

*Maatalouden
tutkimuskeskuksen
julkaisuja*

S A R J A B

13

*Matti Puolimatka
Janos Pauk*

**Vehnän ponsi- ja
mikrosporiviljely-
menetelmät**

Matti Puolimatka ja Janos Pauk

Vehnän ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmät

**Anther and isolated microspore
culture methods of wheat
(*Triticum aestivum*)**

Maatalouden tutkimuskeskus

ISBN 951-729-510-3

ISSN 1238-9943

Copyright

Maatalouden tutkimuskeskus
Matti Puolimatka ja Janos Pauk

Julkaisija

Maatalouden tutkimuskeskus, 31600 Jokioinen

Painatus

Vammalan Kirjapaino Oy, 1998

Sisäsivujen painopaperille on myönnetty pohjoismainen joutsenmerkki.
Kansimateriaali on 75-prosenttisesti uusiokuitua.

¹⁾ Maatalouden tutkimuskeskus, Kasvintuotannon tutkimus, Peltokasvit ja maaperä, 31600 Jokioinen, matti.puolimatka@mtt.fi

²⁾ Cereal Research Non-profit Company, Szeged, Alsó kikötő sor, H-6726, Hungary, h10151pau@ella.hu

Tiivistelmä

Avainsanat: androgeneesi, embryogeneesi, haploidi, jalostus, kaksoishaploidi, mikrospori, mikrosporiviljely, ponsiviljely, Triticum aestivum L., vehnä

Tässä raportissa kuvataan vehnän ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmät, jotka soveltuvat suomalaisen vehnänjalostuksen apuvälineiksi. Menetelmien avulla voidaan tuottaa kaksoishaploideja kasveja, jotka nopeuttavat ja tehostavat lajikkeen jalostusta. Ponsiviljelymenetelmässä heteen ponnit eristetään emokasvien tähkistä ravintoalustalle, jolloin ponsien sisältämät mikrosporit kehittyvät ensin alkion kaltaisiksi rakenteiksi ja edelleen kokonaisiksi versoiksi. Mikrosporiviljelymenetelmässä mikrosporit vapautetaan veitsihomogeni-

saattorin avulla ponnin sisältä ja niitä viljellään sellaisenaan ravintoalustalla. Mikrosporit kehittyvät ponsiviljelyn tapaan alkionkaltaisiksi rakenteiksi. Molempien menetelmien toimivuus on testattu syys- ja kevätvehnän jalostusaineistoissa, ja niiden avulla pystytään tuottamaan parin vuoden sisällä risteytyksestä riittävästi aineistoa testattavaksi kentällä muutaman neliömetrin koeruudulla. Raportissa kuvataan menetelmät yksityiskohtaisesti ja tarkastellaan niiden toimivuuteen vaikuttavia tekijöitä.

Puolimatka, M.¹ & Pauk, J.² 1998. Anther and Isolated Microspore Culture Methods of Wheat (*Triticum aestivum*). Publications of Agricultural Research Centre of Finland. Serie B 13. Jokioinen: Agricultural Research Centre of Finland. 21 p. ISSN 1238-9943, ISBN 951-729-510-3.

¹⁾ Agricultural Research Centre of Finland, Plant Production Research, Crops and Soil, 31600 Jokioinen, matti.puolimatka@mtt.fi

²⁾ Cereal Research Non-profit Company, Szeged, Alsó kikötő sor, H-6726, Hungary, h10151pau@ella.hu

Abstract

Key words: androgenesis, anther culture, breeding, doubled haploid, embryogenesis, haploid, microspore, microspore culture, Triticum aestivum L., wheat

Anther and isolated microspore culture procedures were optimized for producing doubled haploids from Finnish spring and winter wheat materials. The anther culture procedure involved dissecting the cold pre-treated anthers with microspores at the late uninucleate stage on a liquid W14 induction medium, incubating the cultures in the dark at 32°C for the first three days and then at 28°C, transferring the microspore-derived embryo-like structures into the light on a 190-2 regeneration medium, transplanting the plantlets into soil after sufficient root systems have developed and doubling the chromosomes with colchicine

if necessary. The isolated microspore culture procedure involved isolating the microspores with blending, cleaning the isolates with centrifugation, co-culturing the isolated microspores with wheat ovaries in TR-mp1 medium and regenerating green plantlets as in the anther culture. Both procedures were tested on spring and winter wheat breeding materials. The results show that it is possible to obtain homozygous seed material for field plot tests within 2 years of crossing. This report describes the procedures and discusses some of the factors affecting the anther and isolated microspore culture response.

Alkusanat

Vehnä (*Triticum aestivum* L.) on yksi maailman kolmesta tärkeimmästä viljasta ja tärkein leipävilja. Viisivuotisen (1993-1997) tutkimusprojektin *In vitro* -kaksois-haploidimenetelmän soveltaminen talvenkestävän massasyysvehnän (*Triticum aestivum* L.) jalostukseen tavoitteena oli kehittää vehnän jalostusta nopeuttava ja tehostava solukkoviljelymenetelmä. Projektia aloitettaessa syysvehnän satopotentiaalia pidettiin suurempana kuin kevätvehnän ja ajatuksena oli nopeasti jalostaa myös rehukäyttöön soveltuva vehnä, tästä nimitys massasyysvehnä. Ongelmaksi sadon nopeassa lisäämisessä jalostuksen avulla koettiin tuolloin syysvehnän jalostuksen hitaus. Siksi jalostusta nopeuttavan menetelmän kehittämistä pidettiin hyvänä ja tutkimisen arvoisena tavoitteena. Tutkimuksen tavoitte laajeni matkan varrella ja siihen tuli kaksi lisäystä. Teknisistä syistä siirryimme varsin pian tutkimuksen alettua käyttämään koeaineistona kevätvehnää, joten samalla syntyi menetelmä myös kevätvehnälle. Toiseksi, alunperin tavoitteena oli kehittää vain yksi menetelmä, ponsiviljely, mutta sen lisäksi syntyi mikrosporiviljelymenetelmä. Vehnän ponsiviljely oli jo paljon ennen tämän tutkimuksen alkua vallannut maailmaa, kun taas mikrosporiviljely on ollut harvinaisempaa, vaikeampaa ja siten myös tutkimuksellisesti kiinnostavampaa. Vaikka kuvaamiemme menetelmien käytännön soveltajia lienee jalostajien lisäksi vähän, toivomme tämän julkaisun voivan toimia

jonkinlaisena oppaana myös niille, jotka tahtoen tai tahtomattaan joutuvat tutkijoina, viranomaisina tai muussa ominaisuudessa tekemisiin kasvien solukkoviljelyn tai solukkoviljelytutkijoiden kanssa. Olemme pyrkineet välttämään vieraskielisten sanojen käyttöä niin pitkälle kuin mahdollista, ja ainakin yrittäneet selittää sellaiset termit, joita emme kokonaan ole onnistuneet välttämään. Olemme julkaisseet osia tässä raportissa esitetyistä tuloksista aiemmin (Puolimatka et al. 1995, Puolimatka et al. 1996, Puolimatka et al. 1997).

Kiitämme maa- ja metsätalousministeriötä, Raision yhtymän tutkimussäätiötä, Kansainvälisen Henkilövaihdoksen Keskusta ja OMFB:tä (National Committee for Technological Development, Budapest, Unkari) tämän tutkimuksen rahoittamisesta. Laborantti Sisko Laine saa tekijöiden varauksettomat kiitokset erinomaisella ammattitaidolla tehdystä tutkimustyöstä ja oma-aloitteisuudesta ja kekseliäisyydestä tutkimusongelmien ratkaisuyrityksissä. Projektiiin ovat lisäksi osallistuneet jalostaja Leena Hömmö (1993-1994), jalostaja Tapio Juuti (Boreal; 1994-), professori Seppo Pulli (1993-1995), laborantti Leena Ramstedt (1995-1997), opiskelija Hanna-Maija Anttila (1993), opiskelija Kari Kylä-Nikkilä (1995) ja opiskelija Katri Talvioja (1997). Kiitämme myös toimittaja Riitta Saloa (MTT) julkaisun toimittamisesta ja erityisen kärsivällisestä suhtautumisesta kirjoittajiin.

Jokioisilla maaliskuussa 1998

Matti Puolimatka

Janos Pauk

Sisällys

Tiivistelmä	3
Abstract	4
Alkusanat	5
1 Johdanto	7
1.1 Kasvin elinkierto	7
1.2 Haploidi, kaksoishaploidi ja niiden merkitys jalostuksessa	7
1.3 Mikrosporin kehitysvaiheet	8
1.3.1 Mikrosporin normaali kehitys	8
1.3.2 Mikrosporin kehitys solukkoviljelyssä	9
1.4 Tutkimuksen tavoite	9
2 Aineistot	10
3 Ponsiviljelymenetelmä	11
3.1 Induktio-, erilaistumis- ja juurtumisalustojen koostumus ja valmistus	11
3.2 Emokasvien kasvatusta	12
3.3 Tähkien keräys, mikrosporin kehitysvaiheen määrittäminen ja kylmäesikäsittely	13
3.4 Tähkien sterilointi ja ponsien eristäminen	13
3.5 Induktiovaihe	13
3.6 Erilaistumisvaihe	13
3.7 Juurtumisvaihe	13
3.8 Siirrostus multa	13
3.9 Kolkisiinikäsittely	14
3.10 Kaksoishaploidien tuleennuttaminen	14
4 Mikrosporiviljelymenetelmä	14
4.1 Induktio-, erilaistumis- ja juurtumisalustojen koostumus ja valmistus	15
4.2 Emokasvien kasvatusta	15
4.3 Mikrosporin kehitysvaiheen määrittäminen, tähkien keräys ja kylmäesikäsittely	15
4.4 Tähkien sterilointi, mikrosporien eristäminen ja viljely	15
4.5 Emien yhteisviljely	17
4.6 Induktiovaihe	17
4.7 Erilaistumis- ja juurtumisvaiheet, siirto multa, kolkisiinikäsittely ja kaksoishaploidien tuleennuttaminen	17
5 Arvioita ja havaintoja ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmien käytöstä	17
5.1 Mikrosporin kehitysvaihe ja emokasvien kasvatolosuhteet	17
5.2 Kylmäesikäsittely ja tähkien sterilointi	18
5.3 Ponsien nypintä ja mikrosporien eristäminen	18
5.4 Induktioalustat ja -olosuhteet	18
5.5 Emien yhteisviljely	19
5.6 Erilaistuminen, spontaani kromosomiston kahdentuminen ja albinismi	19
6 Yhteenvedo	19
Kirjallisuus	20

1 Johdanto

Elämä maapallolla perustuu auringon säteilyenergiaan, joka sitoutuu kemialliseksi energiaksi kasveissa kehittyneen yhteyttämismekanismien ansiosta. Kasvit toimivat siten maapallon primääriseen energian vastaanottajina ja välittäjinä muille eliöille ja niitä voidaan kiistatta pitää maapallolla olevan elämän perustana. Osan kasveista ihminen on ottanut "hoitoonsa" tuottaakseen itselleen ja kotieläimilleen ravintoa. Näiden kasvilajien evoluution kulkuun ihminen on osallistunut viljelytekniikan ja kasvinjalostuksen kautta: viljelytekniikka on muuttanut kasvuympäristöä ja kasvinjalostus on valinnut uusiin olosuhteisiin paremmiin sopeutuvia genotyyppisiä. Kasvinjalostus on pystynyt tehostamaan paitsi kasvien sopeutumista ja energiansitomiskykyä niin myös niiden tapaa ohjata energialataus sellaisiin osiin, joita ihminen voi käyttää hyödyksi.

Kasvinjalostusta ihminen on harjoittanut yhtä kauan kuin viljelyäkin eli noin 10 000 vuotta. Kasvinjalostus perustuu geneettisen monimuotoisuuden ja muuntelun olemassaoloon sekä geenien ja vallitsevien ympäristöolosuhteiden yhteistoinninan ymmärtämiseen. Ilman geneettistä muuntelua (ts. jos ominaisuuden muuntelu on yksinomaan seurausta ympäristön muuntelusta) ei jalostuksella voida saavuttaa edistystä tutkittavan ominaisuuden parantamisessa. Jalostusmenetelmät ovat historian aikana kehittyneet huomasti valintajalostuksesta aina nykyaikaisiin geeniteknologisiin menetelmiin. Uusimpia kasvinjalostuksen tutkimusmenetelmiä on solukoviljely. Se on mullistanut kasvitutkimusta erityisesti siten, että enää ei tarvita siemeniä tai sivuversoja kasvien lisäämiseen vaan jokainen yksittäinen solu mistä tahansa kasvinosasta voi ainakin periaatteessa toimia uuden kasviyksilön lähtömaterialina.

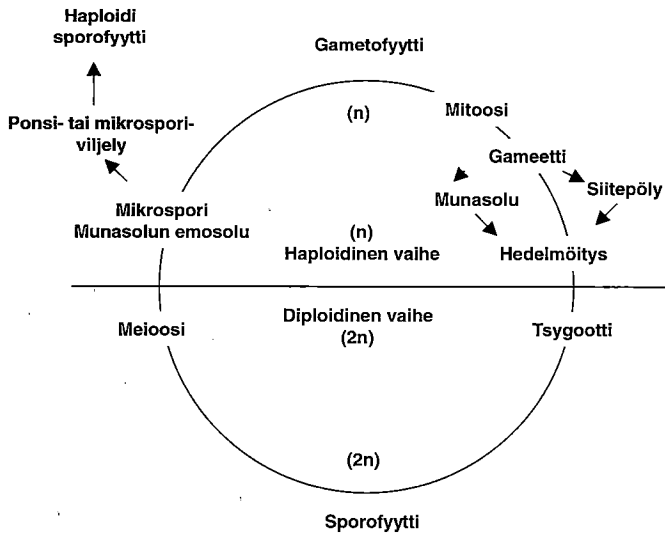
1.1 Kasvin elinkierto

Kasvin elinkierto jakautuu sporofyyttiseen ja gametofyyttiseen vaiheeseen (Kuva 1). Sporofyyttivaihe alkaa tsygootista, joka syntyy hedelmöityksessä koiraspuolisen siitepölyn ja naaraspuolisen munasolun yhdistyessä, ja jolla on kaksinkertainen eli diploidi kromosomiluku. Sporofyyttivaihe päättyy ja gametofyyttivaihe alkaa, kun sukusolut käyvät läpi meioosin, jossa kromosomiluku puolittuu. Sporofyytin ja gametofyytin tärkein ero onkin kromosomiluvussa: sporofyytillä on diploidi ja gametofyytillä yksinkertainen eli haploidi kromosomiluku. Gametofyyttivaihe etenee meioosin jälkeen siten, että sukusolut kehittyvät meioosin jälkeisistä esiasteista kypsiksi sukusoluiksi, jotka ovat valmiita suorittamaan seuraavan hedelmöityksen.

1.2 Haploidi, kaksoishaploidi ja niiden merkitys jalostuksessa

Haploidi on sporofyytti, jolla on gametofyytin yksinkertainen kromosomiluku. Haploideja syntyy luonnossa mutaatioiden kautta alhaisella frekvenssillä, mutta niitä voidaan tuottaa myös keinotekoisesti ponsi- ja mikrosporiviljelyllä (Clapham 1971), munasolun viljelyllä (San-Noeum 1976), lajien välisen etäristeytyksen (Kasha & Kao 1970), tai hyödyntämällä haploidia aiheuttavaa hap-geeniä (Hagberg & Hagberg 1981). Kun haploidin kromosomisto kahdennetaan, syntyy kaksoishaploidi.

Kromosomiston kahdentaminen voi tapahtua joko spontaanisti tai kemiallisesti esimerkiksi kolkisiinin avulla. Kolkisiini häiritsee tuman jakautuessa tumasukkulan muodostumista, jolloin mitoosissa kahdentuneet ja toisistaan erkaantuneet vastinkromatiinit jäävät samaan tumaan. Kaksoishaploidi on kromosomiston kahdentamisen seurauksena homotsygootti (eli se sisältää identtiset alleelit jokaisesta geenistä), lisääntymiskykyinen, siementä tuottava ja kykenevä toteuttamaan kasvin



Kuva 1. Kasvin sukupolvivuorottelu ja ponsi- ja mikrosporiwiljelyn ajoittuminen. Ponsi- ja mikrosporiwiljelyssä mikrospori kehittyy gametofyytin sijasta haploidiksi sporofyytiksi. Kahdentamalla haploidin kromosomiston syntyy homotsygootti kaksoishaploidi, joka on fertiili (Hu 1996).

normaalia sporofyytti/gametofyytti -sukupolvivuorottelua.

Kaksoishaploidien avulla saavutetaan homotsygotia ensimmäisessä risteytyksen jälkeisessä sukupolvessa, kun siihen normaalin sukupolvikasvatuksen kautta kuluu 5–6 itsepölytysukupolvea. Tämän ansiosta kaksoishaploidit nopeuttavat jalostusaineiston tuottamista itsepölytteisillä lajeilla useita vuosia. Kaksoishaploidit lisäävät myös valinnan tehokkuutta, sillä kaksoishaploideissa geneettinen muuntelu dominanssimuuntelun puuttuessa muodostuu pelkästään geenien additiivisesta vaikutuksesta eli kaikkien geenien yhteisvaikutuksesta ja epistasiasta eli eripaikkaisten geenilokusten yhdysvaikutuksesta (Snape 1989). Valinta tehostuu, koska valittu yksilö ei rekombinoi valinnan jälkeisissä itsepölytysukupolvissa.

1.3 Mikrosporiin kehitysvaiheet

Seuraavassa on esitetty mikrosporiin normaali gametofyyttinen kehitys kypsäksi sii-

tepölyksi ja mikrosporiin sporofyyttinen kehitys solukkoilijolosuhteissa.

1.3.1 Mikrosporiin normaali kehitys

Mikrospori on siitepölyhiukkasen esiaste, joka ajallisesti liittyy kasvin elinkierrossa gametofyyttivaiheen alkuun heti meioosin jälkeen. Mikrosporiin kehittyminen eli mikrosporigeneesi saa alkunsa mikrosporiin emoluista (engl. MMC = microspore mother cell tai PMC = pollen mother cell). Ne ovat peräisin nuoren pölyn ns. sporogeenisestä diploidista solukosta, joka sijaitsee muutamaa solukerrosta pölyn päällysketon eli epidermin alapuolella (Shivanna et al. 1997).

Meioosissa emoluun vastinkromosomit erkanevat toisistaan, minkä jälkeen tapahtuu vielä toinen mitoottinen jakautuminen, jossa kromosomien vastinkromatiinit erkanevat toisistaan. Lopputuloksena syntyy ns. tetradi, jossa on ensi vaiheessa kalloosiseinän välityksellä toisiinsa liittyneinä neljä haploidia solua. Kehityksen edistyessä tetradi hajoaa, mikrosporit erkanevat toi-

sistaan ja aloittavat oman kehityksensä siitepölyksi.

Yksitumaisen mikrosporin haploidi tuma kulkeutuu mikrosporin sisällä toiseen laitaan, jossa se jakautuu mitoottisesti. Jakautuminen on epäsymmetrinen, ja siinä syntyy kaksi tuma, pienempi generatiivinen ja suurempi vegetatiivinen tuma. Generatiivinen tuma jakautuu uudestaan, jolloin syntyy kaksi generatiivista tuma. Hedelmöityksessä vegetatiivinen tuma kasvattaa siiteputken emin luotilta alkiorakkoon, jolloin generatiiviset tumat pääsevät tekemään ns. kaksoishedelmöityksen. Toinen generatiivinen tuma yhtyy naaraspuolisen munasoluun, jolloin muodostuu diploidi tsygootti. Toinen generatiivinen tuma yhtyy alkiorakossa olevaan diploidiseen keskustumaan aloittaen triploidisen vararavintosolukon eli endospermin kehittymisen. Kaksisirkkaisilla lajeilla generatiivinen tuma jakautuu vasta pölytyksen yhteydessä, kun taas yksisirkkaisilla lajeilla generatiivinen tuma jakautuu ponnin sisällä jo ennen pölytystä.

1.3.2 Mikrosporin kehitys solukkoviljelyssä

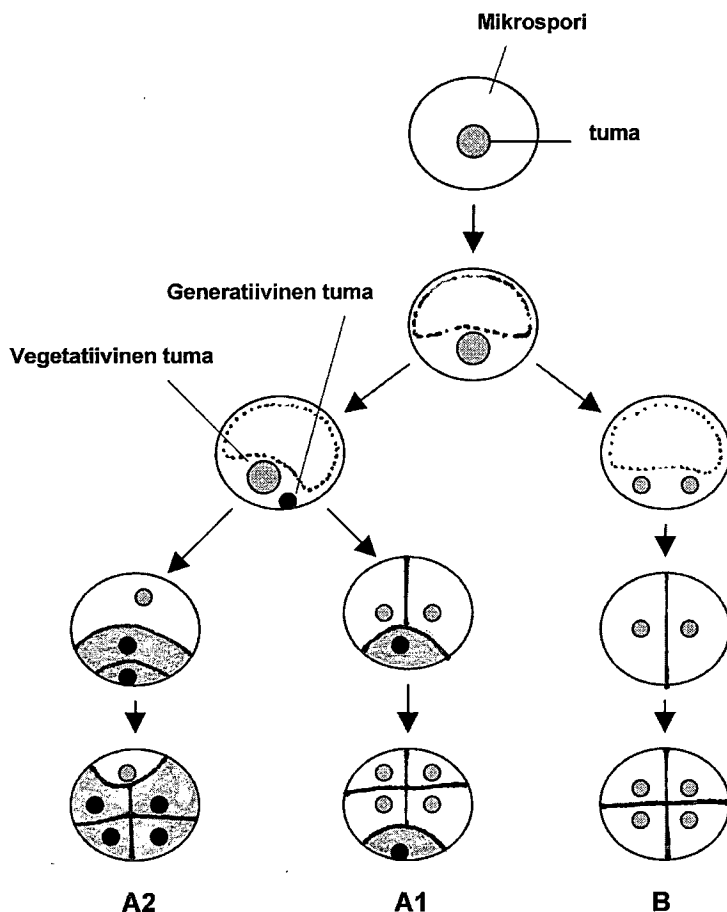
Kasvisolut ovat totipotentteja eli kaikkivoipaisia. Tämä tarkoittaa sitä, että jokainen kasvisolu sisältää sen geneettisen tiedon, joka tarvitaan kokonaisen uuden kasvin kasvamiseen. Yksi totipotenssin hyödyntämismahdollisuuksista on mikrosporien kehityksen muuntaminen gametofyyttisestä sporofyyttiseen kehitykseen. Mikrosporit erilaistuvat solukkoviljelyolosuhteissa siitepölyn sijasta haploidiksi kasviksi joko erilaisumattoman haavasolukon eli kalluksen tai normaalia alkioita muistuttavan rakenteen kautta. Tapahtumaa kutsutaan androgeenesiksi tai gameettiseksi embryogeneesiksi. Mikrosporit voivat kehittyä alkiorakenteiksi kahta reittiä, joita kutsutaan reitiksi A ja reitiksi B (Reynolds 1997) (Kuva 2). A- ja B-reitin keskeisin ero on mikrosporin tuman ensimmäisessä jakautumisessa. Rei-

tissä A tumanjakautuminen on epäsymmetrinen kuten normaalissakin mikrosporin kehityksessä. Reitti A jaetaan kahteen alareittiin A1 ja A2. Näiden keskeisin ero on siinä, lähteekö alkiorakenne kehittymään vegetatiivisesta vai generatiivisesta solusta. Reitissä A1 vegetatiivinen tuma alkaa jakautua ja muodostaa alkiorakenteen generatiivisen tuman surkastuessa. Reitissä A2 generatiivinen tuma alkaa jakautua vegetatiivisen tuman surkastuessa. Reitissä B ensimmäinen jakautuminen on symmetrinen, jolloin syntyy kaksi symmetristä solua, jotka yhdessä voivat toimia alkionkaltaisen rakenteen lähtösoluna.

Mikrosporien solukkoviljelykasvun onnistumiseen vaikuttavat useat tekijät, kuten emokasvin genotyyppi, emokasvin kasvatusolosuhteet, mikrosporin kehitysaste, viljelyalustan koostumus ja solukkoviljelyolosuhteet (lämpötila, valo) (Dunwell 1996, Hu 1996). Vaikka näiden tekijöiden merkitys havaitaan toistuvasti, hyvin vähän itse asiassa ymmärretään kunkin tekijän vaikutusmekanismia. Yleisesti oletetaan, että jonkinlainen stressitekijä, kuten matala tai korkea lämpötila tarvitaan laukaisemaan mikrosporien embryogeneesin (Touraev et al. 1997).

1.4 Tutkimuksen tavoite

Tutkimuksen perimmäinen tavoite oli suomalaisen kasvintuotannon kilpailukyvyyn parantaminen hyödyntämällä syysvehnän satopotentiaalia ja lisäämällä sitä nopeasti kasvinjalostuksen avulla. Tutkimusprojektin suoranaista tavoitteena oli kehittää solukkoviljelyyn perustuva kaksoishaploidien tuottomenetelmä, joka nopeuttaisi jalostusaineiston tuottamista syysvehnällä. Tavoitteeseen pääsemiseksi tutkittavaksi menetelmäksi valittiin ensin ponsiviljelymenetelmä, jolla oli tuotettu aiemmin vehnäjalajikkeita Kiinassa ja Ranskassa (Hu et al. 1986, DeBuyser et al. 1987). Projektin aikana tutkimuksen kohteeksi otettiin myös mikrosporiviljelymenetelmä, jossa



Kuva 2. Mikrosporin ensimmäiset tumanjakautumiset ja kehitysreitit *in vitro*-olosuhteissa. Reitissä A ensimmäinen jakautuminen on epäsymmetrinen, minkä jälkeen joko vegetatiivinen tuma (reitti A1) tai generatiivinen tuma (reitti A2) kehittyy edelleen erilais-tumattomaksi kallukseksi tai alkiomaiseksi rakenteeksi. Reitissä B ensimmäinen tuman-jakautuminen on symmetrinen, ja molemmat syntyvät tumat jatkavat jakautumista. (Rey-nolds 1997)

kohdesolu on sama, mutta viljelymenetelmä poikkeava. Ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmien kehittämiseksi tehtiin runsaasti erilaisia kokeita, joissa pyrittiin selvittämään mikrosporien solukkoviljelyvas-teen kannalta kriittiset tekijät.

2 Aineistot

Tutkimuksen alkuperäisenä tavoitteena oli kehittää menetelmä syysvehnän jalostuk-

seen, joten tutkimuksen alkaessa käytettiin aineistona vain syysvehnää. Varsin pian kuitenkin huomattiin, että erityisesti suomalaisten syysvehniä vernalisaatio (kylmäkaraisu, joka tarvitaan ennen kuin tähkiä muodostuu) oli erittäin hankala toteuttaa kylmä- ja kasvihuoneolosuhteissa. Viileässä (4 °C) lämpötilassa suomalaisia syysvehniä piti kasvatua useita kuukausia, mikä teki kokeiden suunnittelun ja toteuttamisen vaikeaksi, osin jopa mahdotto-maksi. Siksi menetelmän kehittämisessä siirryttiin aineiston osalta varsin nopeasti

kevätvehnään tiedostaen samalla sen, että kevätkuvehnänä on geneettisesti erilainen kuin syysvehnä, ja että genotyyppi saattaa vaikuttaa ratkaisevasti solukkoviljelyn onnistumiseen. Kevätkuvehnällä oli huomattavasti helpompi suunnitella kokeita, sillä kasvurytmi tunnettiin tarkkaan, joten kokeiden aikataulut pystyttiin suunnittelemaan järkevästi. Tutkittavat syysvehnät saatiin projektin alussa jalostaja Leena Hömmöltä (MTT) ja kevätkuvehnät jalostaja Tapio Juutilta (Boreal Suomen Kasvinjalostus). Syysvehnägenotyypit valittiin siten, että mukaan otettiin satoisuuden ja talvenkestävyyden suhteen potentiaalista ainesta. Kevätkuvehnägenotyypeiksi valittiin myös jalostuksen kannalta kiinnostavaa aineistoa kuten uusimpia lajikkeita (esim. 'Mahti') ja parhaita jalostuslinjoja (Hja 24201). Ponsiviljelymenetelmän kehittämisessä perustana käytettiin Dr. Janos Paukin tutkimaa menetelmää (Pauk et al. 1991, Pauk et al. 1995), jota muutettiin oleellisesti vain kasvatusalustan suhteen. Mikrosporiviljelymenetelmän kehittämisessä valittiin perusmenetelmäksi veitsihomogenisaattori tai ns. "tehoskoitin"-menetelmä, jolla voidaan eristää kerralla suuri määrä mikrosporeja (Mejza et al. 1993, Gustafson et al. 1995). Mikrosporiviljelytutkimuksissa käytettiin pääasiassa kahta genotyyppiä, 'Mahti' ja Hja 24201, joiden oli havaittu toimivan hyvin ponsiviljelymenetelmässä.

3 Ponsiviljelymenetelmä

Ponsiviljelyssä vehnän ponnet eristetään kukinnoista ja asetetaan ns. induktioalustalle. Ponsien sisältämät mikrosporit käyvät läpi kohdassa 1.3.2 kuvatun kehityksen ja siirtyvät gametofyyttisestä kehityksestä sporofyyttiseen kehitykseen. Ponsiviljelymenetelmä koostuu yhdeksästä vaiheesta, jotka aikajärjestyksessä ovat emokasvien kasvatus, tähkien kerääminen ja kylmäesikäsittely, ponsien eristys aseptiselle induktioalustalle, induktiomaljojen lämpökäsittely 3 vuorokautta + 32 °C viljelyn

Taulukko 1. Vehnän ponsiviljelymenetelmän vaiheet.

1. Emokasvien kasvatus
2. Tähkien keräys, mikrosporin kehitysvaiheen määrittäminen ja kylmäesikäsittely
3. Tähkien sterilointi ja ponsien eristys
4. Induktiovaihe
5. Erilaistumisvaihe
6. Juurtumisvaihe
7. Siirrostus multa
8. Kolkisiinikäsittely
9. Kaksoishaplloidien tuleennuttaminen

alussa, sen jälkeen siirto induktioon + 28 °C, kehittyvien alkiorakenteiden siirto erilaistumisalustalle, versojen erilaistuminen ja siirto juurtumisalustalle, versojen siirto multa ja totutus kasvihuoneelle, kolkisiinikäsittely ja tuleentuminen (Taulukko 1). Seuraavassa on selitetty yksityiskohtaisesti menetelmään liittyvien kasvatusalustojen koostumus ja valmistus sekä itse ponsien viljelyn vaiheet.

3.1 Induktio-, erilaistumis- ja juurtumisalustojen koostumus ja valmistus

Taulukossa 2 on esitetty ponsiviljelymenetelmässä käytettyjen induktio-, erilaistumis- ja juurtumisalustojen koostumukset. Induktioalustana käytettiin nestemäistä W₁₄-alustaa (Ouyang et al. 1988, Jia et al. 1994), erilaistumisessa kiinteää 190-2 -alustaa (Wang & Hu 1984) ja juurtumisessa kiinteää MS-0 -alustaa (Murashige & Skoog 1962). Kaikki alustat steriloidtiin autoklavoimalla 20 min. Jäähdytymisen jälkeen induktio- ja erilaistumisalustat annosteltiin petrimaljoille pumppuannostelijalla. Kokeissa käytettiin yleisimmin halkaisijaltaan 6 cm maljoja, joihin alustaa meni noin 7 ml. Juurtumisalusta valettiin Magentan 11 cm korkeisiin autoklavoivaan kasvatusrasioihin.

Taulukko 2. Vehnän ponsiviljelymenetelmässä käytettävien induktioalustan W₁₄ (Ouyang et al. 1988, Jia et al. 1994), erilaistumisalustan 190-2 (Wang & Hu 1984) ja juurtumisalustan MS-0 (Murashige & Skoog 1962) koostumukset.

	Induktioalusta		
	W ₁₄	190-2, mg/l	MS-0
KNO ₃	2 000	1 000	1 900
NH ₄ NO ₃			1 650
(NH ₄) ₂ SO ₄		200	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	200	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	140		440
KH ₂ PO ₄		300	170
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		100	
KCl		40	
K ₂ SO ₄	700		
NH ₄ H ₂ PO ₄	380		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	8	8	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	3	8,6
H ₃ BO ₃	3	3	6,2
KI	0,5	0,5	0,83
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025		0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025		0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,005		0,25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,3	37,3	37,3
Glysiini		2,0	2,0
Myo-inositoli		100	100
Pyridoksiini-HCl	0,5	0,5	0,5
Nikotiinihappo	0,5	0,5	0,5
Tiamiini-HCl	2,0	1,0	0,1
2,4-D	2,0		
KIN	0,5	0,5	
NAA		0,5	
Sakkaroosi	100 000	30 000	30 000
Phytigel		3 000	3 000
pH	6,0	5,8	5,8

3.2 Emokasvien kasvatusta

Emokasvit, joista ponnet ja mikrosporit eristettiin, kasvatettiin kasvihuoneessa tai pellolla. Kasvihuoneessa lämpötila oli päivällä 19 °C ja yöllä 18 °C ja valojakso 18 tuntia valoa ja 6 tuntia pimeää. Kastelu ja lannoitus tapahtuivat automaattisesti altakastelupöydillä. Lannoitteena käytet-

tiin Kekkilän 5 Super-X -lannoitetta (tyyppiä 11 %, fosforia 4 %, kaliumia 25 %). Emokasvit kylvettiin halkaisijaltaan 12 cm purkkeihin, kaksi siementä purkkiin. Kolmen ensimmäisen viikon aikana niitä kasvatettiin kastelukannulla, ja niille annettiin lannoitus kasteluveden joukossa. Kun versot olivat riittävän suuria, siirryttiin altakasteluun.

3.3 Tähkien keräys, mikrosporin kehitysvaiheen määrittäminen ja kylmäesikäsittely

Mikrosporin kehitysvaiheista myöhäistä yksitumavaihetta pidetään parhaana andro-geneesin onnistumisen kannalta (Dunwell 1996). Käytännössä vehnän tähkä on silloin lehtitupen sisällä näkymättömissä toiseksi ylimmän lehden kohdalla. Versot katkaistiin 3. ja 4. ylimpien lehtien välistä, lehdet leikattiin lippulehteä lukuunottamatta irti, ja versot laitettiin vettä sisältäviin 100 ml erlenmeyerpulloihin, noin 20–25 versoa pulloon. Versot sidottiin tiukasti pakastepussiin ja ne vietiin pullossa kylmäesikäsittelyyn +4 °C:een pimeään tai himmeään valoon vähintään kahdeksi viikoksi.

3.4 Tähkien sterilointi ja ponsien eristys

Kylmäesikäsittelyn jälkeen tähkät otettiin esiin lehtitupen sisältä ja pintasteriloitiin 20 % natriumhypokloriitilla 20 minuuttia. Ponnit nypittiin pinseteillä kokonaisina induktiomaljoille kasvatusalustan pinnalle. Tutkimuksessa käytettiin pääasiassa Falconin nystyröillä varustettuja petrimaljoja. Ponsia nypittiin yleensä 100 kappaletta 6 cm:n maljalle. Kun petrimaljalle oli nypitty haluttu määrä ponsia, malja suljettiin kannella ja kansi kiinnitettiin parafilmillä.

3.5 Induktiovaihe

Lämpökäsittelyn jälkeen maljat siirrettiin pimeään 28 °C:een. Ensimmäiset alkiorakenteet tulivat silmin nähtäviksi noin kolmen viikon kuluttua. Induktiovaihe lopetettiin yleensä noin kahdeksan viikkoa aloituksen jälkeen.

3.6 Erilaistumisvaihe

Noin neljän-viiden viikon kuluttua ensimmäiset alkiorakenteet saavuttivat 2 mm:n koon. Alkiorakenteet siirrettiin pinsettien avulla induktiomaljalta erilaistumisalustalle valoon ja 28 °C:een. Yhdelle 6 cm:n maljalle laitettiin noin 10–12 alkiota. Kehittyvät versot alkoivat vihertää jo parin päivän kuluttua. Versojen annettiin kehittyä erilaistumisalustalla noin 2–3 cm mittaisiksi. Aikaa tähän kului n. 3 viikkoa. Erilaistumisalustalla versoihin ei yleensä kehittynyt juuria.

3.7 Juurtumisvaihe

Vihreät versot siirrettiin Magenta-rasioihin juurtumisalustalle, noin viisi versoa rasiaa kohden. Juurtumisvaiheessa versot pidettiin 28 °C:ssa valossa.

3.8 Siirrostus multa

Versot, joihin oli kehittynyt hyvä juuristo, siirrettiin multa pienen verkkopurkkeihin. Verkkopurkkeissa juuristot pääsevät kehittymään normaalisti, ja ne ovat käytännöllisiä, koska kasvit voidaan siirtää suoraan isompiin purkkeihin ilman että verkkopurkkia tarvitsee poistaa. Ennen siirtoa juurista pestiin huolellisesti pois kasvatusalustan jäänteet. Siirrostuksen onnistumiseksi oli välttämätöntä peittää versot ensimmäisten vuorokausien ajaksi muovilla ja huolehtia riittävästä kosteudesta, jotta kasvit tottuivat huoneilman kosteuteen. Juurtumisrasiassa versot eivät totu säännöstelemään ilmarakojensa toimintaa, koska rasiassa vallitsee suuri ilmankosteus. Ensimmäisten vuorokausien aikana muovia raotettiin hetkittäin ja kasvit totutettiin vähitellen huoneilmaan. Samalla kasveja

sumutettiin vedellä liiallisen kuivumisen välttämiseksi. Noin viikon kuluttua versot yleensä olivat toipuneet siirrostuksesta ja muovipeite voitiin poistaa kokonaan ja sumutus lopettaa.

3.9 Kolkisiinikäsittely

Kromosomiston kaksinkertaistamiseksi versot käsiteltiin kolkisiinilla. Tätä varten noin pari viikkoa kasviuoneella kasvaneet ja selvästi vahvistuneet versot otettiin pois purkeista, niiden juuret pestiin hyvin ja leikattiin noin 1 cm:n pituisiksi. Jokaisen version sivuversot revittiin irti toisistaan. Sivuversojen irrottamisella saavutetaan kaksi etua: kolkisiiniliuos pääsee helpommin jakautuvaan meristeemisolukkoon, ja yhdestä alkuperäisestä versosta saadaan monistettua useita versoja ja näin mahdollisesti lisättyä siemensaantoa. Ennen kolkisiinikäsittelyä versoja kuivatettiin viisi-kuusi tuntia imupaperin päällä. Sen jälkeen ne laitettiin kolkisiiniliuosta (0,05 % kolkisiinia ja 2 % dimetylsulfoksidia, DMSO) sisältävään pieneen pulloon niin että versojen kasvupisteet olivat kokonaan liuoksen peittämiä. Kolkisiinikäsittely kesti viisi tuntia. Sen jälkeen versot pestiin huolellisesti ja istutettiin multaan verkkopurkkeihin. Versot peitettiin jälleen huolellisesti muovilla ja niitä sumutettiin muuttaman vuorokauden ajan kunnes ne osoittivat selviä vahvistumisen merkkejä.

3.10 Kaksoishaploidien tuleennuttaminen

Kolkisiinikäsittelyn jälkeen versot olivat valmiita lopullista kasvatusta varten. Mikäli käsittely oli onnistunut, versoihin kehittyi fertiilejä sivuversoja, jotka muodostivat siementä. Yleensä ensimmäiset kehittyvät versot olivat steriilejä ja vasta sivuversoihin muodostui siemeniä.

4 Mikrosporiviljelymenetelmä

Mikrosporiviljely eroaa ponsiviljelystä siten, että mikrosporit vapautetaan ponsien sisältä ennen viljelyn aloittamista. Tässä tutkimuksessa keskityttiin menetelmään, jossa eristys tehtiin Waring-veitsihomogeenisaattorilla (Pescitelli et al. 1990). Menetelmän erityinen etu ponsiviljelyyn verrattuna on mahdollisuus seurata haploidin, yksisoluisen mikrosporin kehitystä sporofyytiksi välittömästi viljelyn aloittamisesta lähtien, kun ponsiviljelyssä mikrosporin ensimmäiset kehitysvaiheet tapahtuvat ponsien sisällä. Mikrosporiviljelymenetelmää voidaan soveltaa kaksoishaploidien tuotannon lisäksi myös esimerkiksi *in vitro*-selektiossa, gameettisen embryogeneesin tutkimisessa ja geeninsiirrosta. Mikrosporiviljelyn vaiheet ovat pääpiirteissään samat kuin ponsiviljelyssä. Poikkeavaa on erilainen induktioalusta, mikrosporien eristysmenetelmä, ja emien yhteisviljelyn käyttö induktiovaiheessa. Mikrosporiviljelymenetelmän vaiheet on esitetty taulukossa 3. Seuraavassa on yksityiskohtaisesti kuvattu eri vaiheiden suorittaminen.

Taulukko 3. Vehnän mikrosporiviljelymenetelmän vaiheet.

1. Emokasvien kasvatusta
2. Mikrosporin kehitysvaiheen määrittäminen, versojen keräys ja kylmäesikäsittely
3. Tähkien sterilointi ja mikrosporien eristys ja viljely
4. Emien yhteisviljely
5. Induktiovaihe
6. Erilaistumisvaihe
7. Juurtumisvaihe
8. Siirrostus multaan
9. Kolkisiinikäsittely
10. Kaksoishaploidien tuleennuttaminen

Taulukko 4. Vehnän mikrosporiviljelymenetelmän induktioalustan TR-mp1 (Puolimatka et al. 1996) koostumus.

	Induktioalusta TR-mp1 mg/ml
KNO ₃	2830
(NH ₄) ₂ SO ₄	463
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
CaCl ₂ ·H ₂ O	166
KH ₂ PO ₄	400
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4,4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,6
KI	0,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,3
Glysiini	2,0
Myo-inositoli	1000
Pyridoksiini-HCl	0,5
Nikotiinihappo	0,5
Tiamiini	1,0
Glutamiini	200
2,4-D	1,5
Kinetiini	0,5
Maltoosi	62 000
pH	5,8

4.1 Induktio-, erilaistumis- ja juurtumisalustojen koostumus ja valmistus

Mikrosporiviljelyn induktioalustana käytettiin nestemäistä TR-mp1 -alustaa (taulukko 4) (Puolimatka et al. 1996). Induktioalusta steriloidtiin suodattamalla. Erilaisutumiseen ja juurtumiseen käytettiin samoja alustoja kuin ponsiviljelyssä (taulukko 2).

4.2 Emokasvien kasvatus

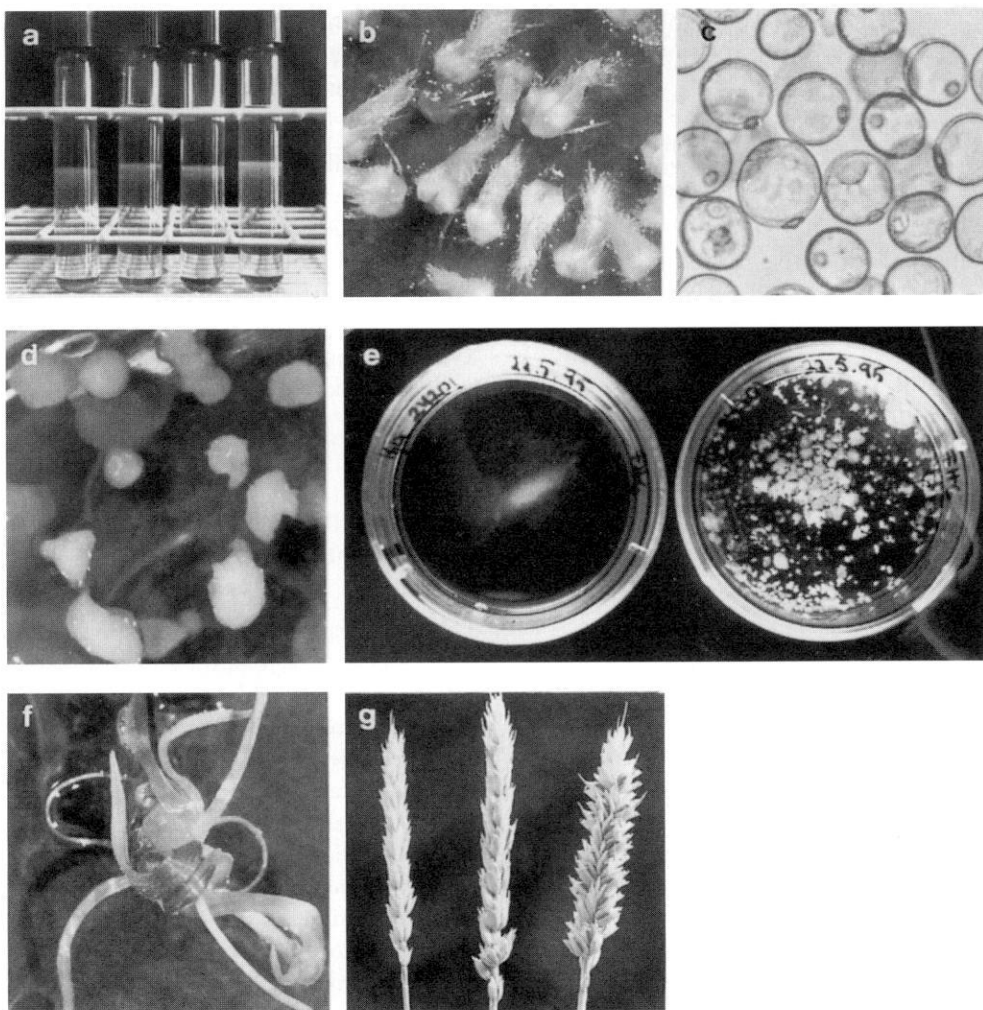
Mikrosporiviljelyssä emokasvit kasvatettiin samoin kuin ponsiviljelyssä (kohta 3.1).

4.3 Mikrosporin kehitysvaiheen määritys, tähkien keräys ja kylmäesikäsittely

Mikrosporiviljelyssä paras kehitysvaihe tähkien keräämiselle oli myöhäinen yksitumavaihe/aikainen kaksitumavaihe eli siis myöhemmin kuin ponsiviljelyssä. Käytännössä tähkä oli jo osin ulkona lehtitupesta, kun verso leikattiin. Versojen leikkaus ja kylmäesikäsittely tehtiin samoin kuin ponsiviljelyssä (kohta 3.2).

4.4 Tähkien sterilointi, mikrosporien eristys ja viljely

Tähkät pintasteriloitiin kuten ponsiviljelyssä (kohta 3.3). Jokaista eristystä varten käytettiin 12–15 tähkää, kymmenen tähkää mikrosporien eristykseen ja loput emien yhteisviljelyä varten. Eristystä varten tähkistä leikattiin irti tähkylät, jotka siirrettiin Waring-homogenisaattorin 150 ml:n säiliöön. Säiliöön lisättiin 50 ml 0,3 M steriiliä mannitoliliuosta ja sekoitettiin kahdesti viisi sekuntia. Suspensio suodatettiin 100 µm nylonverkon läpi. Suodatimen päälle jäänyt kiinteä aines siirrettiin takaisin säiliöön ja sekoitus ja suodatus toistettiin kuten edellä. Suodatettu suspensio siirrettiin 50 ml:n sentrifugiputkiin ja sentrifugoitiin viisi minuuttia 550 rpm. Mikrosporit pellettoituivat putken pohjalle. Supernatantti poistettiin ja pelletti liuotettiin uudelleen 2–3 ml:aan 0,3 M mannitoliliuosta. Mikrosporisuspensio siirrettiin varovasti koeputkeen, jonka pohjalle oli laitettu 20 % maltoosiliuosta. Näytteitä sentrifugoitiin uudelleen viisi minuuttia 550 rpm. Hyväkuntoiset mikrosporit jäivät maltoosiin ja mannitolin välivyöhykkeeseen (Kuva 3a), josta ne siirrettiin pipetillä uuteen putkeen. Mikrosporit pestiin vielä keran 0,3 M mannitolilla ennen viljelyä. Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen mikrosporipelletti liuotettiin induktioalustaan ja siirrettiin viljelymaljalle (Kuva 3c). Mik-



Kuva 3. Vehnän mikrosporiviljelyn vaiheet. Mikrosporit eristetään veitsihomogenisaattorilla, puhdistetaan sentrifugoimalla (kuvassa a mikrosporit näkyvät vaaleana vyöhykkeenä maltoosi-mannitoli –interfaasissa) ja viljellään nestemäisessä induktioalustassa. Mikrosporiviljelmään siirrostetaan tuoreita emejä (b), jolloin elinkykyiset mikrosporit (c) kehittyvät alkionkaltaisiksi rakenteiksi (d). Ilman emien yhteisviljelyä alkiorakenteita ei kehity (kuva e; vasemmalla n. 6 viikon ikäinen viljelmä ilman emejä, oikealla samanikäinen viljelmä emien kanssa; emit poistettu ennen kuvausta). Alkiorakenteet siirretään erilaistumisalustalle, jossa ne kehittyvät versoiksi (f). Kehittyvät versot voivat olla steriilejä (kuvassa g tähkä vasemmalla, ei siemeniä), osittain fertiilejä (tähkä keskellä, joitakin siemeniä) tai kokonaan fertiilejä (tähkä oikealla, normaali määrä siemeniä). (Kuvat: Matti Puolimatka) (Puolimatka et al. 1997)

rosporiviljelyssä yleisimmin käytetty maljakoko oli 3 cm.

4.5 Emien yhteisviljely

Mikrosporiviljelyn keskeinen vaihe on emien yhteisviljely. Steriloiduista tähkistä nyppitiin pinsettien avulla epäkypsiä emejä mikrosporiviljelmän pinnalle noin 20 kpl /3 cm malja (Kuva 3b). Emit lisättiin välittömästi viljelyn alussa. Emien lisäyksen jälkeen maljat suljettiin parafilmillä ja siirrettiin induktiovaiheeseen.

4.6 Induktiovaihe

Mikrosporiviljelyssä inkubaatio tapahtui 28 °C:ssa ja pimeässä. Vasteen antavat mikrosporit erottuivat mikroskoopilla jo muutamassa päivässä. Silminnähtäviksi alkiorakenteet kehittyivät noin kolmen viikon kuluessa (Kuva 3d).

4.7 Erilaistumis- ja juurtumisvaiheet, siirto multa, kolkisiinikäsittely ja kaksoishaploidien tuleennuttaminen

Alkiorakenteiden vaiheet erilaistumisesta tuleentumiseen saakka olivat samanlaiset kuin ponsiviljelyssä (kohdat 3.6–3.10) (Kuvat 3f ja 3g). Kolkisiinikäsittelyä ei mikrosporiviljelystä saaduille versoille tehty, mutta se voidaan tarvittaessa toteuttaa samoin kuin ponsiviljelyssä.

5 Arvioita ja havaintoja ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmien käytöstä

Edellä kuvatulla ponsiviljelymenetelmällä tuotettiin vuoden 1995 kokeissa kasvihuoneessa kasvatetulla Mahti-keväthevhnällä keskimäärin 71,8 alkiorakennetta sataa ponna kohden. Parhaimmillaan yhdeltä maljalta saatiin 176 alkiorakennetta. Versoja erilaistui keskimäärin 35,5 kappaletta sataa ponna kohden eli 49,4 % alkiorakenteista tuotti verson. Vihreitä versoja erilaistui keskimäärin 30,6 (86 % versoista) ja albiinoja versoja 4,9 (14 %) sataa ponna kohden. Vuonna 1994 viljeltiin pellolla kasvaneesta 18 erilaisesta syysvehnän F₃-sukupolven risteytysjälkeläistöstä yhteensä 18 000 ponna, joista saatiin 3080 alkiorakennetta ja 698 vihreää versoa. Vuonna 1995 kasvihuoneessa kasvatettu Mahti-keväthevhnä tuotti mikrosporiviljelyssä keskimäärin 65,3 alkiorakennetta ja 24,3 versoa sataa ponna kohden, eli 37 % alkiorakenteista tuotti versoja. Vihreitä versoja muodostui 8,3 (34 % kaikista versoista) ja albiinoja 16 kappaletta sataa ponna kohden. Seuraavassa on joitakin menetelmien käyttöön liittyviä havaintoja ja arvioita.

5.1 Mikrosporin kehitysvaihe ja emokasvien kasvatusolosuhteet

Kasvihuoneessa kasvaneista vehnistä aloitetut viljelmät tuottivat yleensä enemmän alkiorakenteita kuin pellolla kasvaneista

aloitetut viljelmät. Erityinen ponsi- ja mikrosporiviljelyyn liittyvä piirre näyttää olevan se, että keväällä ja syksyllä kasvihuoneella kasvaneista emokasveista saatiin yleensä parempi tulos kuin talvella tai kesällä kasvaneista emokasveista. Ilmeisesti kyseessä on luonnonvalon määrään ja laatuun sekä kasvulämpötilaan liittyvä ilmiö. Keväällä ja syksyllä kasvihuoneisiin tulee vielä riittävästi luonnonvaloa ja lämpötila on mahdollista pitää optimaalisena. Talvella kasvihuoneella ongelmana saattaa olla alhainen luonnon valon määrä ja lyhyt päivä, kun taas kesällä ongelmana saattaa olla liian korkea kasvatuslämpötila.

5.2 Kylmäesikäsittely ja tähkien sterilointi

Molemmilla viljelymenetelmillä kokeiltiin viljelyä myös ilman kylmäesikäsittelyä. Kylmäesikäsittely tuotti toistettavasti paremman vasteen kuin suora eristys, joten kylmäesikäsittelyä käytettiin säännöllisesti ennen ponsien tai mikrosporien eristystä. Jos versoja pidettiin kylmässä yli neljä viikkoa, ne alkoivat ränsistyä ja niihin ilmestyi herkästi hometta, joka lisäsi viljelmän saastumisriskiä. Kokeissa ei havaittu eroja 2 ja 4 viikon kylmäesikäsittelyjen välillä solukoviljelyvasteessa, mikä helpottaa menetelmän käyttöä suurissa aineistoissa.

Peltoaineistolla havaittiin kasvihuoneaineistoa enemmän viljelmien saastumista erityisesti mikrosporiviljelyssä. Tämä saattaa johtua saastumista aiheuttavien patogeenien suuremmasta määrästä pellolla kuin kasvihuoneella. Mikrosporiviljely saattaa olla ponsiviljelyä herkempi siksi, että tähkät ehtivät ulos lehtitupesta ennen keräystä. Suurempi saastumisen määrä saattaa johtua myös siitä, että patogeenit ovat edenneet solun sisälle, jolloin tavallinen pintasterilointi ei niihin tehoa. Steriloinnin tehon parantamiseksi sterilointiaikaa voi pidentää ja sterilointiliuosta väkevöittää samalla kuitenkin muistaen, että

nämä toimenpiteet saattavat heikentää mikrosporien menestymistä solukoviljelyssä.

5.3 Ponsien nypintä ja mikrosporien eristäminen

Yleensä suomalaisen vehnän tähkästä saadaan nypityksi noin 50–60 pontta. Tähkän keskiosassa sijaitsevat vanhimmat mikrosporit ja tähkän ylä- ja alaosissa on nuorempia mikrosporia. Ponnien pituutta voi pitää melko hyvänä mikrosporien kehitysvaiheen mittarina, joskin kasvatusolosuhteet saattavat aiheuttaa poikkeuksellisen kehitysrytmin, jolloin ponnien morfologian ja mikrosporin kehitysvaiheen yhteys voi poiketa normaalista.

5.4 Induktioalustat ja -olosuhteet

Raportissa kuvatut alustat osoittautuivat toimiviksi, mutta on olemassa lukuisia määriä muitakin alustoja, jotka voivat tuottaa saman tai paremman tuloksen. Kuivatusta ponsiviljelymenetelmässä kaksi tekijää, hiilihydraatti ja sterilointitapa, poikkeavat yleisesti käytössä olevista menetelmistä. Tulosten perusteella sakkaroosi toimii alustassa paremmin kuin maltoosi, jota yleisesti pidetään vehnällä suotuisimpana hiilihydraattina (Orshinsky et al. 1990, Zhou et al. 1991). Lisäksi käytetyssä menetelmässä W₁₄ -alusta autoklavoidaan, kun yleensä alusta steriloidaan suodattamalla (mm. Orshinsky et al. 1990). Hiilihydraatilla ja sterilointitavalla lienee yhteyttä, sillä maltoosi reagoi sakkaroosia herkemmin korkeisiin lämpötiloihin. Kuivatusta ponsiviljelymenetelmässä ei käytetä Ficollia, joka lisää nestemäisen alustan viskositeettiä, ja jolla on raportoitu olevan hyviä vaikutuksia ponsiviljelyvasteeseen (Zhou et al. 1991). Tässä tutkimuksessa Ficollin käyttö ei kuitenkaan parantanut menetelmän tehokkuutta.

5.5 Emien yhteisviljely

Mikrosporiviljelyssä embryogeneesi ei alkanut ilman emien yhteisviljelystä (Kuva 3e). Emien positiivisesta vaikutuksesta on raportoitu aiemmin vehnällä (Datta & Wenzel 1987, Mejza et al. 1993) ja ohralla (Köhler & Wenzel 1985). Emien yhteisviljelyn on todettu parantavan solukkoviljelyn onnistumista muutoin heikon vasteen antavissa genotyypeissä (Touraev et al. 1996, Hu & Kasha 1997) ja mahdollistavan usean erilaisen induktioalustan käytön (Puolimatka et al. 1996, Hu & Kasha 1997). Emien yhteisviljelyn positiivisen vaikutuksen syitä ei vielä tiedetä. Yksi jatkotutkimuksen aihe tulee olemaan juuri emien yhteisviljelymekanismin selvittäminen.

5.6 Erilaistuminen, spontaani kromosomiston kahdentuminen ja albinismi

Ponsi- ja erityisesti mikrosporiviljelyn keskeinen ongelma on alkiorakenteiden alhainen itämisaste, sillä vain noin puolet alkiorakenteista tuotti versoja. Menetelmien tehokkuus kaksoishaploidien tuottajina paransi olennaisesti, jos useampia alkiorakenteita saataisiin erilaistumaan versoiksi.

Havaintojemme mukaan ponsiviljelyssä noin 10 % ja mikrosporiviljelyssä noin 70 % versoista oli spontaaneja kaksoishaploideja (Puolimatka et al. 1996). Käytännössä nämä kasviyksilöt voidaan tunnistaa siitä, että ne yleensä erilaistuvat ensimmäisinä, kasvavat nopeammin kuin haploidit, verkkopurkeissa niistä tulee näkyviin vahvoja juurenkärkiä ja ne tuottavat yleensä vain muutamia (3–5) sivuversoja. Haploidit kasvit ovat kooltaan pienempiä kuin diploidit, ne muodostavat runsaasti siemeniä tuottamattomia sivuversoja ja hentoa hiusmaista juuristoa. Molemmissa menetelmissä havaittiin kasveja, jotka ilman kolkisiinikäsittelyä kasvattivat ensin

runsaasti steriilejä, haploideille tyypillisiä hentoja sivuversoja, minkä jälkeen saattoi kehittyä yksi siementä tuottava verso. Tämä osoittaisi, että alkuperäinen alkiorakenne saattoi olla kimeerinen ts. siinä oli sekä haploideja että diploideja solukoita.

Mikrosporiviljelyssä syntyi albiinoja huomattavasti enemmän kuin ponsiviljelyssä. Albinismi näyttäisi olevan vahvasti genotyypin määräämä ominaisuus, mutta olemme havainneet, että myös kasvatusolosuhteet vaikuttavat albiinoiden versojen määrään.

6 Yhteenveto

Suomalaisen syys- ja kevätvehnän jalostukseen on optimoitu ja kehitetty ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmät, jotka kuvataan tässä julkaisussa. Molemmat menetelmät perustuvat mikrosporien eli koiraspuolisten sukusolujen totipotenttiseen kykyyn muuntautua gametofyytin kehityksestä sporofyytin kehittymiseen. Ponsiviljelyssä heteen ponnet eristetään ravintoalustalle. Mikrosporiviljelyssä mikrosporit vapautetaan ponsien sisältä ja niitä viljellään sellaisenaan ravintoalustalla. Menetelmät lyhentävät jalostusaineiston tuottamiseen kuluva aikaa, sillä niiden avulla voidaan tuottaa perimältään yhtenäisiä kaksoishaploideja kasveja yhdessä sukupolvessa. Ponsiviljelymenetelmää on sovellettu pellolla kasvaviin syys- ja kevätvehnän jalostusaineistoihin vuodesta 1994 lähtien. Mikrosporiviljelymenetelmää on sovellettu vuodesta 1995 alkaen. Ponsiviljelymenetelmä on tuottanut alkiorakenteita ja kaksoishaploideja versoja siinä määrin, että sitä voidaan pitää toistettavuudeltaan potentiaalisena jalostusaineiston tuottomenetelmänä. Menetelmällä voidaan tuottaa kahdessa vuodessa risteytyksestä riittävästi siementä kentällä tapahtuvaa koeruututusta varten. Mikrosporiviljelymenetelmää on vielä kehitettävä menetelmän tehon parantamiseksi. Jalostusaineiston tuottamisen lisäksi ponsi-

ja mikrosporiviljelymenetelmiä voidaan soveltaa esimerkiksi *in vitro* -selektiossa, geeninsiirrossa ja kasvin embryogeneesin tutkimisessa. Jalostustutkimus voi hyödyntää kaksoishaplodeja geenikarttatutkimuksessa. Keskeisiä tulevien tutkimusten tavoit-

teita ovat alkiorakenteiden määrän lisääminen, alkioiden itävyyden parantaminen, albiinoiden versojen määrän vähentäminen ja mikrosporiviljelyssä vaikuttavan emien yhteisviljelyn toimintamekanismin selvittäminen.

Kirjallisuus

Clapham, D. 1971. *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung 65: 285–292.

Datta, S.K. & Wenzel, G. 1987. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. Plant Science 48: 49–54.

De Buyser, J., Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R. & Hespel, A. 1987. 'Florin': a doubled haploid wheat variety developed by anther culture method. Plant Breeding 98: 53–56.

Dunwell, J. 1996. Microspore culture. In: Jain, S.M., Sopory, S.K. & Veilleux, R.E. (eds.). *In Vitro Haploid Production In Higher Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1: 205–216. ISBN 0-7923-3577-5

Gustafson, V.D., Baenziger, P.S., Wright, M.S., Stroup, W.W. & Yen, Y. 1995. Isolated wheat microspore culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 207–213.

Hagberg, G. & Hagberg, A. 1981. Haploidy initiator gene in barley. In: Barley Genetics IV. Proceedings of the 4th International Barley Genetics Symposium, Edinburgh, 22-29 July 1981. Edinburgh: University Press. p. 686–689. ISBN 0950801607

Hu, D.F., Yuan, J.Y., Tang, Y.L. & Liu, J.P. 1985. Jinghua No. 1 - a winter wheat variety derived from pollen sporophyte. Scientia Sinica. Series B. 28: 733–745.

Hu, H. 1996. *In vitro* induced haploids in wheat. In: Jain, S.M., Sopory, S.K. & Veilleux, R.E. (eds.). *In Vitro Haploid Production In Higher Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 4: 73–97. ISBN 0-7923-3978-9

Hu, T. & Kasha, K. 1997. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.)

through ovary co-culture. Plant Cell Reports 16: 520–525.

Jia, X., Zhuang, J., Hu, S., Ye, C. & Nie, D. 1994. Establishment and application of the medium of anther culture of intergeneric hybrids of *Triticum aestivum* x *Triticum-Agrocyron*. Scientia Agricultura Sinica 27: 83–87.

Kasha, K.J. & Kao, K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) Nature 225: 874–876.

Köhler, F. & Wenzel, G. 1985. Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials to characterize the responsible factor. Journal of Plant Physiology 121: 181–191.

Mejza, S.J., Morgant, V., DiBona, D.E. & Wong, J.R. 1993. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. Plant Cell Reports 12: 149–153.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497.

Orshinsky, B.R., McGregor, L.J., Johnson, G.I.E., Hucl, P. & Kartha, K.K. 1990. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. Plant Cell Reports 9: 365–369.

Ouyang, J.W., Jia, S.G., Zhang, C., Chen, X.D. & Feng, G.H. 1988. A new synthetic medium (W14 medium) for wheat anther culture. Annual Report of the Institute of Genetics, Academia Sinica for 1987-1988. p. 91–92.

Pauk, J., Kertesz, Z., Beke, B., Bona, L., Csosz, M. & Matuz, J. 1995. New winter wheat variety: 'GK Delibab' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. Cereal Research Communications 23: 251–256.

- Pauk, J., Manninen, O., Mattila, I., Salo, Y. & Pulli, S.** 1991. Androgenesis in hexaploid wheat F₂ populations and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breeding* 107: 18–27.
- Pescitelli, S.M., Johnson, C.D. & Petolino, J.F.** 1990. Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant Cell Reports* 8: 628–631.
- Puolimatka, M., Laine, S. & Pauk, J.** 1996. Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat. *Cereal Research Communications* 24: 393–400.
- , **Laine, S. & Pauk, J.** 1997. Vehnän mikrosporiviljely: vahvuudet ja heikkoudet. In: Immonen, S. (ed.). *Solusta tuottavaan kasviin. Hyötykasvien solukkoviljelyseminaari. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 18.* Jokioinen: Maatalouden tutkimuskeskus. p. 113–121. ISSN 1238-9935, ISBN 951-729-497-2.
- , **Pauk, J., Juuti, T., Hömmö, L. & Pulli, S.** 1995. Efficient wheat anther culture system for improving winter hardiness and yield potential. In: Tigersted, P. M. A. (ed.). *Adaptation in Plant Breeding. XIV Eucarpia Congress, Jyväskylä July 31 – August 4.* Jyväskylä: University of Jyväskylä. p. 67. ISBN 951-34-0570-2.
- Reynolds, T.L.** 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 33: 1–10.
- San-Noeum, L.H.** 1976. Haploides d'Hordeum vulgare L. par culture *in vitro* d'ovaires non fecondes. *Annales de l'Amelioration des Plantes* 26: 751–754.
- Shivanna, K. R., Cresti, M. & Ciampolini, F.** 1997. Pollen development and pollen-pistil interaction. In: Shivanna, K.R. & Sawhney, V.K. (eds.). *Pollen biotechnology for crop production and improvement.* Cambridge: Cambridge University Press. p. 15–39. ISBN 0-521-47180-X.
- Snape, J.W.** 1989. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. In: Mujeeb-Kazi, A. & Sitch, L.A. (eds.) *Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-1988: 2nd International Symposium on Genetic Manipulation in Crops, Mexico, D.F., Mexico, and Manila, Philippines: CIMMYT and IRRI.* p. 19-30. ISBN 968-6127-34-8.
- Touraev, A., Indriato, 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.
- , **Vicente, O. & Heberle-Bors, E.** 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* 2: 297–302.
- Wang, X. & Hu, H.** 1984. The effect of potato II medium for triticales anther culture. *Plant Science Letter* 36: 237–239.
- Zhou, H., Zheng, Y. & Konzak, C.F.** 1991. Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Reports* 10: 63–66.





Julkaisun sarja ja numero
Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja.
Sarja B 13

Julkaisuaika (kk ja vuosi)
Huhtikuu 1998

Tekijä(t)
Matti Puolimatka ja
Janos Pauk

Tutkimushankkeen nimi

Toimeksiantaja(t)
Maatalouden tutkimuskeskus

Nimike
Vehnän ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmät

Tiivistelmä

Tässä raportissa kuvataan vehnän ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmät, jotka soveltuvat suomalaisen vehnänjalostuksen apuvälineiksi. Menetelmien avulla voidaan tuottaa kaksoishaploideja kasveja, jotka nopeuttavat ja tehostavat lajikkeen jalostusta. Ponsiviljelymenetelmässä heteen ponnit eristetään emokasvien tähkistä ravintoalustalle, jolloin ponsien sisältämät mikrosporit kehittyvät ensin alkion kaltaisiksi rakenteiksi ja edelleen kokonaisiksi versoiksi. Mikrosporiviljelymenetelmässä mikrosporit vapautetaan veitsihomogenisaattorin avulla ponnin sisältä ja niitä viljellään sellaisenaan ravintoalustalla. Mikrosporit kehittyvät ponsiviljelyn tapaan alkionkaltaisiksi rakenteiksi. Molempien menetelmien toimivuus on testattu syys- ja kevätvehnän jalostusaineistoissa, ja niiden avulla pystytään tuottamaan parin vuoden sisällä risteytyksestä riittävästi aineistoa testattavaksi kentällä muuttaman neliömetrin koeruudulla. Raportissa kuvataan menetelmät yksityiskohtaisesti ja tarkastellaan niiden toimivuuteen vaikuttavia tekijöitä.

Avainsanat: androgeneesi, embryogeneesi, haploidi, jalostus, kaksoishaploidi, mikrospori, mikrosporiviljely, ponsiviljely, *Triticum aestivum* L., vehnä

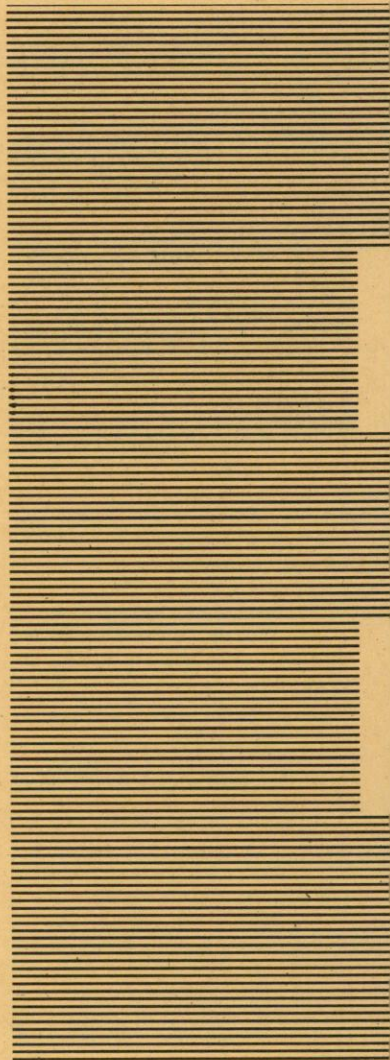
Toimintayksikkö
Kasvintuotannon tutkimus, Peltokasvit ja maaperä, 31600 Jokioinen

ISSN ISBN
1238-9943 951-729-510-3

Tuloksia voi soveltaa luomuviljelyssä

Sivuja
21 s.

Hinta



Vammalan Kirjapaino Oy 1998
ISBN 951-729-510-3
ISSN 1238-9943