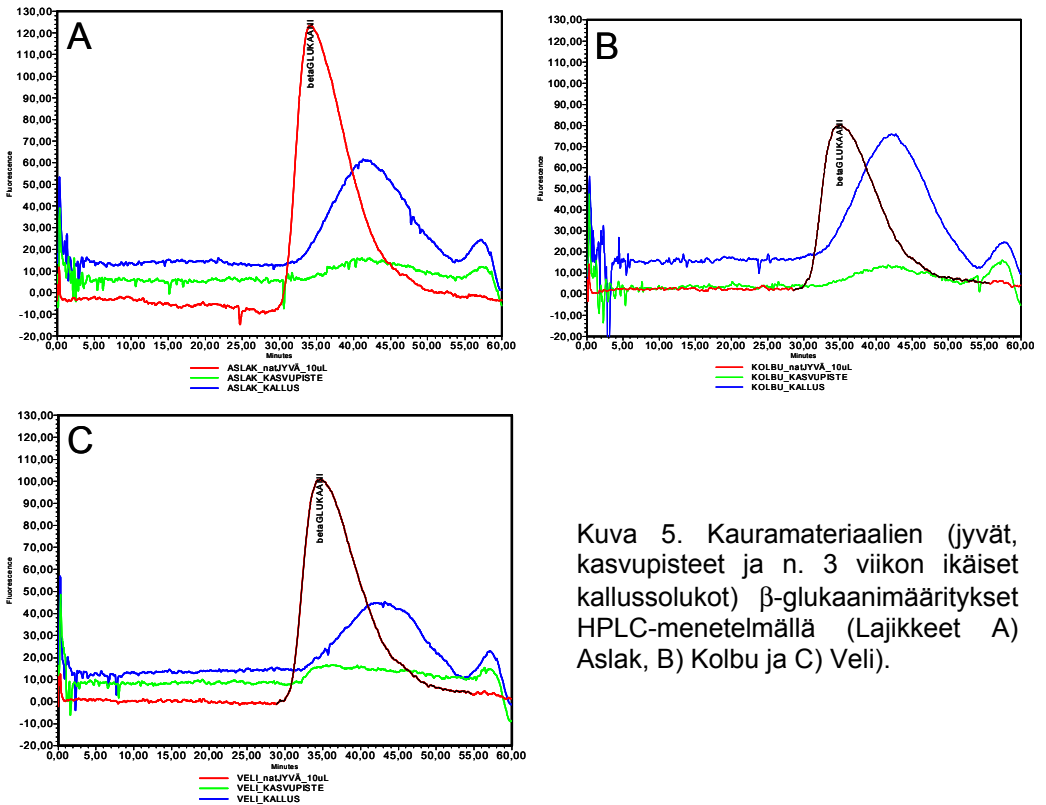


Kuva 3. Kauran apikaalisen meristeemin eli kasvupisteen mikrorakenne. β -Glukaani erottuu sinisenä, proteiini on värjätty punaiseksi.

Embryogeenisiä viljelmiä lisättiin ja n. 3 viikon ikäinen kallus analysoitiin sekä Calcofluor-värjäyksellä että HPLC-menetelmällä. Vanhempien kallusosojen seinät värjäytyivät β -glukaanivärjäyksellä, sen sijaan nuorten vielä jakautuvien solujen seinät eivät (Kuva 4). Veli-lajikkeen kallus näytti sisältävän hieman vähemmän β -glukaania kuin Aslak- ja Kolbu-lajikkeiden kallus. HPLC-menetelmällä määritettiin kalluslinjojen β -glukaaniin määrä ja molekyylipainojakauma (Kuva 5). Kallusten β -glukaani oli molekyylipainoltaan noin 200 000 eli selvästi vähemmän polymeroitunutta kuin jyvien β -glukaani. Eniten β -glukaania oli lajikkeiden Aslak ja Kolbu kalluksissa (3 g/kg) ja hieman vähemmän Veli-lajikkeen kalluksessa (2 g/kg).



Kuva 4. Kaurakallusten mikrorakenne, soluseinien β -glukaani erottuu sinisenä.

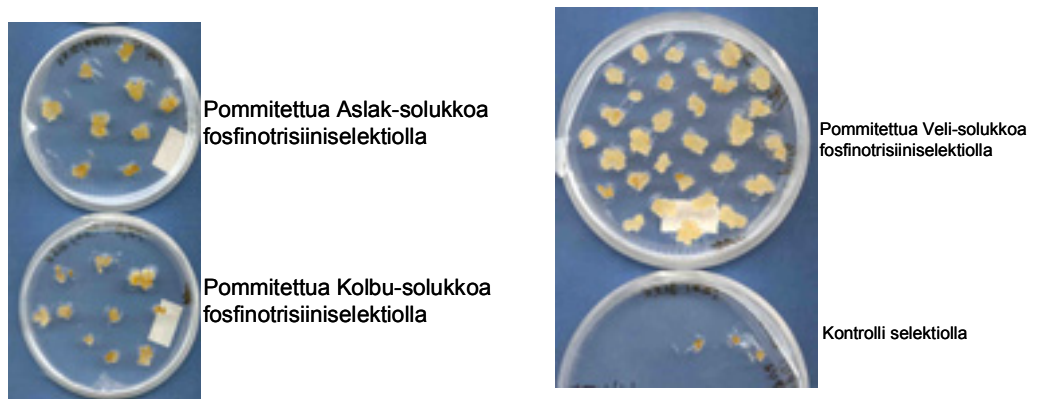


Kuva 5. Kauramateriaalien (jyvät, kasvupisteet ja n. 3 viikon ikäiset kallussolut) β -glukaanimääritykset HPLC-menetelmällä (Lajikkeet A) Aslak, B) Kolbu ja C) Veli).

Mikrobiaalinen β -glukaanisyntaasi ja siirtogeenisten solukkojen tuottaminen partikkelipommituksella

Professori Watanaben ryhmältä saatiin tutkimuskäyttöön hiivasta eristetty (1,3)- β -D-glukaanisyntaasin katalyyttistä yksikköä koodaavaa geeni (*GSCI*, Inoue ym. 1995). Tarkoituksena oli tutkia hiivaperäisen geenin vaikutusta kauran β -glukaanisynteesiin käyttäen kohdemateriaalina kauran solukkoviljelmiä.

Kauran eri lajikkeiden (Aslak, Kolbu, Veli) solukkoviljelmiä pommitettiin geeninsiirtovektorilla, jossa *GSCI*-geeni oli maissin ubikitiini promoottorin ja ensimmäisen intronin säätelyssä. Geeninsiirrossa käytettiin apuvektoria, joka sisälsi selektoitavan merkkigeenin (*bar*) myös ubikitiini promoottorin ja ensimmäisen intronin säätelyssä. Pommitettuja viljelmiä kasvatettiin fosfotriisiiniselektiolla (3 mg/l) ja vähitellen aikaansaatii siirtogeenisiä linjoja (Taulukko 2, Kuva 6). Viljelmät kasvoivat hitaasti ja niitä siirrostettiin n. neljän viikon välein uusille selektiomaljoille. Tuotettujen linjojen siirtogeenisyys varmistettiin PCR-analyysillä sekä sovellusgeenin (*GSCI*) että merkkigeenin (*bar*) suhteen (Kuva 7). Kaikkiaan siirtogeenisiä linjoja tuotettiin 14 kappaletta. Niistä kahdeksan on alkuperältään Veli-lajiketta, viisi Aslak-lajiketta ja yksi Kolbu-lajiketta. Keskimääräinen *GSCI*-transformaatiofrekvenssi eli siirtogeenisiksi PCR:llä todettujen osuus selektiolla kasvavien linjojen määrästä oli kauralla 23 %. Solukkoviljelmien transformatiofrekvenssin alhaisuus selittyy sillä, että selektiona käytetty *bar*-merkkigeenisysteemi toimii erityisesti siirtogeenisten kasvien tuottamisessa. Tällöin ei-siirtogeeninen materiaali karsiutuu tehokkaimmin regeneraation ja juurrutuksen yhteydessä ja ns. karkurien määrä vähenee. Koska siirtogeeniset kauran solukkolinjat kasvoivat hitaasti, tuotettiin kontrollimateriaaliksi siirtogeenisiä ohran solukkolinjoja Pokko-lajikkeesta. Siirtogeenisen materiaalin tuottaminen ohran Golden Promise-lajikkeesta ei onnistunut (Taulukko 2).



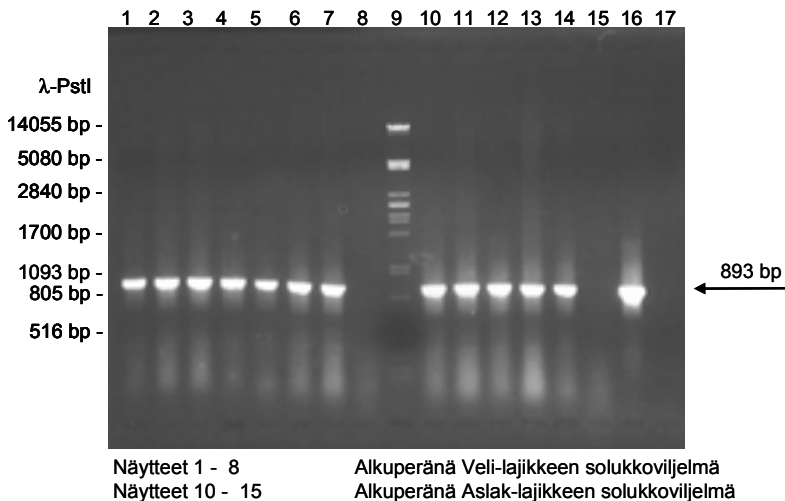
Kuva 6. Pommitettuja kauran solukkoviljelmiä fosfotriisiiniselektiolla.

Taulukko 2. Kooste siirtogeenisistä kauran solukkoviljelmälinjoista sekä kontrollimateriaaliksi tuotetuista ohran solukkoviljelmälinjoista. Solukkoihin on siirretty *GSC1*-geeni ubikitiini promoottorin ja ensimmäisen intronin säätelyssä (pAMR01) yhdessä vektorin kanssa, joka sisältää *bar*-merkkigeenin ubikitiini promoottorin ja ensimmäisen intronin säätelyssä.

Lähtömateriaali (Solukko)	Tuotettujen linjojen lukumäärä	<i>GSC1</i> -PCR	<i>bar</i> -PCR	<i>GSC1</i> -transformaatiofrekvenssi ^{**)}
Veli (kaura)	27	8 + 17 – 2 kuollut	8 + 17 – 2 kuollut	30 %
Aslak (kaura)	13	5 + 6 – 2 kuollut	5 + 6 – 2 kuollut	38 %
Kolbu (kaura)	22	1 + 15 – 6 kuollut	3 + 13 – 6 kuollut	5 %
Yhteensä (kaura)	62	14 + 38 – 10 kuollut	16 + 36 – 10 kuollut	23 %
Pokko (ohra)	12	5 + 7 -	*)	42 %
Golden Promise (ohra)	3	3 -	3 +	0 %
Yhteensä (ohra)	15	5 + 10 –	3 +	33 %

*) Ohran Pokko-lajikkeen siirtogeenisiä linjoja tuottaessa käytettiin *npt2*-merkkigeeniä

***) PCR:llä siirtogeenisiksi todettujen osuus selektiolla kasvavien linjojen määrästä

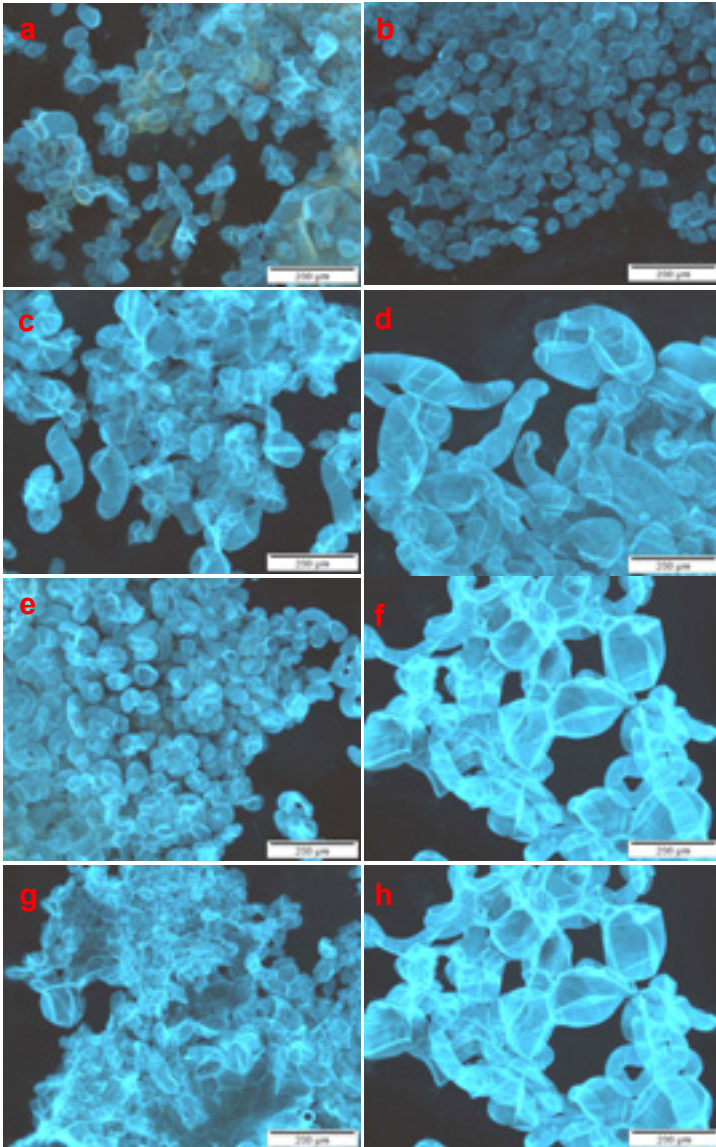


Kuva 7. Siirtogeenisten kauran solukkonäytteiden PCR-analyysi. PCR monistaa *GSC1*-geenistä 893 bp:n fragmentin (osoitettu kuvassa nuolella). Näytenumerot 1-7 ja 10-14 ovat *GSC1*-geenillä pommitettuja solukkonäytteitä ja numerot 8 ja 15 ovat ei-siirtogeenisiä kontrollinäytteitä. Näyte 9 on molekyylipainomarkkeri λ-PstI, näyte 16 on positiivinen plasmidikontrolli ja näyte 17 vesikontrolli.

Siirtogeenisten solukkojen mikroskooppinen tarkastelu ja β -glukaanin määrittäminen HPLC-tekniikalla

Mikroskooppista tarkastelua varten kauran solukkoviljelmiä levitettiin ohueksi kerrokseksi objektilasille ja värjättiin Calcofluor White:lla. Fluoresoivassa valossa β -glukaania sisältävät soluseinät näkyvät vaalean sinisinä: heikko fluoresenssi indikoi matalaa β -glukaanin pitoisuutta, voimakas fluoresenssi indikoi suurempaa β -glukaanin pitoisuutta. Kaikissa kaurasolukoissa näkyi β -glukaanin fluoresenssia (Kuva 8). Kauran Aslak-lajikkeen ei-siirtogeenisessä kontrollinäytteessä (Kuva 8a) soluseinien fluoresenssi oli voimakkaampaa kuin Veli-lajikkeen ei-siirtogeenisessä kontrollinäytteessä (Kuva 8b). Kaikissa siirtogeenisissä kauralinjoissa soluseinien fluoresenssi oli voimakkaampaa kuin ei-siirtogeenisissä kontrollinäytteissä (Kuva 8). Kaikissa näytteissä nuorten jakautuvien solujen fluoresenssi oli heikkoa, mutta vanhat erilaistuneet solut fluoresoivat voimakkaammin. Siirtogeenisistä linjoista Aslak-lajikkeen linjan P4/8/1 solut fluoresoivat kaikkein voimakkaimmin ja Veli-lajikkeen linjoissa P1/4/3 ja P1/4/6 fluoresenssi oli siirtogeenisistä kauralinjoista heikointa, kuitenkin selvästi voimakkaampi kuin ei-siirtogeenisissä kontrollilinjoissa (Kuva 8a-h). Kvantitatiivisen HPLC-menetelmän perusteella kuitenkin kävi ilmi, ettei siirtogeenisissä kauralinjoissa ollut enempää tai molekyylipainoltaan suurempaa β -glukaania kuin ei-siirtogeenisissä solukoissa (Taulukko 3). Sen sijaan siirtogeenisissä ohralinjoissa oli eroa verrattaessa samanikäiseen ei-siirtogeeniseen kontrollisolukoon (Kuva 9). Siirtogeenisten ohrasolukoiden β -glukaanimäärä sekä suurten polymeerien ($> 1\,000\,000$) määrä poikkesivat tilastollisesti merkittävästi ($P < 0,01$) ei-siirtogeenisten näytteiden arvoista.

Solukkoviljelmistä saatujen tulosten perusteella näytti siltä, ettei mikrobiaalinen 1,3- β -glukaanisyntaasi nosta kauran solukkoviljelmien β -glukaani-pitoisuutta, eikä vaikuta itse syntetisoituvan β -glukaanin molekyylijakaumaan. On kuitenkin mahdollista, ettei erilaistumaton solukkoviljelelmä välttämättä sovellu β -glukaanisyntaasin vaikutusten arvioimiseen. Lopullinen arvio mikrobiaalisen 1,3- β -glukaanisyntaasi vaikutuksista on tehtävä analysoimalla siirtogeenisten kasvien β -glukaanipitoisuutta ja molekyylipainojakaamaa.

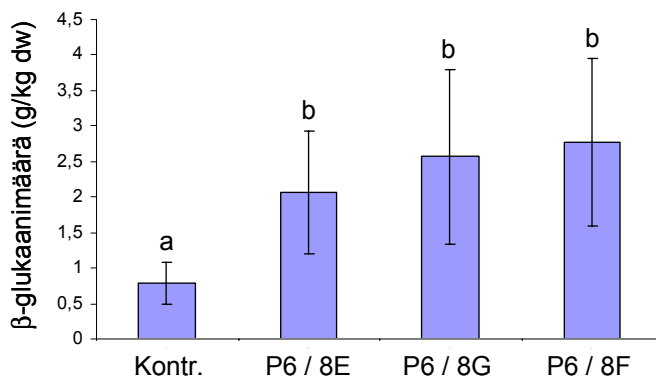


Kuva 8. Mikroskooppilasille sivellyiden kauran solukkonäytteiden Calcofluor-värjäys. Kaikki solukot olivat neljän viikon ikäisiä. Näytteet a ja b ovat ei-siirtogeenisiä kontrollinäytteitä (a) lajike Aslak ja b) Veli). Näytteet c, d ja e ovat siirtogeenisiä GSC1-Veli-kallusnäytteitä ja näytteet f, g ja h siirtogeenisiä GSC1-Aslak-kallusnäytteitä.

Taulukko 3. HPLC-tulokset *GSC1*-geenin sisältävien siirtogeenisten ja ei-siirtogeenisten kauran ja ohran solukkoviljelmänäytteiden β -glukaanipitoisuuksista.

Solukkoviljelmä	Ikä vko	β -glukaanipitoisuus g / kg (dw)	Molekyylipaino (Daltons)
Siirtogeeninen <i>GSC1</i> -Velikallus	4	14 – 15	270 000 – 340 000
Ei-siirtogeeninen Velikallus	4	19	260 000
Siirtogeeninen <i>GSC1</i> -Aslakallus	4	9 - 13	210 000 – 390 000
Ei-siirtogeeninen Aslakallus	4	13	170 000 – 280 000
Siirtogeeninen <i>GSC1</i> -Kolbukallus	4	*)	390 000
Ei-siirtogeeninen Kolbukallus	4	*)	150 000
Siirtogeeninen <i>GSC1</i> -Pokkokallus	2	3 – 6	310 000 – 750 000
Ei-siirtogeeninen Pokkokallus	2	4 – 6,5	430 000
Siirtogeeninen <i>GSC1</i> -Pokkokallus	4	3 – 10	280 000 – 750 000
Ei-siirtogeeninen Pokkokallus	4	4	440 000

*) Pieniä määriä

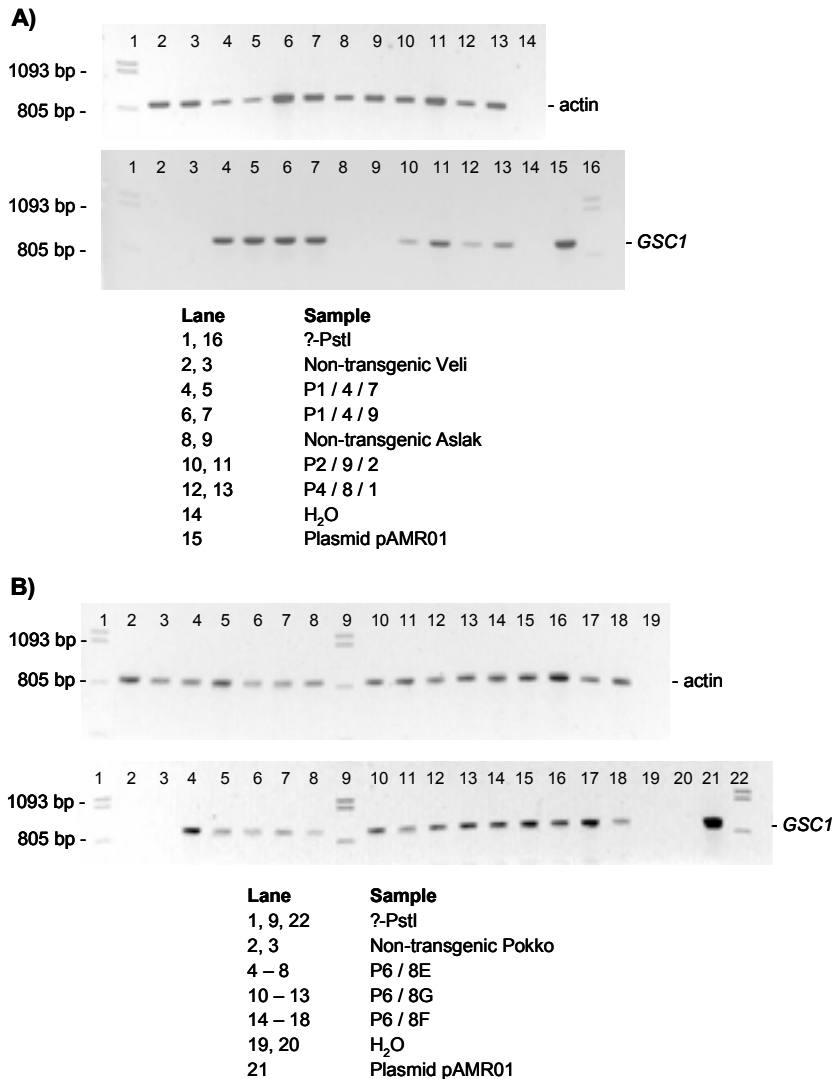


Kuva 9. Siirtogeenisten *GSC1*-geenin sisältävien ohran solukkolinjojen (P6 / 8E, 8G, 8F) ja ei-siirtogeenisen kontrollilinjän β -glukaanimäärät. Kirjaimilla a ja b merkittyjen näytteiden β -glukaanimäärät eroavat tilastollisesti merkittävästi toisistaan ($P < 0,01$, $n = 6$).

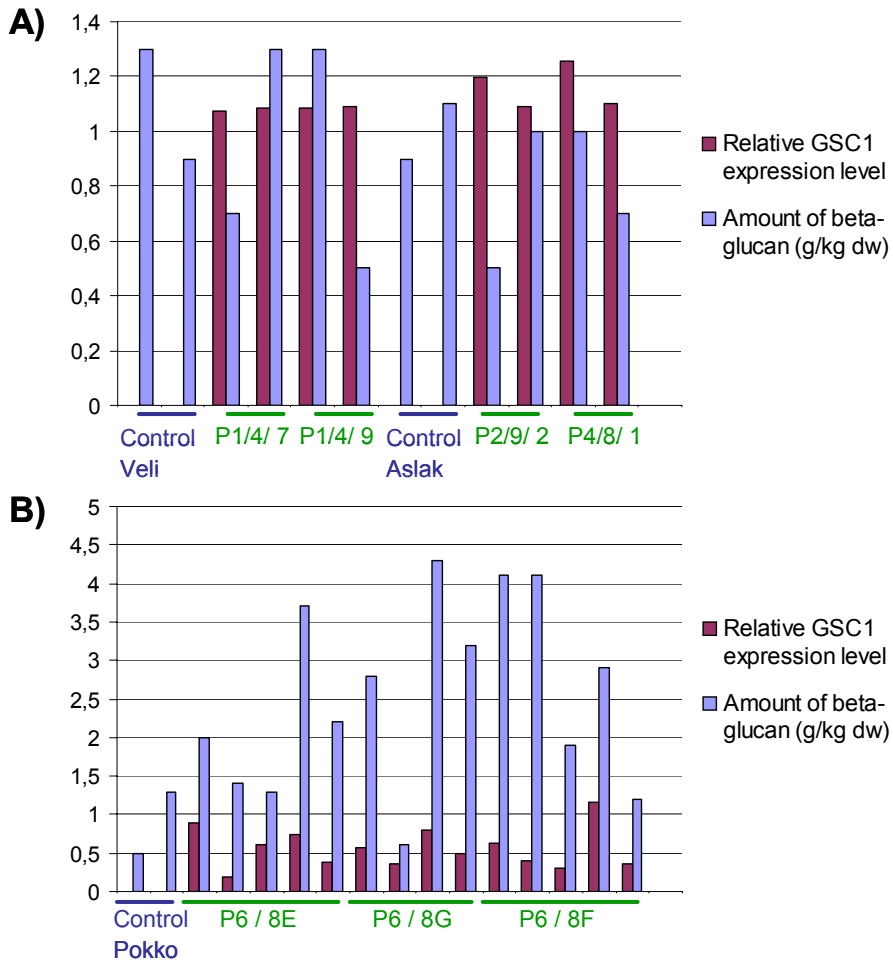
Mikrobiaalisen β -glukaanisyntaasin ilmeneminen siirtogeenisissä soluissa

Mikrobiaalisen 1,3- β -glukaanisyntaasin ilmeneminen todennettiin semi-kvantiitatiivisen RT-PCR:n avulla sekä siirtogeenisissä kaurasoluissa että ohrasoluissa (Kuva 10). Kontrollina käytettiin aktiini RT-PCR:ää ja eks-

pressiotasot normalisoitiin sen avulla. Ekspressiotasoissa ja β -glukaanimäärissä ei kuitenkaan näyttäisi olevan korrelaatiota ja voidaan ai-noastaan todeta että mikrobiaalinen 1,3- β -glukaanisyntaasi ilmenee siirtogeenisissä näytteissä (Kuva 11).



Kuva 10. *GSC1* mRNA:n ilmeneminen siirtogeenisissä kaurasolukoissa (A) ja ohrasolukoissa (B). Solukoista eristettiin kokonais-RNA (Qiagen Rneasy Plant Mini Kit 74904) ja käänneistranskriptoitettiin (RT) SuperScript III Rnase H transkriptaasilla (Invitrogen). RT-tuotetta käytettiin templaattina ja PCR:ssa käytettiin *Taq* DNA polymeraasia. Semi-kvatitatiivisessa RT-PCR:ssa käytettiin kontrollina aktiinia.



Kuva 11. Suhteellinen *GSC1* ekpressiotaso (normalisoitu aktiinin avulla) siirtogeenisissä A) kaurasolukoissa ja B) ohrasolukoissa. Solukoista, joista *GSC1*-ekpressio määritettiin myös β -glukaanipitoisuudet

Mikrobiaalisen β -glukaanisyntaasin sisältävät siirtogeeniset T_0 - ja T_1 -polven kasvit

Mikrobiaalinen 1,3- β -glukaanisyntaasi ei nostanut kauran solukkoiljelmien β -glukaanipitoisuutta. On kuitenkin mahdollista, ettei solukkoiljelmä soveltunut mikrobiaalisen β -glukaanisyntaasin vaikutusten arvioimiseen. Tämän vuoksi siirtogeenisiä linjoja regeneroitiin kasveiksi (Taulukko 4) ja istutettiin multaan kasvihuoneelle. Kasvien siirtogeenisyys analysoitiin PCR-tekniikalla. Lisäksi muutamien kallusten ja kasvien siirtogeenisyydet varmennettiin Southern blot – menetelmällä (Kuva 12). Siirtogeenisistä Veli *GSC1*-linjoista regenerantteja saatiin kuudesta (6/8) ja siirtogeenisistä Aslak *GSC1*-linjoista regeneroitiin kaksi (2/5). Ainoa siirtogeeninen Kolbu *GSC1*-

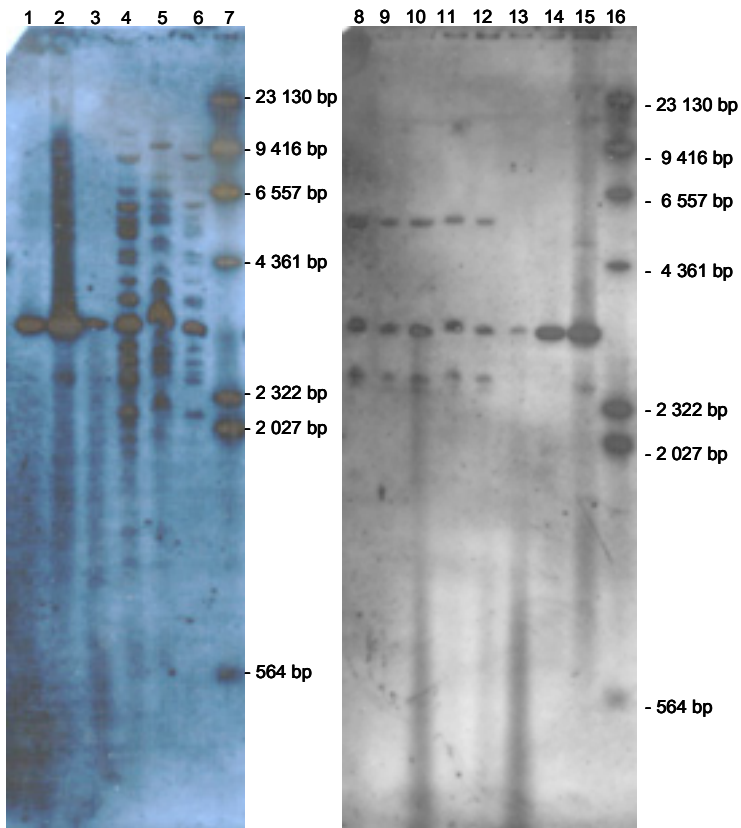
linja ei regeneroitunut. Kolbu-lajikkeesta siirtogeenisiä kasveja saatiin regeneroitua vain linjasta P2/11/1, johon oli integroitunut ainoastaan *bar*-merkkigeeni. Joka tapauksessa tämä oli ensimmäinen kerta, kun siirtogeenisiä kasveja pystyttiin tuottamaan Aslak-lajikkeesta. Selektion voitiin todeta olevan tehokas, koska yhtä poikkeusta lukuun ottamatta kaikki kasvit olivat siirtogeenisiä selektiomarkkerin (*bar*) suhteen ($63/64 = 98\%$). Lisäksi myös kotransformaatio toimi hyvin, koska kaikissa regeneranteissa oli varsinainen mikrobialista β -glukaanisyntaasia koodava sovellusgeeni (*GSC1*). T_0 -kasvit tuleantuivat normaalisti kasvihuoneella, mutta sekä siirtogeenisten että ei-siirtogeenisten jyvätuotto oli huonoa. Siirtogeenisten kasvien ensimmäisen sukupolven (T_0) kasveista 58 % (37/64) tuotti jyviä. Huono fertiiliteetti voi siirtogeenisten kasvien kohdalla johtua tietysti itse siirtogeenistä tai siirtogeenin integraatiopaikasta. Jyväsaato oli kuitenkin huono myös ei-siirtogeenisissä kasveissa, joten syynä voitiin hyvin todennäköisesti pitää pitkää solukkoiljelyvaihetta.

Taulukko 4. Kooste regeneroiduista siirtogeenisistä kaurakasveista, ei-siirtogeenisestä kontrollimateriaalista ja niiden jyvämääristä (T_0 -polvi).

Lajike	Alkuperä	T_0 -kasvit (lkm)	PCR + (<i>GSC1</i>)	PCR + (<i>bar</i>)	Fertiilit kasvit (lkm)	Jyvätkm (min-max)
Veli	P1 / 4 / 10	9	9	9	8	2 - 44
	P1 / 4 / 9	6	6	6	5	2 - 12
	P1 / 4 / 8	8	8	8	5	1 - 38
	P1 / 4 / 7	9	9	9	2	3 ja 14
	P1 / 4 / 6	11	11	11	10	4 - 106
	P1 / 4 / 2	5	5	5	4	3 - 32
Yhteensä Veli	Siirtogeeniset	48	48	48	34	1 - 106
Kontrolli Veli		5	-	-	3	2 - 3
Aslak	P2 / 9 / 1	3	3	2	1	5
	P2 / 9 / 2	9	9	9	- ^a	- ^a
Yhteensä Aslak	Siirtogeeniset	12	12	11	1	5
Kontrolli Aslak		5	-	-	5	14 - 66
Kolbu	P2 / 11 / 1	4	0	4	2 ^b	1 ja 6
	P2 / 12 / 1	0	0	0	-	-
Yhteensä Kolbu	Siirtogeeniset	4	0	4	2	1 ja 6
Kontrolli Kolbu		5	-	-	3	22 - 66

^a Kaikki kasvit olivat steriilejä ja kuusi kasvia yhdeksästä oli myös fenotyypiltään pieniä

^b Näissä kasveissa oli vain *bar*-merkkigeeni



Lane	Näyte
1.	1 kopio
2.	10 kopiota
3.	Aslak, kontrolli ($T_1=2584$)
4.	Aslak kallus, P2/9/1
5.	Aslak $T_0=1870$
6.	Aslak $T_1=2580$
7.	MW
8.	Veli Kallus, P1/4/9
9.	Veli $T_0=2008$
10.	Veli $T_1=2604$
11.	Veli $T_0=2009$
12.	Veli $T_1=2606$
13.	Veli $T_1=2610$
14.	1 kopio
15.	10 kopiota
16.	MW

Kuva 12. Siirtogeenisten kallusten, T_0 -regeneranttien ja T_1 -polven jälkeläisten Southern blot -analyysi.

T₀-polven kasvien jyivistä idätettiin seuraavan polven (T₁) kasveja (Taulukko 5) ja niiden jyivistä tehtiin β-glukaanimääritykset (Kuvat 13 ja 14). T₁-polven jyväsato oli hieman parempi kuin T₀-polven, eivätkä siirtogeeniset ja ei-siirtogeeniset huomattavasti eronneet toisistaan sadon suhteen. Fertiliiteetti oli hieman noussut verrattaessa T₀-polven siirtogeenisiin kasveihin; 68 % (26/38) siirtogeenisistä T₁-polven kasveista tuotti jyviä. Siirtogeenisten ja ei-siirtogeenisten jyvien β-glukaanin määrissä ei näyttäisi olevan merkittävää eroa. β-Glukaanin määrän erilaisuus kasvihuoneolosuhteissa tuli kuitenkin selvästi ilmi verrattaessa kontrollimateriaaliin, joka oli kasvatettu pellolla (Kuva 13). Myöskään molekyylipainojakaumissa ei näyttäisi useimpien linjojen kohdalla olevan eroa siirtogeenisten ja ei-siirtogeenisten ryhmien välillä. Siirtogeenisen Veli linjan T₁-kasvien 2602 ja 2603 näyttäisi poikkeavan yleisestä trendistä. Tämä vaatii kuitenkin lisäanalyysyä, että voitaisiin osoittaa eron johtuvan nimenomaan siirtogeenistä.

Taulukko 5. Siirtogeeniset ja ei-siirtogeeniset T1-polven kaurakasvit.

Lajike	Solukko-alkuperä	T ₀ -kasvi ^a (numero)	T ₁ -kasvi GSC1 ja bar +	Fertiilit T ₁ -kasvit	Jyvätkm (min-max)
Veli	P1 / 4 / 10	1868	2	2	37 ja 96
	P1 / 4 / 10	1869	3	3	14 - 26
	P1 / 4 / 9	2008	3	3	11 - 55
	P1 / 4 / 9	2009	1	1	75
	P1 / 4 / 8	1863	2	2	36 ja 114
	P1 / 4 / 8	1865	2	2	30 ja 74
	P1 / 4 / 7	2012	2	2	36 ja 55
	P1 / 4 / 7	2015	1	1	29
	P1 / 4 / 6	1894	3	3	5 – 30
	P1 / 4 / 6	1895	1	1	158
	P1 / 4 / 2	1876	2	2	49 ja 76
	P1 / 4 / 2	1877	0	0	-
Yhteensä Veli	Siirtogeeniset	12 kpl	22	22	5 - 158
Aslak	P2 / 9 / 1	1870 ^b	3 (4 ^c)	2 (2 ^c)	8 ja 12
	P2 / 9 / 2	-	-	-	-
Yhteensä Aslak	Siirtogeeniset	1 kpl	3 (4)	2 (2)	8 ja 12
Kolbu	P2 / 11 / 1 ^d	1902 ^e	(1 ^d)	(1 ^d)	2
	P2 / 11 / 1 ^d	1903 ^e	(4 ^d)	(2 ^d)	102 - 580
Yhteensä Kolbu	Siirtogeeniset	2 kpl	(4^d)	(3^d)	2 - 580
				taulukko 5 jatkuu...	

Lajike	Kontrollit	T ₀ -kasvi ^a (numero)	T ₁ -kasvi (ei-siirtog.)	Fertiilit T ₁ -kasvit (ei-siirtog.)	Jyvätkm (min-max)
Veli		2017	1	1	149
		2019	2	2	33 ja 71
Yhteensä Veli	Kontrollit	2 kpl	3	3	33 – 149
Aslak		2027	2	2	7 ja 31
		2030	2	2	32 ja 33
Yhteensä Aslak	Kontrollit	2 kpl	4	4	7 – 33
Kolbu		2023	2	2	31 ja 810
		2024	2	2	275 ja 610
Yhteensä Kolbu	Kontrollit	2 kpl	4	4	31 - 810

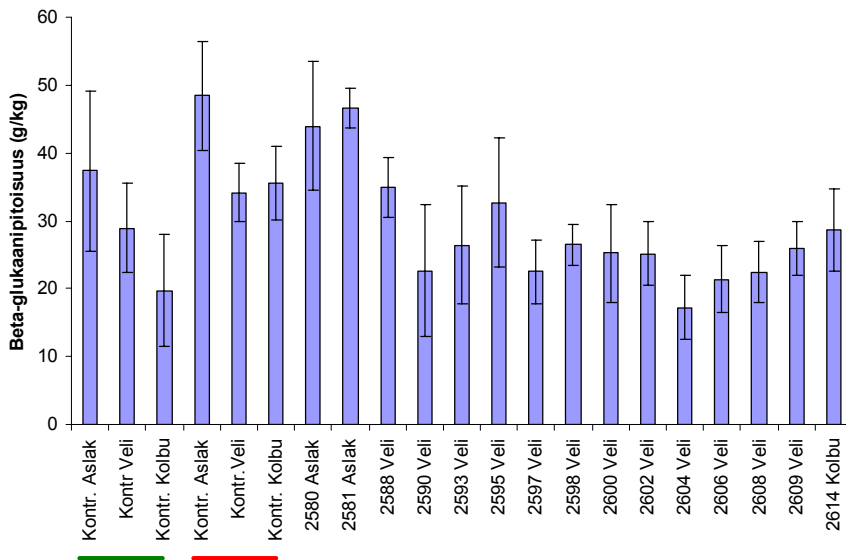
a Siirtogeenisten T₀-kasvin jyviä (=T₁-jyvät) idätettiin 3 kpl / kasvi. Ei-siirtogeenisestä kontrollimateriaalista idätettiin 2 jyvää / kasvi. Kaikki jyvät eivät kuitenkaan itäneet.

b T₀-kasvi tuotti vain viisi jyvää, jotka kaikki idätettiin. Yksi itäneistä kasveista kuoli.

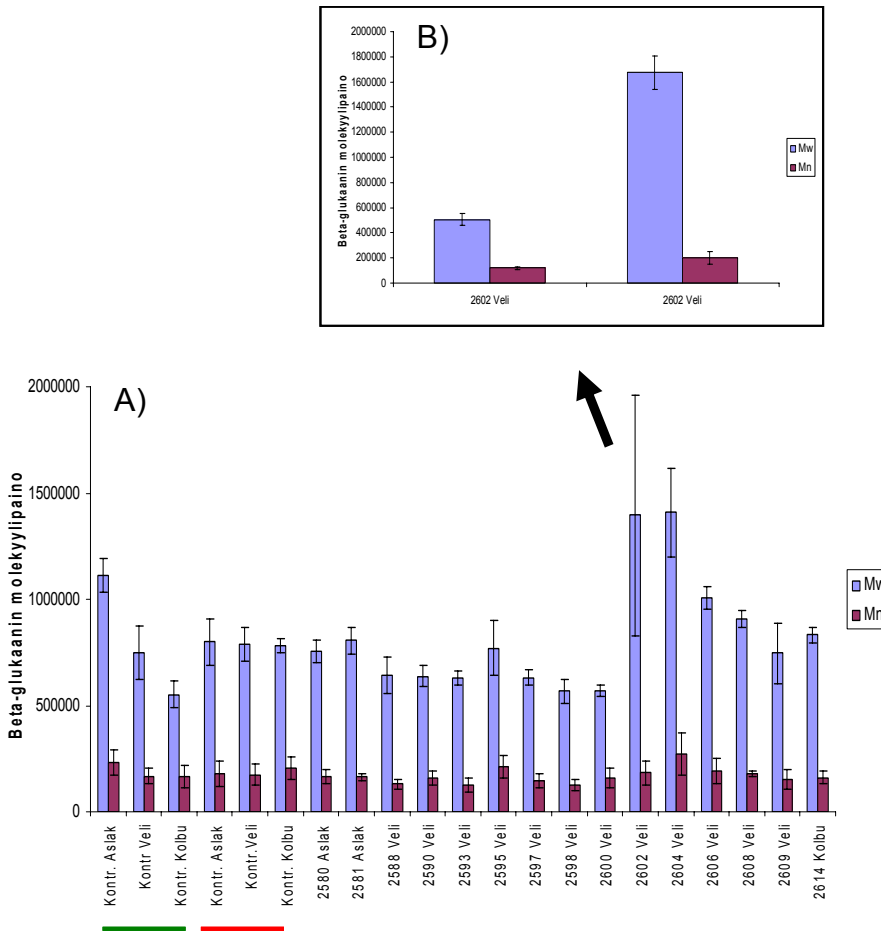
c Kolmessa kasvissa oli sekä *GSCI* että *bar*, ja yhdessä kasvista pelkästään *bar* (segregaatio), mutta se oli steriili eikä tuottanut jyviä.

d Solukkolinjaan oli integroitunut ainoastaan *bar*-merkkigeeni

e T₀-kasvi 1902 tuotti vain yhden jyvän, joka iti, T₀-kasvi 1903 tuotti kuusi jyvää, joista viisi iti



Kuva 13. Siirtogeenisten ja ei-siirtogeenisten T₁-kasvien jyvien β -glukaanipitoisuus (n=6). Kuvassa vihreällä alleviivattu kontrollimateriaali on pellolla lisättyä ja punaisella alleviivattu kasvihuoneolosuhteissa lisättyä.



Kuva 14 A) Siirtogeenisten ja ei-siirtogeenisten T1-kasvien jyvien β -glukaanin molekyylipainojakauma ($n=6$). Mw = molekyylien molekyylipainon suhteen painotettu keskiarvo; Mn = molekyylien lukumäärän suhteen painotettu keskiarvo. Mw kuvaa parhaiten vaikutusta viskositeettiin. Kuvassa vihreällä alleviivattu kontrollimateriaali on pellolla lisättyä ja punaisella alleviivattu kasvihuoneolosuhteissa lisättyä. B) Inserttiin on eroteltu suuren ja pienen molekyylipainon omaavat jyvät ($n=3$, molemmissa ryhmissä). Kyseisten jyvien molekyylipainohajonta oli hyvin suuri, indikoiden hyvin heterogeenistä jyväsatoa.

Kasvipiperäinen β -glukaanisyntaasi

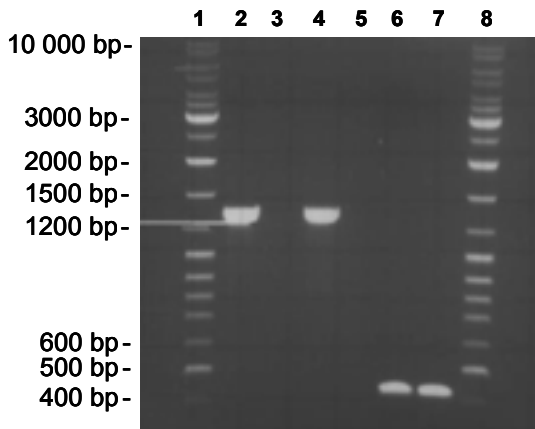
Projektin lopullisena tarkoituksena oli käyttää kasvipiperäistä β -glukaanisyntaasia kauran β -glukaanipitoisuuden nostamisessa. Ohran EST-kirjastosta sekä julkisista tietokannoista löydetyt potentiaaliset β -glukaanisyntaasit luokiteltiin neljääntoista ryhmään (Taulukko 6). Näistä suurin osa muistutti kalloosisyntaasia (eli 1,3- β -glukaanisyntaasia). Aluksi

lähdettiin kartoittamaan mahdollisuutta käyttää transkription jälkeistä geenien hiljentämistä eli ns. siRNA-tekniikkaa potentiaalisten kasvipäristen geenien seulonnassa. Tämän ei kuitenkaan todettu soveltuvan juuri β -glukaanisyntaasin seulontaan. Ohessa tarkempi selvitys tekniikasta ja syistä, miksi se hylättiin. siRNA-molekyylit (short interfering RNA) ovat 21 – 26 nukleotidia pitkiä RNA-elementtejä, jotka käynnistävät RNA:n hajottamisen muodostamalla RNA:n indusoivan hiljennyskompleksin (RISC). siRNA-elementit tunnistavat kohteen Watson-Crick emäspariutumisen periaatteella. RNA:n hajottaminen on endonukleolyttistä ja tapahtuu alueilla, jotka ovat homologisia siRNA-elementille. Lisäksi kasveissa on todettu siRNA-välitteisen geenihiljenemisen leviävän itse kohdesekvenssistä myös ympäröiviin sekvensseihin, jolloin lähes koko mRNA pilkkoutuu lyhyiksi pätkiksi. Klahren työryhmä (2002) osoitti siGFP-elementtien (green fluorescent protein) pommituksen hiljentävän GFP-ekspression siirtogeenisissä tupakkakasveissa. Heidän tutkimuksensa osoitti, että ainoastaan kaksijuosteiset siGFP-elementit saivat geenin hiljenemisen aikaan 38 % kasveista. Lisäksi he osoittivat, että jo kuuden emäksen epähomologia esti hiljenemisen eli hiljenemisen indusointi on todellakin sekvenssispesifiä. Samankaltaisia tuloksia on saanut Vanitharani työryhmä (2003) elektroporoimalla siGFP-elementtejä tupakan solukkoviljelmiin. Ohran EST-kirjastosta ja julkisista tietokannoista löydetyistä potentiaalisista kasvipärististä β -glukaanisyntaaseista pystyttäisiin olemassa olevan tiedon pohjalta suunnittelemaan sekvenssispesifit siRNA-elementit. Näiden elementtien vaikutusta β -glukaanisynteesiin voitaisiin sitten analysoida pommittamalla niitä kauran solukkoviljelmiin. Ongelmaksi kuitenkin muodostuu aikaansaadun vaikutuksen detektoiminen. Partikkelipommituksella siRNA-elementtien siirto onnistuu vain murto-osaan pommitetuista soluista. Mikäli näissä soluissa tapahtuu β -glukaanisyntaasin hiljeneminen, solut eivät pysty jakautumaan ja muodostamaan kunnollista soluseinää, jonka keskeinen komponentti β -glukaani viljoilla on. Ympäröivät solut kuitenkin kasvavat ja peittävät hiljentyneet solut alleen ja näin eroa ei saada näkyviin Calcofluor-värjäyksellä. Lisäksi alkuperäiset kohdesolut sisältävät jo β -glukaania ja värjäytyisivät joka tapauksessa. Myöskään protoplasteja ei voida käyttää kohdemateriaalina, koska protoplastien regeneroituminen on viljoilla hyvin hankalaa, ja näin ei saada selkeää syytä soluseinän muodostumisen estymiseen (β -glukaanisyntaasin hiljeneminen \gg huono protoplastin regeneraatio). Tämän kirjallisuusselvityksen ja mahdollisuuksien kartoituksen jälkeen päädyttiin siihen, ettei siRNA-tekniikkaa voida hyödyntää potentiaalisten kasvipäristen β -glukaanisyntaasin valinnassa.

Taulukko 6. Yhteenveto ohran EST-kirjastosta ja julkisista tietokannoista löydetystä potentiaalisista kasvipärisistä β -glukaanisyntaaseista.

Ryhmä	Konsensus	Sekvensien lkm	HY/BI kloonit	Isäntä	Oletusfunktio
BGS.0.41	1847	14	3	Hordeum vulgare	Potentiaalinen kalloosisyntaasi
BGS.0.3	2069	29	1	Oryza sativa	Kalloosisyntaasin kaltainen proteiinifragmentti
BGS.0.26	666	1	0	Oryza sativa	Potentiaalinen 1,3- β -glukaanisyntaasi
BGS.0.28	672	1	0	Hordeum vulgare	Potentiaalinen kalloosisyntaasi
BGS.0.34	597	1	0	Oryza Sativa	OJ1029_F04.4 proteiini
BGS.0.43	532	2	0	Oryza Sativa	Potentiaalinen glukaanisyntaasi
BGS.0.45	791	6	1	Arabidopsis thaliana	Kalloosisyntaasin katalyyttisen alayksikön kaltainen proteiini
BGS.0.42	380	1	0	Oryza sativa	Potentiaalinen glukaanisyntaasi
BGS.0.44	300	1	0	Oryza sativa	Potentiaalinen glukaanisyntaasi
BGS.0.68	1421	9	2	Oryza sativa	ESTs AU033035S1515
BGS.0.47	654	1	0	Oryza Sativa	Kalloosisyntaasin kaltainen proteiinifragmentti
BGS.0.66	671	2	1	Oryza sativa	ESTs AU033035S1515
BGS.0.70	945	2	1	Oryza sativa	ESTs AU033035S1515
BGS.0.21	645	1	0	Hordeum vulgare	Potentiaalinen kalloosisyntaasi
Σ 14	300 - 2069	71	9		

Projektin kapasiteetti ei riittänyt kaikkien neljäntoista ryhmän potentiaalisten geenien kloonamiseen, ja niinpä pyrittiin ensivaiheessa samaan lisätietoa β -glukaanisyntaasien sekvenssistä käyttämällä ns. RT-PCR (reverse transcriptase) tekniikkaa. β -glukaanipitoisuusanalyyseissä todettiin ohran Pokkosuspensiolinjan sisältävän paljon β -glukaania (6,5 g/kg dw). Tästä suspensiolinjasta eristettiin RNAta ja sitä käytettiin templaattina RT-PCR:ssä pidempien β -glukaanisyntaasisekvenssien selvittämiseksi. PCR-alukkeet suunniteltiin kahdelle pisimmälle ja mielenkiintoisimmalle cDNA:lle. RT-PCRien bändit ovat nähtävänä kuvassa 15. Näistä kloonista pitkä-VTT/9 ja lyhyt-VTT/13 sekvensoitiin molemmista päistä. Kloonin VTT/9 saadut sekvenssit



1. Molekyylipainomarkkeri
2. VTT/ 9, alukkeet F36 and R36, 55°C
3. Vesi, alukkeet F36 and R36, 55°C
4. VTT/ 10, alukkeet F36 and R36, 55°C
5. Vesi, alukkeet F47 and R48, 63°C
6. VTT/ 13, alukkeet F47 and R48, 63°C
7. VTT/ 14, alukkeet F47 ja R48, 63°C
8. Molekyylipainomarkkeri

Kuva 15. Ohran Pokko lajikkeesta eritetyn RNA:n RT-PCR potentiaalisille kasviperäisille β -glukaanisyntaaseille suunnitelluilla alukkeilla.

eivät menneet päällekkäin ja puuttumaan jäi n. 150 emäsparia. Kloonin VTT/13 saatiin kokonaan sekvensoitua ja sen yhteenlaskettu kokonaispituus oli 1087 bp.

Saatuja sekvenssejä verrattiin nukleotidi- ja proteiinitietokantoihin käyttäen BLASTn ja BLASTx – hakuja. BLASTn:ssä käytettiin hakukriteerinä nukleotidisekvenssiä ja BLASTx:ssä hakukriteerinä oli sekvenssin perusteella transloitu proteiini. Molemmilla sekvensseillä ehdottomasti parhaat vastaavuudet olivat 1,3- β -glukaanisyntaaseja ja kaikkein parhaat löydettiin riisin tietokannoista.

Kloonille VTT/9 paras vastaavuus oli riisin mRNA sekvenssillä (AK071856, yli nukleotidien 514-1174, ollen 83 %:sti samanlainen). Proteiinihaun vastaavuudet kloonille VTT/9 eivät olleet erityisen hyviä. Vastaavuuksista paras oli puuvillan potentiaali kalloosisyntaasin alayksikkö (AAD25952, 1899 aminohappoa pitkä) ja toiseksi paras löytyi Arapidopsiksen glykosyylitransferaasi-perheestä (NP_ 850271, proteiini 48). Näiden vastaavuuksien perusteella arvioitiin, että olimme n. 500 aminohapon ja n. 1500 nukleotidin päässä VTT/ 9-geenin 5`päästä.

Kloonin VTT/13 paras nukleotidivastaavuus oli riisin potentiaalia 1,3- β -glukaanisyntaasin mRNA:lla. (XM_550490, *Oryza sativa*, lajike Nipponbare, vastaavuus alkaa nukleotidista 4154, 86 %:sti samanlainen). Proteiinitasolla paras vastaavuus oli myös potentiaali 1,3- β -glukaanisyntaasi (BAD67750, vastaavuusalue oli aminohaposta 1484 aminohappoon 1734, kun koko proteiinissa oli 1771 aminohappoa). Näin ollen näytti siltä, että olimme VTT/13-geenin osalta jopa n. 4200 nukleotidin päässä 5`päästä.

Pisin ja täydellisin kloonit valittiin jatkotutkimuksiin (kloonit VTT/9). Kloonin keskeltä jäi puuttumaan n. 150 emäsparin mittainen alue, joka kloonattiin ja sekvensoitiin. Seuraavaksi ryhdyttiin hakemaan geenin (koodaavan alueen) 5`päästä. Yleensä mRNA:sta tehty cDNA-kloonit ovat useimmiten vajavaisia juuri geenin 5`päästä, johtuen siitä, että käänteistranskriptaasi irtoaa mRNA:sta reaktion aikana tai siitä, että RNA hajoaa osittain. Geenin 5`pään kloonaukseksi käytimme RLM-RACE – tekniikkaa, joka erityisesti valitsee ne mRNA:t, joiden 5`pää on täydellinen. Tällöin tuotteen pitäisi olla kokonainen. Aikaansaimme RLM-RACE-tuotteita, jotka kloonattiin ja sekvensoitiin. BLAST-vertailuissa kuitenkin kävi ilmi, etteivät kyseiset tuotteet todennäköisesti olleet β -glukaanisyntaaseja.

Professori Fincherin tutkimusryhmä (Adelaiden yliopisto) teki samaan aikaan läpimurron kasvipäristen β -glukaanisyntaasien kloonauksessa (Burton ym. 2006). Jatkokloonauksissa käytimme Burton ym. (2006) julkaisun riisisekvenssejä (6 kpl) ja löysimme kuusi hyvää osunaa Schulmannin laboratorion EST-kirjastosta. Tämän perusteella voitiin olettaa, että ohrasta löytyy ainakin kuusi vastaavaa geeniä. Olimme kuitenkin auttamattomasti jääneet kilpajuoksussa toiselle sijalle, koska kansainvälisessä kasvimolekyylibiologia kokouksessa (Adelaide, Australia 20-25.8.2006) Fincherin ryhmällä oli kaksi esitystä, joista kävi ilmi, että he olivat jo kloonanneet vastaavat geenit ohrasta.

Fincherin tutkimusryhmän läpimurto kasvipäristen β -glukaanisyntaasien kloonauksessa ja erityisesti se, että he olivat jo kloonanneet vastaavat geenit ohrasta syksyllä 2006, aiheutti sen, ettei tutkimusta kannattanut jatkaa alkuperäisen suunnitelman mukaisesti. Ei ollut järkevää lähteä toistamaan jo tehtyä tutkimusta. Eräs vaihtoehto olisi tiedustella yhteistyömahdollisuutta ko. ryhmän kanssa. Voisimme pyytää heiltä tutkimuskäyttöön ja kauraan siirrettäväksi ohrasta eristetyt geenit. Projektia oli kuitenkin siinä vaiheessa jäljellä vain muutama kuukausi, mikä ei missään tapauksessa olisi riittänyt yhteistyökuvion rakentamiseen. Näin ollen keskittimme projektin lopun resurssit jo tuotettujen siirtogeenisten kasvien karakterisointiin.

Biotekniiikan mahdollisuudet kauranjalostuksessa

Elina Kiviharju¹⁾, Anneli Ritala²⁾, Pirjo Tanhuanpää¹⁾, Outi Manninen¹⁾, Alan Schulman^{1,3)}, Leena Pietilä⁴⁾

¹⁾ MTT, Biotekniiikka- ja elintarviketutkimus, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

²⁾ VTT, PL 1000, 02044 VTT, etunimi.sukunimi@vtt.fi

³⁾ MTT / BI Kasvigenomiikan laboratorio, Biotekniiikan instituutti, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

⁴⁾ Boreal Kasvinjalostus Oy, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@boreal.fi

Johdanto

Kauralajikkeeseen jalostus perinteisen osapopulaatiovalintamallin mukaisesti vie toistakymmentä vuotta (Kuva 10.). Bioteknisillä menetelmillä tähdätään lajikejalostusohjelmien tehostamiseen ja lyhentämiseen, jotta viljelijöiden, kuluttajien ja teollisuuden toiveisiin voitaisiin vastata mahdollisimman nopeasti. Tärkeimpinä lajikejalostuksessa käytettävänä bioteknisinä menetelminä voidaan pitää ns. DH-tekniikoita (doubled haploid eli kaksoishaploidi) ja toivottujen ominaisuuksien geenimerkkiavusteista valintaa risteytysohjelmisssa. Geeninsiirtojen avulla jalostusohjelmissa hyödynnettävää geneettistä materiaalia on mahdollista laajentaa tuomalla ominaisuuksia yli lajirajojen. Koko genomien tutkimisen (genomiikan) menetelmät tuovat kehittyessään mahdollisuuksia tutkia tarkemmin kaurankin ominaisuuksien geneettistä säätelyä ja löytää niihin vaikuttavia geenejä.

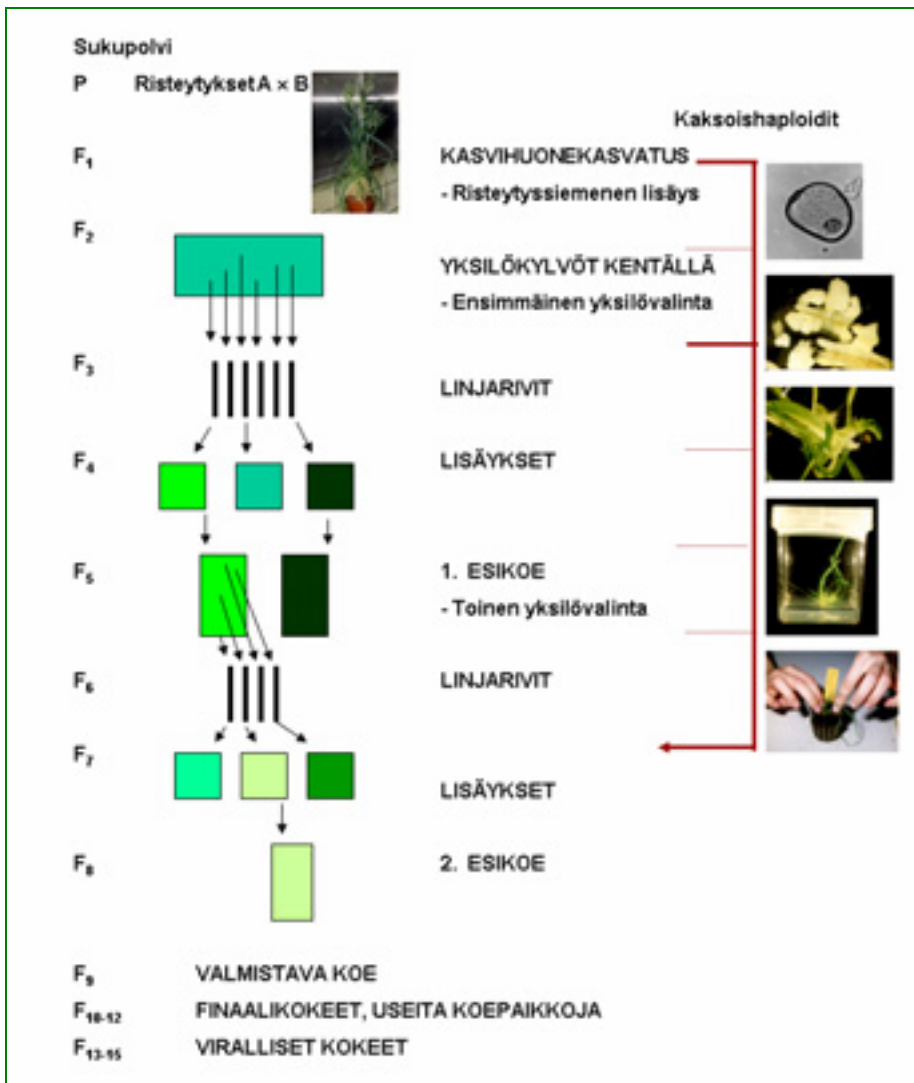
DH-tekniikat

Jalostaja luo vaihtelua jalostusaineistoonsa risteytysten avulla ja risteytysjälkeläistön yksilöt ilmentävät ilmiasuisiaan vanhempiensa geenien eri yhdistelmiä. Toivotut ominaisuudet sisältävä geeniyhdistelmä täytyy saattaa vaihtelemattomaksi puhtaaksi linjaksi, jotta saavutettu ominaisuuskokonaisuus pysyy ja lajike voidaan laskea kauppaan. Perinteisessä osapopulaatiovalintamallissa riittävä yhtenäisyys saavutetaan itsepölytteisellä kauralla useiden vuosien (4-6) sukupolvikasvatuksilla (Kuva 1.). Tekemällä jalostuslinjasta DH-linja, täydellinen geneettinen yhtenäisyys (homotsygotia) saavutetaan jo yhdessä sukupolvessa. Lopullinen ajansäästö riippuu siitä jalostusohjelman vaiheesta, jossa DH-linjat tehdään, useista vuosista on kuitenkin kysymys. Ajansäästön lisäksi valintatehokkuus DH-aineistoa käytettäessä kasvaa, koska väistyvät geenimuodot eivät jää vallitsevien muotojen alle piiloon, ja toisaalta ympäristöolosuhteet eivät pääse ”valikoimaan” aineistoa lisäyksissä, kuten pellolla tapahtuu. Suoran jalostuskäytön lisäksi DH-linjat

ovat hyödyllistä materiaalia erilaisissa geneettisissä tutkimuksissa, joissa täydellinen homotsygotia yksinkertaistaa geneettisiä analyysejä, kuten tämän hankkeen geenikartoituksessa.

Kauralla DH-linjoja kyetään tuottamaan etäisristeytysten kautta (Rines ym. 1997), jolloin vieraslajin (yleensä maissi) siitepölyn kromosomit eliminoituvat, mutta ehtivät indusoida munasolun kasvuun. Kehittyvä alkio eristetään elatusainealustalle, koska siemenvalkuainen ei kehity. Tällä menetelmällä DH-linjojen tuottotehokkuudet ovat jääneet ainakin toistaiseksi liian alhaisiksi ajatellen käyttöä lajikejalostuksessa. Ponsiviljely on toinen tekniikka, joka kauralla onnistuu. Kauran DH-linjojen tuotto ponsiviljelyssä on kehitetty MTT:ssä käyttökelpoiselle tasolle. Parhaimmillaan 30 kasvia (Aslak × Lisbeth) on saatu erilaistumaan sataa eristettyä heteen pontta kohden. Tavanomaisempia ovat olleet kertaluokkaa pienemmät luvut, 1-2 kasvia sataa pontta kohden. Viimeisimmällä menetelmällämme noin 60 % testatuista kauralajikkeista tuotti ponsiviljelyssä kasveja, ja luku nousi 88 %:iin, jos toinen vanhempi oli tuottanut kasveja ponsiviljelyssä aikaisemmin. Se että ponsiviljelymenetelmä ei toimi kaikilla lajikkeilla, asettaa rajoituksia sen hyötykäytölle. Ponsiviljely vaatii myös suhteellisen suuren työpanoksen, jolloin käytännön kustannukset helposti tulevat jalostusyhtiöille liian suuriksi. Kysymykseen tulee menetelmän soveltaminen lähinnä erittäin lupaaviin risteytysaineistoihin. Kauran ponsiviljelyssä on kuitenkin potentiaalia ja odotettavissa on, että menetelmät tulevat paranemaan, koska tällä hetkellä maailmalla useissa laboratorioissa on tutkimushankkeita käynnissä kauran DH-linjojen tuottamiseksi ponsi- tai mikrosporiviljelyssä. Ponsien viljelyn sijasta eristettyjen mikrosporien viljely pudottaisi menetelmästä työlään ponsien eristysvaiheen pois, jolloin ajansäästöön vuoksi päästäisiin luultavasti alempiin tuotantokustannuksiin. Toistaiseksi kauran mikrosporiviljely ei ole onnistunut missään, mutta oletettavaa on, että toimivat menetelmät kehitetään monien muiden viljelykasvien tavoin tulevaisuudessa myös kauralle.

Jalostajalla on mahdollisuus nopeuttaa risteytyslinjojen yhtenäistämistä perinteiseen osapopulaatiovalintamalliin verrattuna myös käyttämällä ns. SSD- (single seed descent) menetelmää. Siinä kylvetään kaikki F_1 -kasvin tuottamat siemenet, mutta seuraavista sukupolvista aina vain yksi siemen per kasvi. Siten kasvihuonekasvatuksia käyttäen pohjoisissakin olosuhteissa voidaan risteytysjälkeläisistä kasvattaa useita sukupolvia yhden vuoden aikana ja saavuttaa huomattavaa aikasäästöä lajikejalostusohjelmissa. SSD-menetelmän haittana on, että siinä tarvitaan runsaasti kasvihuonetilaa ja että sekin on suhteellisen runsastoinen. SSD- ja ponsiviljelymenetelmää verrattaessa voidaan todeta, että molemmissa on omat etunsa. SSD-menetelmällä linjoissa ehtii tapahtua rekombinaatiota, kun taas ponsiviljelyssä edut painottuvat nimenomaisesti täydelliseen homotsygotiaan ja sen tuomaan valintatehokkuuteen.

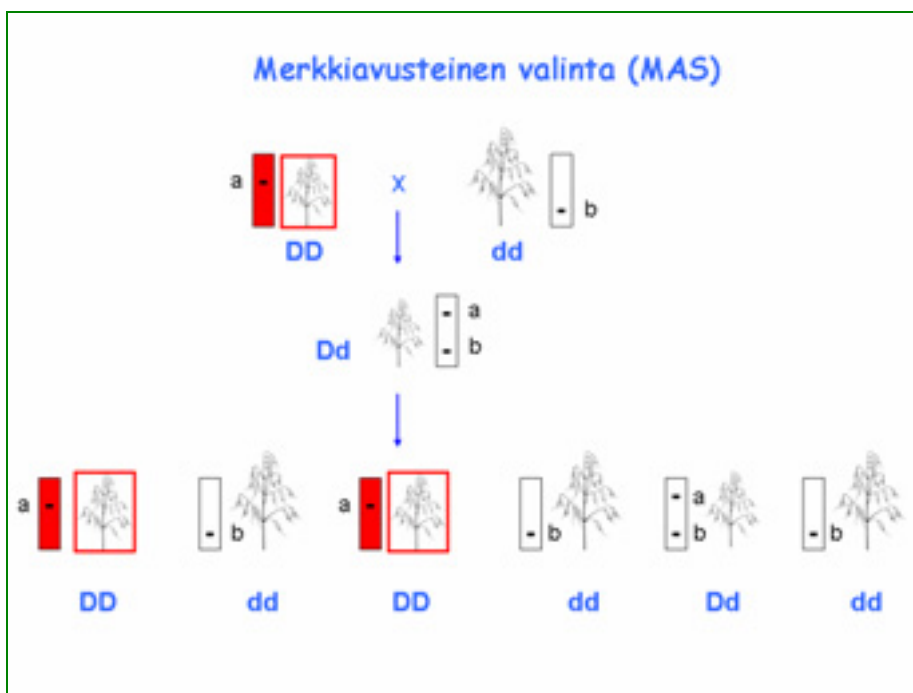


Kuva 1. Osapopulaatiovalintamalli ja DH-tekniikan mahdolliset sovellusvaiheet itsepölytteisellä viljalla kuten kaura.

Geenikartoitus

Geenikartta on DNA-merkkien eli satunnaisten DNA-jaksojen sijaintipaikkoja kromosomeissa kuvaava kaavio, jota käytetään ominaisuuksiin vaikuttavien geenien paikantamiseen. DNA-merkkitekniikoita on useita ja niiden avulla DNA-molekyyleissä sijaitsevat eroavaisuudet saadaan silmin havaittaviksi. Geenikartoituksessa tarvitaan risteytysjälkeläistö, jossa seurataan DNA-merkkien periytymistä sukupolvelta toiselle. Tieto siitä, miten usein DNA-merkkejä kasvin perimässä vastaavat DNA-jaksot periytyvät yhdessä ja miten

usein erikseen, voidaan muuttaa karttaetäisyyksiksi käyttäen tietokoneohjelmia. Kun jälkeläisten DNA-merkkítiedot ja ominaisuustiedot yhdistetään, voidaan tutkittuihin ominaisuuksiin vaikuttavat geenit paikantaa kartalle. Samalla saadaan selville näihin ominaisuuksiin vaikuttavien geenien määrät ja yksittäisten geenien vaikutuksen suuruus. Riittävän lähellä haluttuun ominaisuuteen vaikuttavaa geeniä sijaitsevia DNA-merkkejä voidaan käyttää jalostuksen apuna (Kuva 2.). Merkkiavusteisen valinnan perusteena käytetään DNA-merkkiä, itse ominaisuutta ei siis tarvitse mitata. Lisäksi kasvukauden aikaiset sää-olosuhteet ja muut ympäristötekijät eivät vaikuta DNA-merkkeihin.



Kuva 2. DNA-merkkeihin perustuvan merkkiavusteisen valinnan periaate. Esimerkkinä kauran dominoiva kääpiökasvugeeni (D), jota on mahdotonta valita pelkästään kasvin piteuden perusteella, koska lyhyet yksilöt voivat olla homo (DD)- tai heterotsygootteja (Dd). Sen sijaan kääpiökasvugeeniin tiukasti kytkeytyneen DNA-merkin avulla (a) voidaan valita homotsygootit yksilöt, jolloin yhden valintavaiheen jälkeen saadaan jälkeläistö puhdistettua pitkän kasvun aikaansaavasta geenimuodosta (d). Kasvit voidaan valita varhaisessa kasvuvaiheessa, koska DNA-merkki selvitetään pienestä lehdenpalasta.

DNA-merkin käyttökelpoisuus riippuu siitä, kuinka lähellä geeniä merkki on. Jos merkin etäisyys geenistä on 10 cM, se tarkoittaa, että merkki antaa väärän tuloksen 10 %:ssa jälkeläisistä. Yli 10 cM:n päässä sijaitsevia merkkejä ei juuri kannata käyttää. Toisaalta jos voidaan käyttää kahta merkkiä, jotka reunistavat geeniä, voivat ne sijaita kauempanakin. Paras merkki on tietysti

sellainen, joka sijaitsee itse geenissä; tällaisia merkkejä voidaan kehittää kandidaattigeenien avulla. Kandidaattigeenit ovat samalta tai eri lajilta jo sekvensoituja geenejä, joiden tiedetään tai oletetaan vaikuttavan haluttuun ominaisuuteen. Sekvensoimalla kandidaattigeeni haluamamme risteytysjälkeläistön vanhemmilta, voidaan niiden välisiin sekvenssieroihin perustuen kehittää DNA-merkki. Mikäli DNA-merkki sijaitsee liian kaukana geenistä, geenikartan avulla voidaan kuitenkin yrittää päästä lähemmäksi sitä ja kehittää uusia merkkejä. Käytännössä tämä on erittäin työlästä, eikä siihen kannata ryhtyä, ellei kyseessä ole erittäin suurivaikutteinen geeni ja tärkeä jalostettava ominaisuus. DNA-merkkien käyttö on suhteellisen kallista, mutta toisaalta säästetään runsaasti aikaa ja työtä. Jalostajan päätettäväksi jää, onko saavutettava hyöty panostuksen arvoinen. DNA-merkkitiieto ei välttämättä ole siirrettävissä suoraan risteytysjälkeläistöstä toiseen. Siksi ennen merkkien käyttämistä pitää varmistaa, että ne ovat monimuotoisia ja osoittavat halutun geenimuodon olemassaolon myös tutkittavassa aineistossa.

Useita kauran kytkentäkartoja on laadittu eri risteytyksiä käyttäen ja useisiin ominaisuuksiin vaikuttavia geenejä on jo paikannettu. Kartojen hyödynnettävyyttä vähentää se, että kytkentäryhmien vastaavuutta eri kartoissa ei useinkaan tiedetä. Kartoja voidaan vertailla toisiinsa ns. ankkurimerkkien avulla (RFLP-merkkejä tai mikrosatelliitteja). RFLP-merkkien analysoiminen on työlästä ja kauralla on vielä toistaiseksi ollut saatavissa suhteellisen vähän mikrosatelliitteja. Mikrosatelliitteja ollaan kuitenkin kehittämässä kauralle lisää (mm. Becher 2007).

Lisäksi kauralle on kehitetty ns. DArT-teknologiaa, joka tulee olemaan kaupallisesti käytettävissä Australialaisen Diversity Arrays Technology Pty Ltd –yrityksen kautta. Menetelmä perustuu DNA:n hybridisaatioon mikrosirulle ja sen avulla pystytään analysoimaan kerralla jopa useita tuhansia DNA-merkkejä. DArT kehitettiin alun perin riisillä, mutta sitä on sovellettu jo 19 muullekin kasvilajille mukaan lukien ohra ja vehnä (Akbari ym. 2006).

Geeninsiirto

Viljojen geeninsiirrot on enimmäkseen tehty partikkelipommitusmenetelmän avulla. Kohdesolukkona voidaan käyttää epäkypsiä alkioita tai siitepölyhiukkasia, embryogeenisiä solukkoviljelmiä tai esimerkiksi kauralla lehdentvisolukkoa. Agrobakteerin avulla tehty transformaatio toimii kaksisirkkaisten kasvien lisäksi yhä tehokkaammin myös useilla viljoilla, kuten ohralla. Menetelmänä agrobakteerivälitteinen geeninsiirto on yksinkertaisempi, tehokkaampi ja genomiin kiinnittyy lähes aina vain yhdestä kolmeen kopiota siirtoegeenistä verrattaessa partikkelipommitukseen, jossa kopioluku voi olla jopa kymmeniä. Erityisesti vähäinen kopiomäärä tuo usein etuna stabiilin sukupolvesta toiseen säilyvän geenin ilmenemisen. Kauralle hyvin toimivaa agro-

bakteerivälitteistä menetelmää ei ole vielä julkaistu, mutta todennäköisesti se on tulevaisuuden vaihtoehto kaurallakin.

Geeninsiirtotekniikan etuna on se, että jo hyväksi havaittuun geneettiseen taustaan, eli hyvään lajikkeeseen, voidaan siirtää toivotun ominaisuuden aiheuttava geeni, ilman risteyttämisen väistämättä aiheuttamaa koko genomien sekoittumista. Näin uuden ominaisuuden omaava lajike on mahdollista saada kauppaan nopeammin, koska lajikkeen yhtenäistämiseen tarvitaan vain lyhyt itsepölytysvaihe. Lisäksi geeninsiirtotekniikka tuo mahdollisuuden hakea toivottu ominaisuus tarvittaessa lajista, joka ei perinteisin menetelmin risteytyisi kauran kanssa. Tarvittaessa voidaan liikkua myös kasvimaailman ulkopuolella ja hyödyllisiä ominaisuuksia on mahdollista hakea muista organismeista, esimerkiksi bakteereista tai eläimistä.

Tekniikkana geeninsiirto on herättänyt paljon keskustelua, ja suhtautuminen siirtogeenisiin lajikkeisiin on EU:n alueella ollut varauksellinen. Siirtogeenisiä lajikkeita kuitenkin viljellään pienimuotoisesti EU:ssakin (mm. torjunta-ainekestävää maissia Espanjassa ja soijapapua Romaniassa). Siirtogeenisiä kauralajikkeita ei tiedettävästi ole toistaiseksi viljelyssä missään maailmassa. Siirtogeenisten lajikkeiden suhteen noudatetaan EU:ssa varovaisuusperiaatetta, jonka perusteella hakijan täytyy osoittaa lupaa hakeva lajike syöjälleen (ravinto- tai rehukäyttö) sekä ympäristölle riskittömäksi. Euroopan markkinoille tarkoitetut gm-lajikelupahakemukset käsittelee Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen EFSA (European Food Safety Authority), ja arviointiprosessissa kysytään jokaisen EU-maan kantaa hakemukseen. Hyväksynnästä päätetään EU:n korkeissa hallintoelimissä. Voidaan perustellusti väittää että siirtogeeniset tuotteet ovat tällä hetkellä EU:n kaikkein tarkimmin testatut tuotteet.

Tämän tutkimuksen perusteella kotimaisten lajikkeidemme geeninsiirtojalostuksessa tarvittavat menetelmät ovat saatavilla. Niiden mahdollinen käyttö lajikejalostuksessa on viimekädessä yhteiskunnallinen päätös, johon vaikuttavat kuluttajien, elintarviketeollisuuden, viljelijöiden, päättäjien ja poliitikkojen näkökannat. Riskien lisäksi on suotavaa arvioida myös geeninmuutellun tuomat hyödyt ja joissakin tapauksissa harkita myös käyttämättä jättämisen riskit.

Genomiikka

Genomiikalla tarkoitetaan elävän organismin koko perintöaineksen eli genomien tutkimusta. Kasveilla koko genomien DNA:n emäsjärjestys on selvitetty lituruoholta ja riisiltä. Funktionaalinen genomiiikka tutkii kaikkien geenien ja niiden koodaamien proteiinien toimintaa ja yhteispeliä. Mikrosirujen avulla on mahdollista tutkia eliön lähes kaikkien geenien samanaikaista ilmenemistä eri olosuhteissa. Vertaileva genomiiikka käyttää eri lajien DNA-

sekvenssitietoa mm. evolutiikan kysymysten ratkaisemiseen. Vertailevaa genomiikkaa voidaan myös hyödyntää silloin, kun tutkittavasta kasvilajista itsestään ei ole genomitietoa saatavilla.

Kauralle on toistaiseksi kehitetty vasta vähän genomiikan työkaluja. Geenikirjastoista löytyy vielä niukasti DNA-sekvenssitietoa. Lähettiläis-RNA-pohjaisia EST-tunnistesekvenssejä (Expression sequence tag) on tiedossa alle 10 000, kun esimerkiksi ohran genomikirjastoista niitä löytyy yli 200 000. EST-sekvenssit edustavat periaatteessa jotain tiettyä geenituotetta ja niitä hyödynnetään geenitoiminnan tutkimuksessa, esimerkiksi kun etsitään kandidaattigeenejä halutulle ominaisuudelle (mikrosiruanalyysi). Kauran mikrosirua ei vielä ole saatavissa, eikä sellaista ole lähiaikoina odotettavissa. Kaupalliset Affymetrixin ohralle ja vehnälle kehittämät mikrosirut eivät kovin hyvin sovellu kauralle, koska niissä käytetään näille lajeille spesifisiä lyhyitä DNA-jaksoja, joihin kauran mRNA:t eivät sitoudu kunnolla. Paras tällä hetkellä olemassa oleva vaihtoehto on ohran cDNA-siru, joka perustuu pitkiin komplementaarisen DNA:n jaksoihin, joihin myös hieman kaukaisemman lajin, kuten kauran, DNA voidaan saada kiinnittymään.

Kandidaattigeenejä on mahdollista etsiä myös cDNA-AFLP-tekniikalla. Siinä materiaalina käytetään DNA:n sijasta mRNA:sta tehtyä cDNA:ta. AFLP-merkit monistuvat tässä sovelluksessa toimivista geneeistä. Sirutekniikasta poiketen eroja on mahdollista löytää missä tahansa ilmenevistä geneeistä, ei vain niissä, jotka on kiinnitetty sirulle. AFLP-menetelmä optimoitiin kauralle tässä projektissa. Ominaisuuteen kytkeytyneet merkit on mahdollista kloonata ja sekvensoida ja bioinformatiikan työkaluilla selvittää, mihin geneeihin ne osoittavat yhtäläisyyttä. Geenisekvenssejä voidaan verrata ohran, vehnän, riisin ja aralusteen EST-kirjastoihin ja riisin genomisekvenssi-dataan. Muilta kasveilta kertynyttä tietoa käytetään hyväksi geenisekvenssien annotaatiossa eli tulkinnassa. Näin pystytään rajaamaan löytyneistä kandidaattigeeneistä ne, jotka todennäköisesti vaikuttavat haluttuun ominaisuuteen. Kun geenit tunnetaan, voidaan tuottaa spesifisiä DNA-merkkejä käytettäväksi näiden ominaisuuksien merkkiavusteisessa valinnassa. Kun kauran genomitieto tulevaisuudessa lisääntyy, myös genomitutkimuksen ja kauran lajikejalostuksen mahdollisuudet paranevat.

Hankkeen julkaisut

Projektiyryhmä on hankkeen aikana julkaissut seuraavat aiheeseen liittyvät julkaisut:

KIVIHARJU, E. 2004. Doubled haploids from oat (*Avena sativa* L.) anther culture. Teoksessa: XI International palynological congress, 4–9 July, Granada, Spain. *Polen* 14: 28–29.

KIVIHARJU, E. 2004. Production and use of anther culture derived DH-lines of oat. Teoksessa: Pirjo Peltonen-Sainio and Mari Topi-Hulmi (toim.). Proceedings 7th International Oat Conference. *Agrifood Research Reports* 51: 70.

KIVIHARJU, E., LAURILA, J., LEHTONEN, M., TANHUANPÄÄ, P., MANNINEN, O. 2004. Anther culture properties of oat x wild red oat progenies and a search for RAPD markers associated with anther culture ability. *Agricultural and food science* 13, 1–2: 151–162.

KIVIHARJU, E., MANNINEN, O., PIETILÄ, L., TANHUANPÄÄ, P. 2004. DNA marker for oat dwarfing gene. Teoksessa: Pirjo Peltonen-Sainio and Mari Topi-Hulmi (toim.) Proceedings 7th International Oat Conference. *Agrifood Research Reports* 51: 171.

KIVIHARJU, E., MANNINEN, O., TANHUANPÄÄ, P. 2006. Geenikartoitus tehostaa kauranjalostusta. Koetoiminta ja käytäntö 63 (18.12.2006): 4. Saatavissa internetistä: <http://www.mtt.fi/koetoiminta/pdf/mtt-kjak-v63n04s04b.pdf>

KIVIHARJU, E., MOISANDER, S., LAURILA, J. 2005. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant cell tissue and organ culture* 81: 1–9.

KIVIHARJU, E., RITALA, A., TANHUANPÄÄ, P., KALENDAR, R., OKSMAN-CALDENTEY, K.-M., SUORTTI, T., MANNINEN, O., HIETANIEMI, V., PIETILÄ, L., NUUTILA, A. M., SCHULMAN, A. 2006. Biotechnology in improving oat β -glucan content. Teoksessa: *Dietary Fibre: Multifunctional complex of components*, 12.–14.6.2006. s. 89–90.

KIVIHARJU, E., TANHUANPÄÄ, P., MANNINEN, O., KALENDAR, R., SCHULMAN, A. 2006. Identification of DNA markers associated with cadmium accumulation in oat. Teoksessa: *Eucarpia*, November 13 to 17, 2006, Lleida, Spain. s. 167.

MANNINEN, O., TANHUANPÄÄ, P., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., PIETILÄ, L., KIVIHARJU, E. 2006. QTLs associated with quality traits in oat DH mapping population. Teoksessa: *Eucarpia*, November 13 to 17, 2006, Lleida, Spain. s. 104.

- MANNINEN, O., TANHUANPÄÄ, P., TENHOLA-ROININEN, T., KIVIHARJU, E. 2004. Doubled haploids and genetic mapping in barley, rye and oat. Teoksessa: Johann Vollmann, Heinrich Grausgruber and Peter Ruckenbauer (toim.) Genetic variation for plant breeding: proceedings of the 17th EUCARPIA general congress, 8–11 September 2004, Tulln - Austria. Vienna: Austria. s. 309.
- NUUTILA, A. M., LEHTO, K., OKSMAN-CALDENTY, K-M. 2004. Transgenic oat for improved BYDV resistance. Teoksessa: Pirjo Peltonen-Sainio and Mari Topi-Hulmi (toim.). Proceedings 7th International Oat Conference. Agrifood Research Reports 51: 88.
- RITALA, A., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., OKSMAN-CALDENTY, K-M, SUORTTI T., SCHULMAN A., NUUTILA A. M. 2004. Genetic engineering of β -glucan contents of oats. Teoksessa: Pirjo Peltonen-Sainio and Mari Topi-Hulmi (toim.). Proceedings 7th International Oat Conference. Agrifood Research Reports 51: 152.
- RITALA, A., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., OKSMAN-CALDENTY, K-M, SUORTTI T., SCHULMAN A., NUUTILA A. M. 2004. Genetic engineering of β -glucan contents of oats. Teoksessa: Johann Vollmann, Heinrich Grausgruber and Peter Ruckenbauer (toim.) Genetic variation for plant breeding: proceedings of the 17th EUCARPIA general congress, 8–11 September 2004, Tulln - Austria. Vienna: s. 508.
- RITALA, A., SUORTTI, T., KALENDAR, R., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., OKSMAN-CALDENTY, K.-M., SCHULMAN, A. & NUUTILA, A.M. 2006. Modifying beta-glucan content of oat by genetic engineering. 8th Int. Congr. Plant Molecular Biology (ISPMB). Adelaide, Australia, 20–25 Aug. 2006, s. 111.
- RITALA, A., TANHUANPÄÄ, P., HOLKERI, H., KALENDAR, R., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., SUORTTI, T., SARÉN, A.-M., PIETILÄ, L., KIVIHARJU, E., OKSMAN-CALDENTY, K.-M., NUUTILA, A.-M., SCHULMAN, A. H. 2005. Quality breeding of oat. Teoksessa: Biotechnology Havana 2005: For Sustainable Food Production. Havana, Cuba, 27.11.–2.12.2005. s. 147.
- TANHUANPÄÄ, P. 2004. Täsmäjalostusta teollisuuden tarpeisiin – uudet menetelmät kauran laatujaalostuksessa. NeoBio vuosiseminaari 2004. (Esitelmä).
- TANHUANPÄÄ, P., KALENDAR, R., LAURILA, J., SCHULMAN, A. H., MANNINEN, O., KIVIHARJU, E. 2006. Generation of SNP markers for short straw in oat (*Avena sativa* L.). Genome 49: 282–287.
- TANHUANPÄÄ, P., KALENDAR, R., MANNINEN, O., PIETILÄ, L., LAURILA, J., SCHULMAN, A., KIVIHARJU, E. 2004. Development of SNP markers for the oat dwarfing gene Dw6. Teoksessa: Johann Vollmann, Heinrich Grausgruber and Peter Ruckenbauer (toim.) Genetic variation for plant

- breeding: proceedings of the 17th EUCARPIA general congress, 8–11 September 2004, Tulln - Austria. Vienna: s. 315.
- TANHUANPÄÄ, P., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., KIVIHARJU, E. 2006. Uncovering of a major gene for grain cadmium accumulation in oat. Teoksessa: Plant genomics European meetings 5, Venice, 11.–14.10.2006.
- TANHUANPÄÄ, P., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., KIVIHARJU, E. A major gene for grain cadmium accumulation in oat (*Avena sativa* L.). Genome, (Painossa).
- TANHUANPÄÄ, P., MANNINEN, O., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., PIETILÄ, E., KIVIHARJU, E. 2006. The first oat linkage map constructed using androgenetic DH lines. Teoksessa: Plant genomics European meetings 5, Venice, 11.–14.10.2006.
- TANHUANPÄÄ, P., MANNINEN, O., PIETILÄ, L., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., KIVIHARJU, E. 2006. A DH population for mapping quality traits in oats (*Avena sativa* L.). Teoksessa: COST Action 851: Gametic Cells and Molecular Breeding for Crop Improvement, Final Workshop, February 10–11, 2006. Vienna. s. 24.
- TANHUANPÄÄ, P., MANNINEN, O., PIETILÄ, L., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., KIVIHARJU, E. 2006. A DH population for mapping quality traits in oats (*Avena sativa* L.). Teoksessa: The International Conference "Haploids in Higher Plants III", Vienna-Austria, February 12–15, 2006. Vienna. s. 30.
- TANHUANPÄÄ, P., RITALA, A., KALENDAR, R., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., SUORTTI, T., PIETILÄ, L., HOLKERI, H., SAREN, A.-M., OKSMAN-CALDENTEY, K.-M., NUUTILA, A.-M., SCHULMAN, A., KIVIHARJU, E. 2005. Tailored oats for industrial demands - modern techniques for quality breeding of oats. NeoBio ja Lääke 2000 -posterinäyttely BioFinland05-tapahtumassa 26.–28.4.2005. (Poster)
- TUVESSON, S., DAYTEG, C., HAGBERG, P., MANNINEN, O., TANHUANPÄÄ, P., TENHOLA-ROININEN, T., KIVIHARJU, E., WEYEN, J., FÖRSTER, J., SCHONDELMAIER, J., LAFFERTY, J., MARN, M., FLECK, A. 2006. Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. Euphytica. Online first, DOI 10.1007/s10681-006-9239-8. Verkkoversio on ladattavissa sivulta <http://www.springerlink.com/content/cr102291u4p58643/>.

Kirjallisuus

- Akbari M., Wenzl P., Vanessa C., Carling J., Xia L., Yang S., Uszynski G., Mohler V., Lehmensiek A., Kuchel H., Hayden M. J., Howes N., Sharp P., Rathmell B., Vaughan P., Huttner E., Kilian A. 2006. Diversity Arrays

- Technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 113: 1409-1420.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Baur, S. K. & Geisler, G. 1996. Vererbung des β -Glucangehaltes der Haferkaryopse. *Journal of Agricultural and Crop Science* 176: 315–322.
- Baur, S. K. & Geisler, G. 1996. Variabilität im β -Glucangehalt der Haferkaryopse von 132 Kulturhafer- und 39 Wildhafergenotypen. *Journal of Agricultural and Crop Science* 176: 151–157.
- Becher E. 2007. EST-derived microsatellites as a rich source of molecular markers for oats. *Plant Breeding* (verkköjulkaisu 21.2.2007 sivustolla www.blackwell-synergy.com), doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01330.x.
- Becker, J. & Heun, M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology* 27: 835–845.
- Bregitzer, P., Somers, D. A. & Rines, H. W. 1989. Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. *Crop Science* 29: 798–803.
- Buckeridge, M. S., Vergara, C. E. & Carpita, N. C. 1999. The mechanism of synthesis of a mixed-linkage (1->3),(1->4)- β -D-glucan in maize (*Zea mays* L.). Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiology* 120: 1-12.
- Burton, R.A., Wilson, S.M., Hrmova, M., Harvey, A.J., Shirley, N.J., Medhurst, A., Stone, B.A., Newbigin, E.J., Bacic, A. & Fincher, G.B. 2006. Cellulose synthase-like *Cs/F* genes mediate the synthesis of cell wall (1,3;1,4)- β -D-glucans. *Science* 311: 1940–1942.
- Bush, A. L. & Wise, R. P. 1998. High-resolution mapping adjacent to the *Pc71* crown-rust resistance locus in hexaploid oat. *Molecular Breeding* 4: 13-21.
- Christou, P., Ford, T. L. & Kofron, M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9: 957–962.
- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475–486.
- Foisset, N. & Delourme, R. 1996. Segregation distortion in androgenic plants. Teoksessa: Jain, M. S, Sopory, S. K. & Veilluex, R. E. (toim.) *In vitro* haploid production in higher plants. Vol 2 -Applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

- Fromm, M. E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thoma, J. & Klein, T. M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8: 833–839.
- Gless, C., Lörz, H. & Jähne-Gärtner, A. 1998. Transgenic oat plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of leaf base segments. *Journal of Plant Physiology* 152:151–157.
- Graner, A. 1996. RFLP-mapping the haploid genome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Teoksessa: Jain, S. M., Sopory, S. K. & Veilleux, R. E. (toim.) *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. s. 127-150.
- Groh, S., Kianian, S. F., Phillips, R. L., Rines, H. W., Stuthman, D. D., Wengenberg, D. M. & Fulcher, R. G. 2001a. Analysis of factors influencing milling yield and their association to other traits by QTL analysis in two hexaploid oat populations. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 9–18.
- Groh, S., Zacharias, A., Kianian, S. F., Penner, G. A., Chong, J., Rines, H. W. & Phillips, R. L. 2001b. Comparative mapping in two hexaploid oat populations. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 876–884.
- Hackauf, B. & Wehling, P. 2002. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breeding* 121: 17–25
- Hautala, J. 2002. Kaura – lastenruokien arvo-osa. Kaurasta elinvoimaa seminaari, Jokioinen 2.10.2002, s.42–44.
- Hietaniemi, V., Könkö, K., Aro, H., Euroola, M., Pihlava, J.-M. & Kontturi, M. 2002. Terveysvaikutteinen kaura ja kaurafraktiot. Kaurasta elinvoimaa seminaari, Jokioinen 2.10.2002, s. 4–17.
- Holland, J. B., Helland, S. J., Shaporova, N. & Rhyne, D C. 2001. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. *Genome* 44: 1065–1076.
- Holland, J. B., Moser, H. S., O'Donoghue, L. S. & Lee, M. 1997. QTLs and epistasis associated with vernalization responses in oat. *Crop Science* 37: 1306–1316.
- Holthaus, J. F., Holland, J. B., White, P. J. & Frey, K. J. 1996. Inheritance of β -glucan content of oat grain. *Crop Science* 36: 567–572.
- Hou, X., Tong, H., Selby, J., Dewitt, J., Peng, X. & He, Z. H. 2005. Involvement of a cell wall-associated kinase, WAKL4, in Arabidopsis mineral responses. *Plant Physiology* 139: 1704–1716.

- Humphreys, D. G. & Mather, D. E. 1996. Heritability of β -glucan, groat percentage, and crown rust resistance in two oat crosses. *Euphytica* 91: 359–364.
- Immonen, S., Tauriainen, A., Manninen, O. 1999. Assessment of green regenerants from rye and triticale anther cultures. Teoksessa: Clement, C., Pacini, E., Audran, J. C. (toim.) *Anther and pollen: from biology to biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, s. 237–245.
- Inoue, S. B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y. & Watanabe, T. 1995. Characterization and gene cloning of 1,3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 231: 845–854.
- Jannink, J.-L. & Gardner, S. W. 2005. Expanding the pool of PCR-based markers for oat. *Crop Science* 45: 2383–2387.
- Jin, H., Domier, L. L., Shen, X. & Kolb, F. L. 2000. Combined AFLP and RFLP mapping in two hexaploid oat recombinant inbred populations. *Genome* 43: 94–101.
- Jähne, A. & Lörz, H. 1995. Cereal microspore cultures. *Plant Science* 109: 1–12.
- Kaepler, H. F., Menon, G. K., Skadsen R. W., Nuutila, A. M. & Carlson, A. R. 2000. Transgenic oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19: 661–666.
- Kalendar, R., Grop, T., Regina, M., Suoniemi, A. & Schulman, A. H. 1999. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DANN fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704–711.
- Kalendar, R. & Schulman, A. H. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1: 2478–2484.
- Kangas A., Kedonperä A., Laine A., Niskanen M., Salo Y., Vuorinen M., Jauhiainen L. & Mäkelä L. 2002. Viljalajikkeiden taudinallisuus virallisissa lajikekoissa 1991–2001. MTT:n selvityksiä 9. Jokioinen: MTT. s. 43–45.
- Kempe, R., Särkijärvi, S., Saastamoinen, M., Ahtila, L. & Kommeri, U. 2001. Kaura hevosten ja koirien ruokinnassa ja rehujen raaka-aineena. Teoksessa: Salovaara, H., Sontag-Strohm, T. (toim.). *Kaurasta elinvoimaa: maa- ja metsätalousministeriön rahoittamat kansallisen kauraohjelman tutkimushankkeet 1998–2000*. Helsingin yliopisto. Elintarviketeknologian laitos. EKT-sarja 1221: 109–126.
- Kianian, S. F., Phillips, R. L., Rines, H. W., Fulcher, R. G., Webster, F. H. & Stuthman, D. D. 2000. Quantitative trait loci influencing β -glucan content in oat (*Avena sativa*, $2n=6x=42$) *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1039–1048.

- Kianian, S. F., Egli, M. A., Phillips, R. L., Rines, H. W., Somers, D. A., Gegenbach, B. G., Webster, F. H., Livingston, S. M., Groh, S., O'Donoghue, L. S., Sorrels, M. E., Wesenberg, D. M., Stuthman, D. D. & Fulcher, R. G. 1999. Association of a major groat oil content QTL and an acetyl-CoA carboxylase gene in oat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 884–894.
- Kibite, S. & Edney, M. J. 1998. The inheritance of β -glucan concentrations in three oat (*Avena sativa* L.) crosses. *Canadian Journal of Plant Science* 78: 245–250.
- Kiviharju, E., Moisander, S. & Laurila, J. 2005. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant cell tissue and organ culture* 81: 1–9.
- Kiviharju, E., Puolimatka, M., Saastamoinen, M., Pehu, E. 2000. Extension of anther culture to several genotypes of cultivated oats. *Plant Cell Reports* 19: 674–679.
- de Koeyer, D. L., Tinker, N. A., Wight, C. P., Deyl, J., Burrows, V. D., O'Donoghue, L. S., Lybaert, A., Molnar, S. J., Armstrong, K. C., Fedak, G., Wesenberg, D. M., Rossnagel, B. G. & McElroy, A. R. 2004. A molecular linkage map with associated QTLs from a hulless x covered spring oat population. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1285–1298.
- Kunz, C., Islam, S. M. S., Berberat, J., Peter, S. O., Büter, B., Stamp, P. & Schmid, J. E. 2000. Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *Journal of Plant Physiology* 156: 190–196.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E., & Newburg, L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.
- Li, C. D., Rossnagel, B. G. & Scoles, G. J. 2000. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1259–1268.
- Li, G. & Quiros, C. F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 455–461.
- Liu, Z. W., Biyashev, R. M. & Saghai Maroof, M. A. 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 869–876.

- Manninen, O. 2000. Assocations between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 57–62.
- McCleary, B. V. & Codd R. 1991. Measurement of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in barley and oats: a streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 55: 303–312.
- Michelmore, R. W., Paran, I. & Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828–9832.
- Mordhorst, A. P. & Lörz, H. 1993. Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture medium. *Journal of Plant Physiology* 142: 485–492.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 437–497.
- Murray, H. G. & Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Resesearch* 8: 4321–4326.
- Mäkelä-Kurto, R., Louekari, K., Nummivuori, S., Sippola, J., Kaasalainen, M., Kuusisto, E., Virtanen, V., Salminen, R., Tarvainen, T. & Malm, J. 2003. Kadmium Suomen peltoekosysteemeissä: pitoisuuksia, taseita ja riskejä. *Maa- ja elintarviketalous* 27. Jokioinen: MTT. 51s. ISBN 951-729-769-6.
- O'Donoghue, L. S., Kianian, S. F., Rayapati, P. J., Penner, G. A., Sorrels, M. E., Tanksley, S. D., Phillips, R. L., Rines, H. W., Lee, M., Fedak, G., Molnar, S. J., Hoffman, D., Salas, C. A., Wu, B., Autrique, E. & Van Deynze, A. 1995. A molecular linkage map of cultivated oat. *Genome* 38: 368–380.
- Ouyang, J. W., Jia, S. E., Zhang, C., Chen, X. & Feng, G. 1989. A new synthetic medium (W_{14}) for wheat anther culture. *Annu. Rep. Inst. Genetics, Academia Sinica 1987–1988*: 91–92, Beijing.
- Pal, N., Sandhu, J. S., Domier, L. L., & Kolb F. L. 2002. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR markers in oat. *Crop Science* 42: 912–918.
- Paul, G. L., Onk, S. L. & Geiger, C. J. 1999. The Quaker Oats health claim: A case study. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medicinal Foods* 1: 5–32.
- Portyanko, V. A., Chen, G., Rines, H. W., Phillips, R. L., Leonard, K. J., Ochocki, G. E. & Stuthman, D. D. 2005. Quantitative trait loci for partial resistance to crown rust, *Puccinia coronata*, in cultivated oat, *Avena sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 313–324.

- Portyanko, V. A., Hoffman, D. L., Lee, M. & Holland, J. B. 2001. A linkage map of hexaploid oat based on grass anchor DNA clones and its relationship to other oat maps. *Genome* 44: 249–265.
- Poulsen, G. B., Kahl, G. & Weising, K. 1993. Abundance and polymorphism of simple repetitive DNA sequences in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 994–1000.
- Pullinen, T. 1998. Oats: A strategic Assessment. Prepared for the Finnish Ministry of Agriculture and Forestry. Sparks Companies, Inc, Memphis, TN, USA / Bio Business Consulting, Riihimäki, Finland.
- Ramsay, L., Macaulay, M., degli Ivanissevich, S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K. J., Tuvešson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmiroli, N., Sjakste, T., Ganai, M., Powell, W. & Waugh, R. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997–2005.
- Rines, H. W., Riera-Lizarazu, O., Nunez, V. M., Davis, D. W. & Phillips, R. L. 1997. Oat haploids from anther culture and from wide hybridisations. *Teoksessa: Jain, S. M., Sopory, S. K. & Veilleux, R. E. (toim.) In vitro haploid production in higher plants, Kluwer, Dordrecht* 4: 205–221.
- Ritala, A., Mannonen, L. & Oksman-Caldentey, K.-M. 2001. Factors affecting the regeneration capacity of isolated barley microspores (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Reports* 20: 403–407.
- Sasaki, K., Ohara, K. & Yazaki, K. 2005. Gene expression and characterization of isoprene synthase from *Populus alba*. *FEBS Letters* 579: 2514–2518.
- Saastamoinen, M. 1999. *Aslak-oat*. Boreal Research Report 9. 15 s. ISBN 952-5133-08-7.
- Salmenkallio-Marttila, M., Heiniö, R.-L., Myllymäki, O., Lille, M., Autio, K & Poutanen, K. 2004. Relating microstructure, sensory and instrumental texture of processed oat. *Agricultural and Food Science* 13:124–137.
- Salmenkallio-Marttila M, Kauppinen V. 1995. Efficient regeneration of fertile plants from protoplasts isolated from microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell. Rep.* 14: 253–256.
- Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.-H., Tong, H., Osawa, H., Baluška, F., Volkman, D. & Matsumoto, H. 2003. Aluminium-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. *Plant Physiology* 132: 2256–2266.
- Somers, D. A., Rines, H. W., Gu, W., Kaeppler, H. F. & Bushnell, W. R. 1992. Fertile, transgenic oat plants. *Bio/Technology* 10: 1589–1594.

- Suortti, T. 1993. Size-exclusion chromatographic determination of beta-glucan with postcolumn reaction detection. *Journal of Chromatography* 632: 105–110.
- Tinker, N. A. & Mather, D. E. 1995. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *JAG* 1:2. Saatavissa internetistä: <http://wheat.usda.gov/jag>
- Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O. & Heberle-Bors, E. 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat *Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* 9: 209–215.
- Vanithrani, R., Chellappan, P. & Fauquet, C.M. 2003. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA-accumulation in cultured plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 9632–9636.
- Van Ooijen, J. W. & Voorrips, R. E. 2001. JoinMap® 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuipe, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.
- Wan, Y. & Lemaux, P. G. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104: 37–48.
- Wight, C. P., Tinker, A., Kianian, S. F., Sorrells, M. E., O'Donoghue, L. S., Hoffman, D. L., Groh, S., Scoles, G. J., Li, C. D., Webster, F. H., Phillips, R. L., Rines, H. W., Livingston, S. M., Armstrong, K. C., Fedak, G. & Molnar, S. J. 2003. A molecular marker map in 'Kanota' × 'Ogle' hexaploid oat (*Avena* spp.) enhanced by additional markers and a robust framework. *Genome* 46: 28–47.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.
- Zhu, S. & Kaeppeler, H. F. 2003. A genetic linkage map for hexaploid, cultivated oat (*Avena sativa* L.) based on an intraspecific cross 'Ogle/MAM17-5'. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 26–35.
- Zhu, S., Kolb, F. L. & Kaeppeler, H. F. 2003. Molecular mapping of genomic regions underlying barley yellow dwarf tolerance in cultivated oat (*Avena sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1300–1306.

Maa- ja elintarviketalous -sarjan kasvintuotantoteemassa ilmestyneitä julkaisuja

2007

- 99** Biotekniikka kauran jalostuksessa. Uudet menetelmät laadun parantamiseksi. *Kiviharju, E., Ritala, A., Schulman, A., Pietilä, L., Tanhuanpää, P.* (toim.) 76 s. Hinta 20 euroa.

2006

- 91** Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet. Viherharrakentamisen kasvit. *Aaltonen ym.* 253 s. Hinta 25 euroa.
- 89** Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet. Hedelmät ja marjakasvit. *Aaltonen ym.* 160 s. Hinta 25 euroa.
- 85** Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet. Vihanne, yrtti- ja rohdoskasvit. *Ahokas, ym.* 99 s. Hinta 20 euroa.
- 84** Pohjoisessa kasvatettujen yrttien aromisuus. *Galambosi & Serenius.* 113 s. Hinta 25 euroa.
- 78** Population structure of *Pyrenophora teres*, the causal agent of net blotch of barley. *Serenius, M.* 60 s. Hinta 20 euroa.

2005

- 67** Viljojen kehityksen ja kasvun ABC. *Peltonen-Sainio, P.* ym. 72 s. Hinta 6 euroa.
- 1** Ruokohelven viljely ja korjuu energian tuotantoa varten. 2. korjattu painos. *Pahkala, K.* ym. 31 s. Hinta 15 euroa.

Julkaisuviitteet löytyvät sarjojen internetsivuilta
www.mtt.fi/julkaisut/sarjathaku.html.

