

Sytokiniinioksidaasigeenin yliekspression vaikutus lituruohon juuren jälsisolukon sekundääriseen kasvuun ja Dof-geeniperheen ekspression karakterisointi

Opinnäytetyö

Viivi Lindholm 1300340
Metropolia Ammattikorkeakoulu
Vanha viertotie 23
Bioanalyytikko (AMK), SB13K1
Opinnäytetyön raportti
11.4.2016
Ohjaava opettaja: Hannele Pihlaja

<p>Tekijä(t) Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Viivi Lindholm Sytokiniinioksidaasigeenin yliekspression vaikutus lituruohon juuren jälsisolukon sekundääriseen kasvuun ja Dof-geeniperheen ekspression karakterisointi</p> <p>57 sivua + 6 liitettä 12.4.2016</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Bioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Bioanalytiikan koulutusohjelma</p>
<p>Suuntautumisvaihtoehto</p>	<p>Bioanalytiikka</p>
<p>Ohjaaja(t)</p>	<p>Lehtori Hannele Pihlaja Vastuututkija Ari Pekka Mähönen Kasvibiologi Tiina Blomster Tohtoriopiskelija Riikka Mäkilä</p>
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli karakterisoida Dof-mutanttilinjojen geeniekspressiota, sekä selvittää estradiolilla indusoitavan sytokiniinioksidaasigeenin yliekspression vaikutusta kasvin fenotyyppiin ja löytää saatujen tietojen avulla lupaavat linjat jatkotutkimuksia varten.</p> <p>Sytokiniinioksidaasigeenin yliekspressiolinjojen CKX30 ja CKX32 analysoiminen perustuu T-DNA-insertion avulla tehtävään mutaatioon, jossa estradioli-indusointi saa aikaan sytokiniinia hajottavan proteiinin liikatuotannon. Sytokiniini on tärkeä osatekijä juurten sekundääriseissä kasvussa. Mutaation vaikutuksia lituruohon fenotyyppiin arvioitiin tarkkailemalla RFP-ekspression voimakkuutta ja sijaintia juuressa, sekä vertailemalla estradioli-indusoitujen mutanttilinjojen juurten sekundääristä kasvua DMSO-kontrollimaljalla kasvaneiden saman mutanttilinjan edustajien, sekä villityypin (Columbia) linjojen kehitykseen.</p> <p>Dof1-, Dof2- ja Dof3-mutanttilinjat tuotettiin laboratoriossa kasvattamalla transgeeniset bakteerikannat, jotka transformoitiin villityypin kasveihin. T-DNA-insertiovektorin transformaatiossa käytettiin floral dip –menetelmää. Geenin ekspressioalueita pyrittiin karakterisoimaan RFP- ja GUS-merkkigeenien avulla.</p> <p>Keskeisinä tuloksina homotsygooteista CKX-linjoista löytyi 4 tilastollisesti merkitsevää linjaa, joissa esiintyy mahdollinen sekundääriseen kasvuun vaikuttava fenotyyppi. Suurin ero villityypin ja ohuimman mutanttilinjan (CKX32 9-5) välillä oli – 269 µm, ja estradioli- ja DMSO-maljoilla kasvatettujen saman mutanttilinjan edustajien välillä oli -220 µm. Saatujen tietojen avulla voidaan karsia useita tutkittavia mutanttilinjoja pienestä otoksesta huolimatta.</p> <p>Dof1- ja Dof2-linjojen GUS-ekspressio sijoittui parenkyymisoluksoon koko juuren pituudelta, kun Dof3-linjassa ekspressio näkyi kaikkialla solukossa, mutta vain vanhimmissa juurten osissa.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>CKX, Dof, T-DNA-insertio, GUS, lituruoho, jälsi</p>

Author(s) Title	Viivi Lindholm The effects of cytokinin oxidase gene over-expression in the secondary growth of root cambium in <i>Arabidopsis thaliana</i> and characterising the expression of Dof-gene family
Number of Pages Date	57 pages + 6 appendices 12.4.2016
Degree	Bachelor of Health Care
Degree programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Hannele Pihlaja, Principal Lecturer Ari Pekka Mähönen, Research Group Leader Tiina Blomster, Plant Biologist Riikka Mäkilä, PhD Student
<p>The aim of this thesis was to characterise the location of Dof gene expression in the roots of <i>Arabidopsis thaliana</i> mutant lines, and analyse how over-expression of estradiol induced cytokinin oxidase gene effects to root phenotype.</p> <p>In cytokinin oxidase over-expression lines CKX30 and CKX32 a T-DNA-insertion causes a gene mutation that leads to overproduction of cytokinin disruptive protein when exposed to estradiol. Cytokinin is an important operator in the secondary growth of the root. The conclusions were made by observing the location and intensiveness of RFP-expression and comparing the secondary growth of induced mutant lines to non-induced identical mutant lines and wild type plants. The thickness of the root were measured from cross sections taken 0.5 cm below hypocotyl.</p> <p>Dof1, Dof2 and Dof3 lines were produced in laboratory by growing transgenic bacterial strains containing T-DNA-insertion vector and transforming them to wild type plants using floral dip method. The location of gene expression could be visualized by using RFP and GUS marker genes.</p> <p>As the mainline results were found 4 statistically significant mutant lines, which possibly had phenotype modifications having an impact to secondary growth of the root. The biggest difference between the most tenuous estradiol induced plants compared to DMSO and wild type controls were shown in line CKX32 9-5. In this line the width of the estradiol induced roots were $-269\ \mu\text{m}$ in comparison to DMSO controls and $-220\ \mu\text{m}$ in comparison to wild type. The purpose of this study was to help narrow down the amount of cambium mutant gene plant lines, and help for further research.</p> <p>GUS expression in Dof1 and Dof2 lines were located in parenchyma cells. In Dof3 line, GUS expression appeared only in the developmentally older parts of the root, but didn't seem to be specific to any cell type.</p>	
Key terms	CKX, Dof, T-DNA-insertion, GUS, <i>Arabidopsis thaliana</i> , cambium

Sisällys

1	Johdanto	1
1.1	Työn tavoite	1
1.2	Työn tarkoitus	1
2	Tutkimuksen taustaa	2
2.1	Periytyksen lajit	3
2.2	Siirtogeenit	4
2.3	Kasvin perusanatomia ja juuren rakenne	6
2.3.1	Juuren rakenne ja tehtävät	6
2.3.2	Juuren kasvuun vaikuttavat tekijät	9
2.3.3	Geenien aktivoiminen indusoitavan osan avulla	10
2.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3	Menetelmät	12
3.1	Transformaatio	12
3.1.1	Thermo Fisher Scientific MultiSite Gateway 3-Fragment recombination reaction	12
3.1.2	Digestio	14
3.1.3	Konstruktien transformointi agrobakteereihin	15
3.1.4	Floral dip –menetelmä	16
3.2	Kasvien steriiliviljely	17
3.2.1	Sterilointi	17
3.2.2	Idätys eli germinaatio	18
3.2.3	Indusointi estradiolilla	19
3.3	Genotyypitys	19
3.3.1	Genotyypitys PCR:n avulla	20
3.3.2	DNA:n eristysmenetelmät	22
3.4	Segregaatio	22
3.5	Histologinen leike	24
3.5.1	Juurien leikkaus	24
3.5.2	GUS-värjäys	24
3.5.3	Fiksointi ja kudosprosessointi	25
3.5.4	Näytteen valaminen muotteihin	26
3.5.5	Leikkeiden teko, jälkivärjäys ja leikkeiden tarkastelu	28
4	Toteutus	29

4.1	Dof-geeniperhe	29
4.2	Sytokiniinioksidaasigeenin yliekspressiolinjat	33
5	Tulokset	35
5.1	Dof-linjat	35
5.1.1	Fluoresenssi	35
5.1.2	GUS-ekspressio	36
5.2	Estradioli-indusoidut sytokiniinioksidaasigeenin yliekspressiolinjat	40
5.2.1	Fluoresenssi	40
5.2.2	Kasvu	42
6	Johtopäätökset ja pohdinta	47
6.1	Dof-linjat	47
6.2	Estradioli-indusoidut sytokiniinioksidaasigeenin yliekspressiolinjat	48
6.3	Luotettavuus	50
6.4	Ammatillinen kehittyminen	51
6.5	Etiikka	52
6.6	Opinnäytetyön merkitys työelämässä	53
	Lähteet	54

Liite 1. T2-selektio CKX30

Liite 2. T2-selektio CKX32

Liite 3. T3-selektio CKX30

Liite 4. T3-selektio CKX32

Liite 5. Juurten pituudet CKX30 ja CKX32

Liite 6. Juurten paksuudet CKX30 ja CKX32

1 Johdanto

1.1 Työn tavoite

Fossiilisten polttoaineiden korvaaminen kestävästä kehitystä tukevilla vaihtoehdoilla on maailmanlaajuinen ongelma, johon on esitetty ratkaisuksi biomassan käyttöä. Tutkimuksen päätavoitteena on selvittää, millä tekijöillä saadaan kasvit tuottamaan tehokkaammin biomassaa, jotta se voisi vastata kasvavan väestön energiatarpeisiin (Mähönen 2006.)

Kasvin biomassan tuotossa tärkeä tekijä on puuainees, jota muodostuu putkilokasvien jälsiosissa tapahtuvan aktiivisen solunjakautumisen seurauksena. Jälsi siis aikaansaa kasvin sekundääriseen paksuuskasvun tuottamalla nilaa ulospäin ja puumassa sisäpuolelle. Jälleen kasvuun vaikuttavat mekanismit kuitenkin tunnetaan vielä huonosti. Lituruohon ja puiden sekundäärikasvu on siinä määrin verrannollista, että tutkimusryhmä voi tutkia näitä mekanismeja lituruohojen avulla ja mallintaa saatuja tuloksia muihin, biomassan tuotannossa merkityksellisempiin kasvilajeihin (Helariutta 2002; Welling 2008; Tirri – Lehtonen – Lemmetyinen – Pihakaski – Portin 2001; Fagerstedt – Pellinen – Saranpää – Timonen 2005; Suomen luontotieto 2006.) Lituruoholla jälsisolukkoa muodostuu sekä varteen että juureen, jolloin jo hyvin nuorien kasvien juurista voidaan ottaa näytteitä poikkileikkeitä varten (Blomster – Mähönen 2013.)

Opinnäytetyö tehdään osana isompaa tutkimusprojektia, jossa on tarkoituksena selvittää kasvihormoni sytokiniinin vaikutusta lituruohon, eli *Arabidopsis thalianan* jälleen kasvuun käyttäen esimerkiksi T-DNA-insertiomenetelmän avulla luotuja mutanttikasveja. Tutkimus suoritetaan Ari Pekka Mähösen johtamassa tutkimusryhmässä Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa Viikissä. Päämääränä on edistää kasvien geenien toiminnan perustutkimusta. Kasvibiologi Tiina Blomster ja tohtoriopiskelija Riikka Mäkilä toimivat käytännön ohjaajina työelämässä opinnäytetyön prosessissa.

1.2 Työn tarkoitus

Ensimmäinen projekti liittyy indusoitavan sytokiniinioksideasigeenin yliekspressioon ja sen vaikutuksiin sekundääriseen kasvuun. Normaalilla ½GM-kasvualustalla kasvatettaessa nämä siirtogeeniset lituruohot eivät fenotyypiltään poikkea villityyppiä edustavasta Columbiasta, mutta estradiolilla indusoidessa geeni aktivoituu ja aiheuttaa muutoksia fenotyyppiin. Tarkoituksena on tehdä T2- ja T3-selektiot aiemmin tuotetuille siemenille ja valita lopulta jatkotutkimuksia varten ne linjat, joissa geeniekspressio oli selkein ja joiden fenotyyppi poikkeaa eniten villityypistä. Ekspressiota tarkastellaan punaista fluoresenssia aiheuttavan RFP-merkkigeenin avulla, sekä vertailemalla indusoidujen linjojen pituuksia ja paksuuksia kontrollimaljoilla kasvaneisiin samojen linjojen edustajiin ja villityypin edustajaan.

Toinen projekti suoritetaan Dof-linjojen parissa. Sitä varten valmistetaan siirtogeenin sisältäviä agrobakteereja (*Agrobacterium tumefaciens*) monivaiheisen protokollan kautta, minkä jälkeen geeni transformoidaan Columbia-lituruohoihin. Saaduille siirtogeenisille siemenille tehdään T1-selektion ja tarkastellaan geenin ekspressoitumista juuressa GUS-värjäyksen ja RFP-merkkigeenin avulla.

Tutkimuksen taustalla on siis kaksi pääkysymystä:

1. Miten estradioli-indusoidavan sytokiniinioksideasigeenin yliekspressio vaikuttaa juuren sekundääriseen kasvuun ja löytyykö otoksesta sopivia linjoja jatkotutkimuksiin?
2. Missä juuren osassa tutkitut Dof-perheen geenit ekspressoituvat?

Opinnäytetyö suoritetaan määrällisin menetelmin kokeellisena tutkimuksena. Koska tutkimus on vielä kesken, käytetään tässä työssä geeneistä koodinimiä- ja numeroita spesifin geenin nimen sijaan. Lähtökohtana on eri tutkimusryhmien tähän mennessä luoma teoriapohja ja tutkimuksissa toimiviksi todetut menetelmät.

2 Tutkimuksen taustaa

Kasvit eivät voi vaikuttaa kasvupaikkansa olosuhteisiin, joten niiden on menestyäkseen kyettävä sopeutumaan vallitseviin ympäristöoloihin. Kasveilla on kuitenkin lukuisia eri tapoja, joilla vältellään abioottisen ja bioottisen ympäristön aiheuttamia stressitekijöitä (Cullis 2004). Luonnonvalinta vaikuttaa siten, että kasvupaikalla menestyvät ja

lisääntyvät sellaiset yksilöt, jotka kulloinkin tulevat parhaiten toimeen ja joiden ominaisuudet parhaiten palvelevat tarkoitustaan senhetkisissä oloissa. Jokin kelpoisuutta lisäävä geeni siis yleistyy ja vastaavasti heikentävät geenit harvenevat populaatiossa. Perimän vaihtelu näkyy esimerkiksi kasvussa ja taudinkestävyudessa (Nuorteva 2005.)

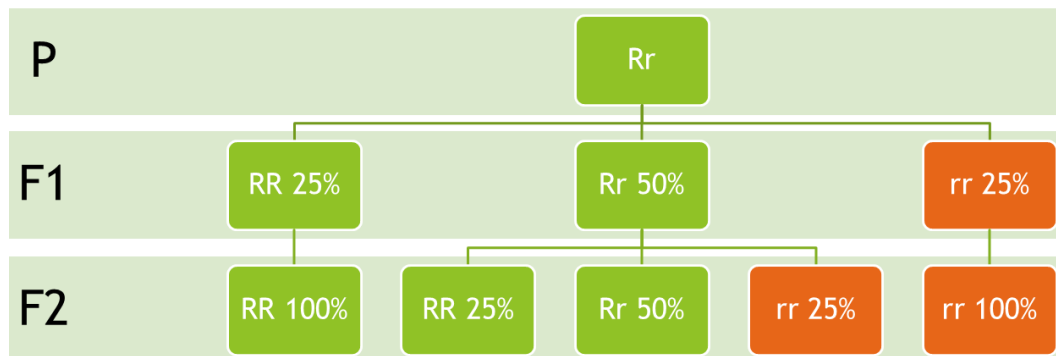
2.1 Periytymisen lait

Geenin paikkaa kromosomissa sanotaan lokukseksi, ja saman lokuksen vastingeenit määräävät ominaisuuden ilmenemisen jälkeläisessä. Geeneistä on olemassa useampia tyyppisiä, eli alleeleja. Lituruohon kromosomisto on kaksinkertainen eli diploidinen, jolloin se saa samaan lokukseen sijoittuvasta geenistä aina kaksi alleeliä. Alleelit voivat olla dominoivia tai resessiivisiä, minkä lisäksi yhteisvallitseva tai välimuotoinen eli intermediaarinen periytyminen on mahdollista. Kahdessa viimeksi mainitussa tapauksessa kumpikaan alleeli ei dominoi toista (Happonen ym. 2004.)

Kun jokin ominaisuus periytyy dominoivasti, vallitsevan alleelin koodittama ominaisuus ekspressoituu eliön fenotyypissä, mutta resessiivisen eli väistyvän alleelin ominaisuus jää vain genotyyppiin ilman, että se vaikuttaa yksilön ulkoisiin ominaisuuksiin. Tällöin yksilöllä on siis genotyypissään molemmat alleelit ja se on ominaisuuden suhteen heterotsygootti, mutta vain dominoiva alleeli vaikuttaa fenotyyppiin. Yhteisvallitsevassa periytymisessä molemmat alleelit vaikuttavat fenotyyppiin itsenäisesti, mikä näkyy esimerkiksi ihmisellä AB-veriryhmänä. Intermediaarisessa periytymisessä molemmat alleelit vaikuttavat fenotyyppiin siten, että yksilö on ilmiänsuhteen alleelien aikaansaamien ominaisuuksien välimuoto (Happonen ym. 2004.)

Yksilöiden genotyyppiä voidaan määrittää risteytysten avulla. Mendelin erkanemissäännön mukaan tiettyä ominaisuutta koodaava alleelipari erkanee sukusolujen muodostuessa, jolloin sukusoluun tulee näistä vain yksi. Kahden sukusolun yhtyessä uuteen siemeneen tulee siis molemmilta sukusoluilta yksi alleeli, jotka muodostavat uudenlaisen yhdistelmän. Tutkimuksissa käytettävän antibioottiresistenssin aiheuttava alleeli on dominoiva, jolloin resistenssin suhteen homotsygootit ja heterotsygootit siemenet itävät antibioottialustalla, mutta herkkyden suhteen homotsygootit eivät. Kasveja jää siis henkiin lukusuhteessa 3:1 ja erilaisia linjoja kaikkiaan on syntynyt lukusuhteessa 1:2:1 (Happonen ym. 2007.) Kun näiden kasvien

annetaan itsepölyttyä ja siemenet laitetaan jälleen antibioottialustalle, saadaan selville kasvin fenotyypin lisäksi genotyyppi ja joukosta voidaan seuloa tutkimuksiin homotsygotit linjat. Resistenssin suhteen homotsygootin linjan kaikki siemenet itävät, mutta heterotsygooteilla linjoilla kasvit itävät suhteessa 3:1. Näin kaikista linjoista homotsygootteja ja heterotsygootteja on lukusuhteessa 1:2 (kuvio 1).



Kuvio 1. Taulukossa on esitetty antibioottiresistenssin mendelistinen periytyminen. Isolla R-kirjaimella merkitään alleelia, joka aiheuttaa antibioottiresistenssin, kun taas pieni r-kirjaimella merkitään antibioottiherkkyden aiheuttamaa alleelia.

2.2 Siirtogeenit

Geeninsiirto mahdollistaa geenien ja niiden koodaamien proteiinien tutkimuksen vieraassa lajissa, sekä uusien ominaisuuksien siirtämisen yli lajirajojen. Haluttuja geenejä on helpointa siirtää kuljettimien eli vektoreiden avulla, jotka useimmiten ovat bakteerien tai joissain tapauksissa yksinkertaisten aitotumaisten, kuten hiivojen tai homeiden DNA:ta sisältäviä, pienikokoisia rengasmaisia plasmideja. Plasmidi on sikäli käyttökelpoinen geeninsiirtoväline, että se jakautuu itsenäisesti solulimassa ja on katkaistavissa ja suljettavissa uudelleen renkaaksi ennustettavalla tavalla. Käytetyssä plasmidissa on oltava jokin selektiogeeni, jonka avulla voidaan erotella esimerkiksi antibioottialustalla siirtogeenin sisältävät bakteerikannat. Tämän lisäksi plasmidiin tarvitaan Ori-alue, eli plasmidin replikaation aloituskohta, sekä tunnistuskohta restriktioentsyymeille. Tähän tunnistuskohtaan liitetään siirrettävä geeni, jossa täytyy olla varsinaisen koodittavan alueen lisäksi promoottorialue ja lopetuskohta, tai esimerkiksi fluoresenssia aiheuttava merkkigeeni (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2013.)

Bakteereja käytetään yleisesti halutun geenin tai proteiinin monistamiseen ja tutkimiseen, sillä sopivissa olosuhteissa bakteerikanta lisääntyy nopeasti ja edullisesti. Jokaisessa solunjakautumisessa siirretty geeni kahdentuu, jolloin bakteerien lisääntyessä saadaan helposti moninkertainen määrä klooneja. Kaksisirkkaisiin kasveihin voidaan siirtää vierasta alkuperää olevaa DNA-juostetta agrobakteerien Ti-plasmidien avulla. Kasvi infektoidaan agrobakteerilla, jonka plasmidiin on siirretty haluttu tutkittava geeni. Tällöin plasmidin T-DNA integroituu kasvin genomiin, ja tutkittava geeni siirtyy osaksi kasvin genomia (Happonen ym. 2006.)

Haluttaessa tutkia tietyn geenin vaikutusta kasvin kasvuun ja kehitykseen on usein helpointa käyttää DNA-insertiomenetelmää, joka on eniten käytössä oleva menetelmän muoto. T-DNA-insertioita voidaan soveltaa kaikkiin transformoitaviin kasveihin. T-DNA-insertion avulla saadaan aikaan lituruohon genomiin mutaatio, joka aiheuttaa tutkittavan geenin normaalin ekspression tai yliekspression. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että vektorin avulla saadaan siirrettyä uusi geeni-insertti, joka aiheuttaa tutkimuksen kohteena olevan geenin toiminnan ja sen koodittaman proteiinisynteesin tapahtumisen kasvissa (kuvio 2) (Cullis 2004.) Tutkimusprojektissa tarkastellaan, kuinka tämä mutaatio vaikuttaa kasvin fenotyypin ja eroaako se villityypin fenotyypistä.



Kuvio 2. Esimerkki T-DNA-insertion työvaiheista (Cullis 2004.)

Siirtovektoriin voidaan usein lisätä varsinaisen geenin ja sen promoottorin ja terminaattorin lisäksi fluoresenssia aiheuttava reportterigeeni. Mielenkiinnon kohteena

olevan geenin tuote on yhdistetty fluoresoivaan proteiiniin, jolloin fluoresenssin avulla geenin toimintaa voidaan visualisoida (Siligato ym. 2016.) Käytössä on lukuisia eri värejä tuottavia fluoresoivia proteiineja, joilla voidaan tarkkailla geeniaktivaatiota (Stepanenko ym. 2011). Yksi käytetyistä ryhmistä on RFP (Red Fluorecent Protein), joka on eristetty korallieläimistä. Se emittoi punaisen eri sävyjä, jolloin geeniekspressio voidaan havaita punaisena fluoresenssina mikroskoopissa käytettäessä sopivaa suodinta (Miyawaki – Shcherbakova – Verkhusha 2012).

2.3 Kasvin perusanatomia ja juuren rakenne

Lituruoho kuuluu koppisiemenisten ryhmään ja kaksisirkkaisten luokkaan, eli niillä kehittyy itämisvaiheessa yleensä kaksi sirkkalehteä, toisin kuin yksisirkkaisille, joille kehittyy vain yksi alkeislehti. Kaksisirkkaiset myös kasvattavat itäessään yhden suuremman pysyvän primäärijuuren, joka yksisirkkaisilla surkastuu ja korvautuu sivujuurilla. Kukassa on tavallisesti viisi terälehteä, harvoin myös neljä tai vähemmän (Magnoliopsida – Dicots. 2015.)

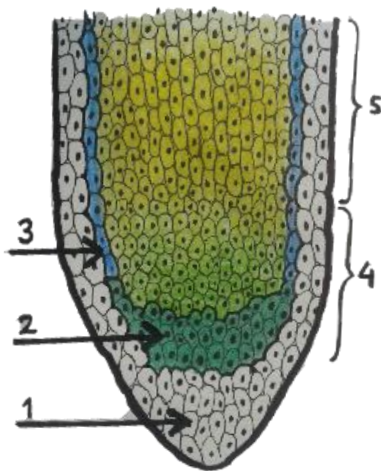
Kaksisirkkaisille kasveille tyypillistä on, että varren johtosolukon muodostamat johtojänteet sijoittuvat kehämäisesti varren reunalle, kun taas yksisirkkaisilla ne ovat satunnaisesti jakautuneet varteen. Johtojänteeseen muodostuu kerros jälsisolukkoa, jonka solunjakautumisen seurauksena kasvin varren ulkoreunoja kohti kasvaa nilaa ja sisäosia kohti puusolukkoa. Tämä saa myös aikaan kasvin varren ja juuren sekundäärisen kasvun (Fagerstedt ym. 2004). Kasvin tukena toimii ligniiniä ja selluloosaa sisältävä puusolukko, jota pitkin juurten maaperästä ottamat vesi ja ravinteet kulkevat ylöspäin kohti muita kasvinosia (Blomster, Mähönen 2013). Lehdissä fotosynteesin tuotteena syntynyt glukoosi taas kuljetetaan nilaosan siiviläputkia pitkin kohti juuria (Happonen ym. 2004; Magnoliopsida – Dicots. 2015.) Johtosolukossa myös kulkee erilaisia signaalimolekyylejä (Blomster – Mähönen 2013).

2.3.1 Juuren rakenne ja tehtävät

Kaksisirkkaisten primäärijuuri kiinnittää kasvin tukevasti maahan. Siihen kasvaa runsaasti ohuempia sivujuuria, joiden tehtäviin kuuluu ravinteiden ja veden ottaminen kasvualustasta ja niiden kuljettaminen johtosolukkoa pitkin kasvin käyttöön. Mitä

laajemmalle juuri leviää ja mitä nopeammin se kasvaa veden luo, sitä paremmin se saa vettä ja ravinteita kasvuunsa (Kasvien osat 2015.) Joillain kasveilla juuri toimii edellä mainittujen tehtäviensä lisäksi energiavarastona (Salonen 2006). Juurilla on myös tärkeä tehtävä kommunikaatiossa maaperän mikrobiston kanssa, jonka tarpeisiin ne erittävät hiiliyhdisteitä (Bais – Park – Weir – Callaway – Vivanco 2004.)

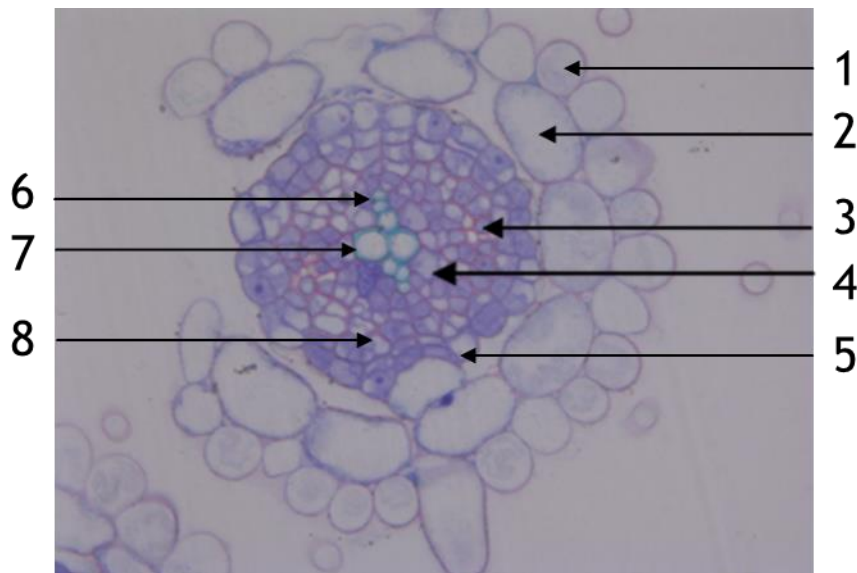
Juurten kärkeä ympäröi ohut, parenkyymisolukosta muodostunut juurihuntu, joka juuren kasvaessa auttaa läpäisemään maaperän raiiloja. Heti juurihunnun solukon jälkeen aivan kärkiosista alkaa solujen jakautumisvyöhyke. Siihen kuuluu niin sanottu kärkimeristeemisolukko, sekä sen johdannaismeristeemit. Solut ovat vilkkaasti jakautuvia kantasoluja ja niiden tytärsoluja, jotka aikaansaavat pituuskasvua ja rakentavat juurihuntua. Primääriseksi kasvuksi sanotaan juuri tämän kärkikasvusolukon jakautumista (Fagerstedt ym. 2004). Jakautumisvyöhyke loppuu pitenemisvyöhykkeeseen, jossa solut eivät enää jakaudu, vaan jatkavat pituuskasvuaan (kuvio 3) (Blomster – Mähönen 2013; Kasvianatomia 2006.)



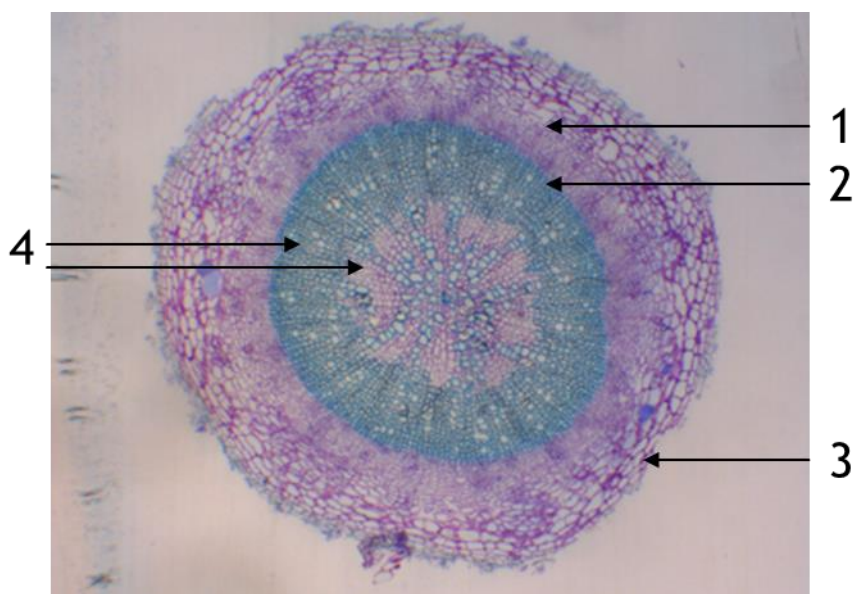
Kuvio 3. Pitkittäiskuva juuresta. 1. Juurihuntu, 2. Kärkimeristeemi, 3. Epidermi, 4. Jakautumisvyöhyke, 5. Pitenemisvyöhyke.

Kun juuren kerroksia tarkastellaan poikittain, voidaan uloimpana kerroksena nähdä epidermisolukkoa. Se on pääosin yhden solukerroksen paksuinen pintasolukko. Ravinteiden ja veden saantia lisäävät juurikarvat ovat yksittäisiä laajentuneita epidermisoluja. Heti epidermin alla on parenkyymisolusta muodostunut kuori, ja kuoren sisintä kerrosta nimitetään endodermiksi. Endodermi rajaa kuoren keskuslieriöstä, jonka

uloimpana kerroksena on tarvittaessa jakautumiskykyiseksi eli meristemaattiseksi muuttuva perisykli. Sivujuuret saavat alkunsa näistä perisyklin soluista. Keskuslieriössä on kasvin johtosolukko, joka koostuu puu- ja nilaosasta. Näiden välissä on jälsisolukkoa, joka siis muodostaa kohti ulompia kuoriosia nilaa, ja sisempään osaan puuainesta eli ksyleemiä (kuvio 4 ja 5) (Kasvianatomia 2006; Nieminen – Kauppinen – Helariutta 2004.)



Kuvio 4. Juuren poikkileike yhdeksän vuorokauden ikäisestä, sekundäärisen kasvun aloittaneesta villityyppiä edustavasta kasvista. Leike on otettu 0,5 cm etäisyydeltä hypokotyylialueesta. 1. Epidermi, 2. Kuori, 3. Primäärinen nila, 4. Jälsisolukko primäärisen puun ja nilan solujen välissä, 5. Endodermi, 6. Primäärinen puu, 7. Sekundäärinen puu, putkilosolu, 8. Perisykli



Kuvio 5. Juuren poikkileike kuuden viikon ikäisestä kasvusta. 1. Sekundäärinen nila, 2. Jälsisolukko, 3. Peridermi, 4. Sekundäärinen puu: violetiksi värjäytyvä osa sekundäärisestä puusolukosta on erikoistumattomampaa parenkyymaa, sininen paksuseinäistä erikoistuneempaa sekundäärisen kasvun toisen vaiheen solukkoa. Toisen vaiheen solukko muodostuu vasta gibberelliinin vaikutuksesta kasvin kukkiessa.

2.3.2 Juuren kasvuun vaikuttavat tekijät

Kasvien yksilönkehitykseen vaikuttaa ulkoisina kasvutekijöinä veden, ravinteiden ja valon määrä. Näiden ohella kasvua kontrolloivat sisäiset kasvutekijät, joita ovat kasvihormonit eli fytohormonit. Ne ovat kasvin eri osissa syntyviä, veden mukana kasvin eri osiin leviäviä orgaanisia yhdistettä. (Happonen ym. 2006). Hormonit jaotellaan ryhmiin koostumuksensa ja vaikutustensa mukaan. Ne voivat vaikuttaa solunjakautumiseen ja erikoistumiseen, pituus- ja paksuuskasvuun, sekä lehtien, kukkien ja siementen kehittymiseen (Salonen 2006.)

Sytokiniinia erittyy juuressa ja muissa kasvavissa solukoissa, ja sen tehtävänä on kiihdyttää solunjakautumista, sekä edistää itämistä. Sytokiniinia pidetään jällen toiminnan edellytyksenä, sillä johtosolukko ei muodosta soluja normaalisti, mikäli sytokiniinisignointi on häiriintynyt (Matsumoto-Kitano ym. 2008). Sillä epäillään olevan osallisuutta yhteyttämistuotteiden kulkeutumisessa eri kasvinosiin (Voesnek – Blom 1996). Joissain kasvin soluissa auksiini ja sytokiniini inhiboivat toisiaan, mutta toisaalta esimerkiksi jälsisolukossa vahvistavat toisiaan ja signaloivat keskenään kasvin rakenteen muodostumisen aikana (Bishopp ym. 2011; Blomster – Mähönen 2013).

Auksiini vaikuttaa juuren ja varren solujen pituuskasvuun (Happonen ym. 2005). Sitä syntyy kasvupisteissä sekä varsissa että juurissa, ja vaikuttavat siten kaikissa kasvin osissa. Gibberelliinit käynnistävät siemenissä itämisvaiheessa tärkkelyksen pilkkoutumisen ja käynnistävät amylaasin tuotannon (Happonen ym. 2006). Ne säätelevät auksiinien ohella pituuskasvua ja edistävät juurten muodostumista (Salonen 2006.)

Jälsisolukkoa tutkittaessa pyritään selvittämään eri geenien vaikutuksia kasvien kehityksessä. Nämä kustakin solulinjasta löytyvät merkkigeenit vaikuttavat siihen, kuinka meristeemisolukko erilaistuu eri solulinjoiksi. Kullekin solulinjalle spesifien geenien avulla voidaan seuloa haluttuja soluja ja tutkia kaikille solulinjoille yhteisten geenien lisäksi

muuta vain näissä soluissa esiintyviä geenejä, jotka yhdessä aiheuttavat erilaistumisen (Birnbaum ym. 2003.)

Mutanttikasvien geenitutkimuksella kartoitetaan, mitä geenejä tai säätelytekijöitä tarvitaan kasvin normaaliin kehitykseen. Kantasolujen sijaintia pyritään selvittämään siten, että jälleen solukosta otetaan satunnainen solu, jonka genomiin istutetaan jokin merkkigeeni. Merkkigeeni saa solussa aikaan jonkun histologisessa leikkeessä näkyvän muutoksen, joka periytyy myös kaikille siitä lähtöisin oleville tytärsoluille. Mikäli muutos on useiden solunjakautumisten jälkeen edelleen havaittavissa jälsisolukossa, voidaan olettaa emosolun olleen kantasolu (Blomster – Mähönen 2013.)

Dof-perheen (DNA-binding One Zinc Finger) transkriptiofaktoreita tavataan koppisiemenisillä ja paljassiemenisillä kasveilla, sekä myös joillain levillä ja sammalilla. Ne ovat säätelytekijöitä, jotka vaikuttavat esimerkiksi kukintaan, stressireaktioihin ja fotosynteesiin. Ne vaikuttavat myös kudosten erikoistumiseen ja niiden kokoon. Dof-ryhmän faktoreita esiintyy erilaisissa kudoksissa (Noguero – Atif – Ochatt – Thompson 2013.)

CKX eli sytokiniinioksidaasi on entsyymi, joka katalysoi tiettyjen sytokiniinien metabolointia ja täten inaktivoi niitä. Sen määrä vaihtelee kasvun eri vaiheissa (Jones – Schreiber 1997.) Koska sytokiniineilla on tärkeä rooli solunjakautumisessa, on niillä erityisesti vaikutusta juuren sekundääriseen kasvuun ja siten sen paksuuteen, jota sytokiniinioksidaasi säätelee.

2.3.3 Geenien aktivoiminen induoitavan osan avulla

Joissain tutkimuksissa on hyödyllistä, ettei insertoitu geeni ekspressoitu kaikissa kasvun vaiheissa, vaan toiminta voidaan käynnistää kontrolloidusti haluttuna ajankohtana. Tällöin vektoriin voidaan siirtää halutun promoottorin ja geenin lisäksi induktio-osa, jolloin geeni aktivoidaan vasta halutuissa olosuhteissa. Induoitavana osana käytetään paljon ihmisen estrogeenireseptoria. Kokonaisuutta kutsutaan XVE-konstruktiksi. On todettu, että XVE-konstruktin käytöllä itsellään on vain hyvin vähäisiä fysiologisia tai kehityksellisiä vaikutuksia kasviin, minkä vuoksi se on monikäyttöinen (Zuo – Niu – Cua 2000.)

2.4 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana eli lituruoho on hento ja matalakasvuinen ristikkukaiskasvien heimoon kuuluva yksivuotinen ruoho, joka elää Suomenkin eteläosissa luonnonvaraisena. Normaalisti se talvehtii joko siemenenä tai syksyllä itäneenä lehtiruusukkeena, minkä jälkeen se pian aloittaa kukkavanan kasvattamisen ja kukinnan alkukesästä touko-kesäkuussa. Lituruoholla on kukkaverson päässä pienet valkeat kukat, joissa on neljä terälehteä. Kasvi pystyy hyönteispölytyksen lisäksi pölyttämään itse itsensä. Lehtiruusukkeen lisäksi kasvin varteen voi kasvaa harvakseltaan kapeatyvisiä varsilehtiä (Lituruoho 2015).

Koska lituruohon elinkierto jää vain muutaman kuukauden mittaiseksi ja se semelparisena kasvina lisääntyy elinaikanaan vaan kerran, sille on edullisempaa käyttää saatavilla oleva energia kukkien ja myöhemmin siementen tuottamiseen varsinaisen kasvun sijaan. Lituruoho kuolee nopeasti tuotettuaan suuren määrän pieniä siemeniä. Siemenet kypsyvät pitkänomaisissa liduissa (Salonen 2006.)

Lituruoho on yleensä itsepölyttävä laji, eli yksilön tuottamat munasolut hedelmöittyvät kasvin oman siitepölyn avulla. Useimmiten tämä tapahtuu kukan sisäisenä pölytyksenä eli autogamisesti, mutta onnistuu myös eri kukkien välisesti, eli geitonogamisesti. Usein pölytys tapahtuu jo ennen kuin kukka ehtii kunnolla aueta. Tällainen itsepölytyminen on lituruoholle joissain tilanteissa edullista, koska vaatimattomat kukat eivät välttämättä riitä kiinnittämään pölyttäjien huomiota, eikä keväällä viileyden vuoksi välttämättä vielä ole riittävästi pölyttäjiä. Itsepölytykseen liittyy myös heikkouksia, kuten elinvoimaa huonontava sisäsiitosheikkous, joten sen lisäksi ristipölytys on lituruoholle mahdollista. (Salonen 2006). Näitä tietoja hyödynnetään, kun halutaan saada aikaan kontrolloituja risteytyksiä kasviyksilöiden välille.

Lituruohoa on hyödynnetty paljon genetiikan tutkimustyössä (Lituruoho 2006). Kasvilla on pieni genomi, vain viisi kromosomia ja noin 27 000 proteiinia koodittavaa geeniä, ja sen genomi selvitettiin kauttaaltaan sekvensoimalla kromosomit vuonna 2000 (The Arabidopsis Information Resource 2014). Käyttökelpoisuutta tutkimuksissa lisää sen helppo kasvatus ja nopea elinkaari. Lituruoho tuottaa runsaasti siemeniä, ja uuden sukupolven tuottamiseen menee vain noin kaksi kuukautta. Kasvi ei ole kovin vaateliias kasvatusympäristönsä suhteen, vaan rikkakasvien tapaan menestyy karummalla ja

kuivemmallakin kasvualustalla. Kasvin genomiin on myös suhteellisen helppo saada integroitumaan vierasta DNA:ta ilman, että kasvi kärsisi siitä muutoin. Nämä ominaisuudet tekevät siitä käytännöllisen kasvibiologian malliorganismien (Welling 2008; The Arabidopsis Genome Initiative 2000.)

Eniten käytetty lituruohon villityyppikontrolli on Columbia. Sitä on käytetty ensimmäisenä lituruohon DNA-sekvensointiin, joten sen genomi tunnetaan tarkoin ja se sopii siksi myös esimerkiksi PCR-reaktiossa tarvittavien alukkeiden malliksi (The Arabidopsis Information Resource 2014.)

3 Menetelmät

Tässä luvussa kuvataan kaikki tutkimuksessa käytetyt menetelmät. Menetelmät on pyritty kuvaamaan siten, että ne ovat tarvittaessa toistettavissa.

3.1 Transformaatio

Transformaatiossa siirretään geneettistä materiaalia solujen välillä. Osa bakteereista on luonnostaan kompetentteja ja kykeneviä transformaatioon. (Transformaatio 2006.) Laboratoriossamme käsiteltävät *E. coli* –bakteerit eivät olleet valmiiksi kompetentteja, joten niitä oli käsitelty vastaanottamaan DNA:ta elektroporaation avulla.

Kun halutaan selvittää jonkin tunnetun geenin ilmenemiskohta ja -tapa, on ensin luotava sopiva vektori, jolla geeni siirretään kasvin perimään. Yleensä vektorina käytetään plasmideja. Vektorissa on oltava mielenkiinnon kohteena olevan geenin lisäksi geenin promoottorialue, sekä esimerkiksi merkkigeeni tai terminaattorialue käyttötarkoituksesta riippuen.

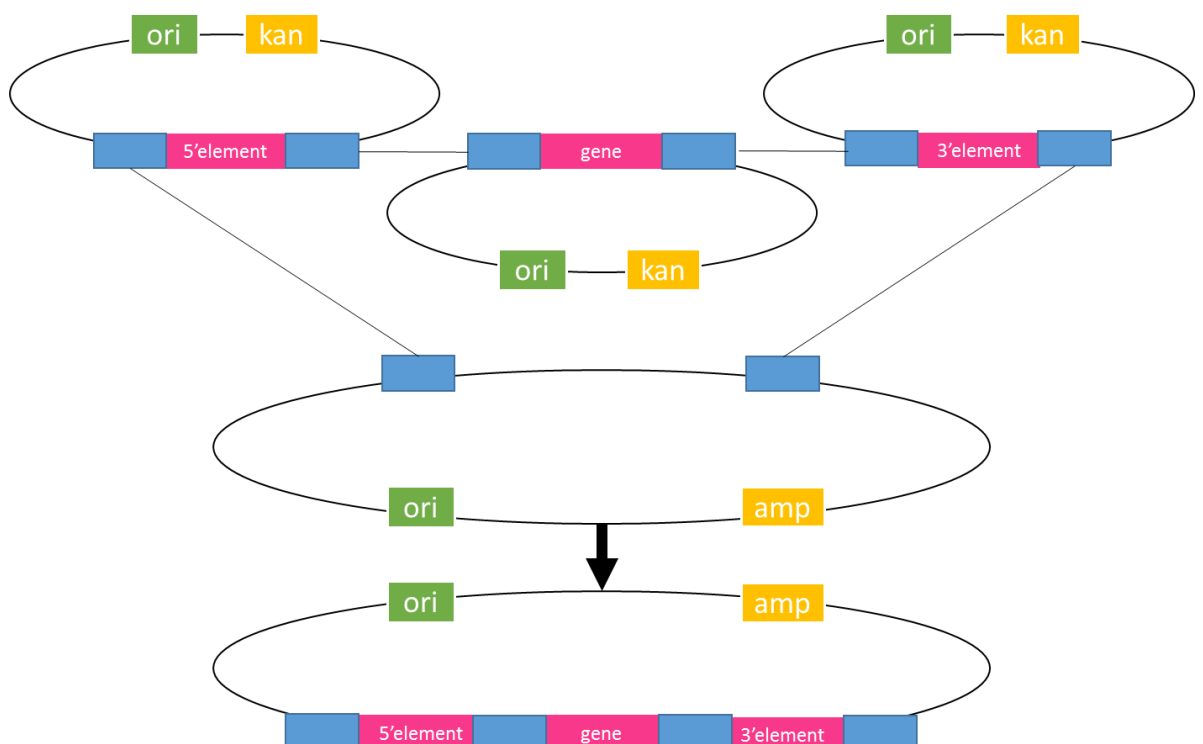
3.1.1 Thermo Fisher Scientific MultiSite Gateway 3-Fragment recombination reaction

Laboratoriossa on käytössä Thermo Fisher Scientific MultiSite Gateway 3-Fragment recombination reaction, eli protokolla, jolla voidaan yhdistää kolme haluttua yksikköä yhteen vektoriin. Yleensä ensimmäisenä yksikkönä on promoottorialue, toisena tutkittava geeni tai merkkigeeni, kuten RFP tai GUS, ja kolmantena yksikkönä

terminaattorialue. Promootorialueeseen saadaan myös tarvittaessa yhdistettyä XVE-konstruktii, jolloin tutkittavan geenin luenta käynnistyy vain estradiolikäsittelyn vaikutuksesta (Siligato ym. 2016.) Protokollaan kuuluu kaksi vaihetta.

Ensin jokainen haluttu osa, kuten geeni on saatava siirtymään omiin vektoreihinsa. Tätä vaihetta kutsutaan BP-reaktioksi. Reaktion aloituspäivänä haluttua tuotetta kloonataan PCR-menetelmällä. Reaktiossa myös lisätään tuotteen päihin sekvenssit, joiden avulla haluttu geeni saadaan tarttumaan vektoriin. Vaihe pitää toista jokaiselle kolmelle yksikölle ennen seuraavaa vaihetta.

Tämän jälkeen siirrytään LR-reaktioihin, eli protokollaan, jossa halutut kolme insertioon sisältämää vektoria saatetaan yhdeksi vektoriksi. Aiemmissa vaiheissa saadut tuotteet siirretään koeputkeen plasmidien, veden ja LR clonase II -entsyymien kanssa inkuboitumaan 25 asteeseen yön yli. Inkubaatioajan päätyttyä toisena päivänä reaktioon lisätään proteinaasi-K -entsyymi ja liuoksen annetaan inkuboitua vielä 10 minuuttia 37 asteessa, jolloin tuotteena on siirtogeenisiä plasmideja (kuvio 6).



Kuvio 6. Yksinkertaistettu kuva LR-reaktiosta. BP-reaktiossa on tuotettu kolme erillistä vektoria, joissa on kussakin replikaation aloittava ori-alue (vihreä), antibioottiresistenssigeeni (keltainen), sekä sekvenssien (sininen) avulla osaksi vektoria saadut elementit (pinkki).

Sekvenssien avulla saadaan kaikki elementit sekvensseineen siirtymään yhteiseen vektoriin, jolloin samassa vektorissa on promoottori, geeni ja terminaattori (Mukailtu MultiSite Gateway® ThreeFragment Vector Construction Kit 2007).

Inkuboinnin jälkeen plasmidiliuosta lisätään 2,5 µl kompetenttien Dh5α *Escherichia coli* – bakteerien joukkoon ja suoritetaan elektroporaatio. Elektroporaatiossa *E. coli* solukalvoon saadaan sähköiskun avulla häiriö, jonka ansiosta siirrettävä perimä voi siirtyä solun sisään (Tenhunen – Ulmanen – Yläne 2004). Jotta solu saadaan käsittelyn jälkeen palautumaan ja lisääntymään, laitetaan solujen joukkoon 1 ml SOC-liuosta (Super Optimal broth with Catabolite repression), joka on glukoosi- ja ravinnepitoista elatusainetta. SOC-liuoksen käyttö lisää solujen transformaatiotehokkuutta (Hanahan 1983). SOC-liuoksen lisäämisen jälkeen bakteereiden annetaan jakautua tunnin ajan 37 asteessa ravistelijassa, minkä jälkeen ne viljellään selektiossa käytettävää antibioottia sisältäville elatusmaljoille ja annetaan kasvaa yön yli 37 asteessa.

Kolmantena päivänä maljoilta tehdään hajotusviljelmät siten, että kustakin kloonista otetaan neljä yksittäistä pesäkettä ja viljellään uusille selektiomaljoille. Selektiomaljoja kasvatetaan 37 asteessa yön yli.

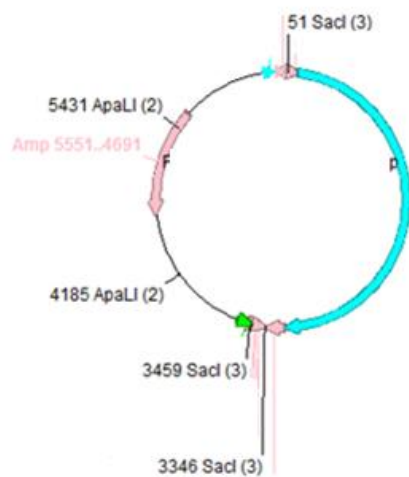
Neljäntenä päivänä hajotusviljelmistä tehdään 5 ml nestekasvatusviljelmät siten, että kunkin kloonin neljästä hajotusviljelmästä otetaan yksittäiset pesäkkeet viljeltäviksi elatusnesteeseen. Elatusnesteessä on käytettävä samaa antibioottia, jota on käytetty selektioon aiemminkin. Nesteviljelmät laitetaan kasvamaan 37 asteeseen yön yli.

Seuraavana päivänä plasmidit eristetään soluista käyttäen kaupallista silikapuhdistusmenetelmään perustuvaa Thermo Fisher Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit –valmispakkausta ohjeen mukaan. Lopputuotteeksi saadaan joko veteen tai kitin mukana tulevaan eluointiliuokseen eluoituja plasmideja.

3.1.2 Digestio

Jotta voidaan varmistaa halutun PCR-tuotteen siirtyminen plasmidiin, on näytteet digestoitava. Digestio suunnitellaan ensin virtuaalisesti tietokoneella erityisellä tarkoitukseen sopivalla ohjelmalla. Ohjelma näyttää plasmidin oletetun rakenteen nukleiinihappojen tarkkuudella, sekä ilmaisee plasmidin eri funktionaalisten osien

sijainnin ja pituuden. Digestointiin käytetään restriktioentsyymejä, jotka löytävät plasmidin DNA:sta niille ominaisen sekvenssin ja katkaisevat juosteen jättäen siihen joko kohessiiviset tai tylpät päät entsyymistä riippuen (Digestio 2006.) Yhdellä entsyymillä voi olla plasmidissa useita katkaisukohtia, jolloin saadaan useampia juosteita. Tietokoneohjelmalla voidaan mallintaa restriktioentsyymin toimintaa ja valita entsyymit, jotka tuottavat halutun pituiset juosteet (kuvio 7). Yleensä pyritään valitsemaan kaksi entsyymiä ja tuottamaan näiden avulla juosteita, jotka ovat pituuksiltaan toisistaan poikkeavia. Entsyymillä pilkotut tuotteet erotellaan geelielektroforeesilla ja näkyviin tulleita juosteita verrataan tietokoneohjelman antamaan arviointiin. Jos lopputulos vastaa arviota, on digestio onnistunut ja PCR-tuote siirtynyt oletuksen mukaisesti osaksi plasmidia.



Kuvio 7. Ohjelman tuottama näkymä digestoitavasta vektorista. Sinisellä on merkitty siirretty geeni. ApaI- ja SacI-restriktioentsyymien katkaisukohtat on merkitty mustalla. Vasemmalla vaaleanpunaisella värillä on myös merkitty geeni, joka antaa resistenssin ampicilliinille.

3.1.3 Konstruktiön transformointi agrobakteereihin

Jotta onnistuneen reaktiosarjan lopputuloksena syntynyt halutun geenin sisältävä plasmidivektori voidaan siirtää kasviin, on se saatava ensin transformoitumaan agrobakteereihin. Veteen tai eluointiliuokseen eluoituja plasmideja sekoitetaan 0,5 µl kompetentteihin agrobakteereihin ja suoritetaan elektroporaatio. Päälle pipetoidaan 1 ml SOC-liuosta ja bakteerien annetaan jakautua 2 tuntia 28 asteessa. Tämän jälkeen bakteeriliuosta pipetoidaan 50 µl maljalle, jossa on plasmidien selektiossa käytettyä

antibioottia, sekä rifampisiinia, jolle käytetty agrobakteerikanta on tolerantti. Maljoja kasvatetaan 28 asteessa 2-3 vuorokautta, minkä jälkeen kahdesta yksittäisestä pesäkkeestä tehdään hajotusviljelmät ja kasvatetaan toiset 2-3 vuorokautta.

Maljakasvatuksen jälkeen kultakin maljalta otetaan yksittäinen pesäke ja tehdään 5 ml nesteviljelmät. Elatusaineeseen lisätään selektioantibioottia ja rifampisiinia ja kasvatetaan 28 asteessa 1-2 päivää. Nesteviljelmästä tehdään varastoviljelmiä glyseroliin myöhempää käyttöä varten lisäämällä 500 µl 60 % glyseroliin 500 µl bakteerien nestekasvustoa.

3.1.4 Floral dip –menetelmä

Floral dip –menetelmä eli ”dippaus” on nykyisin eniten käytössä oleva transformaatiomenetelmä lituruohon geeninsiirtoon. Dippaus voidaan suorittaa joko kastamalla koko kasvi siirtogeenisiä agrobakteereita sisältävään liuokseen tai vaihtoehtoisesti pipetoimalla liuosta kypsyvien nuppujen päälle (Davis – Hall – Millar – Darrah – Davis 2009). Agrobakteeri infektoi kasvisolut ja Ti-plasmidi integroituu osaksi kasvin perimää. Näin haluttu geeni on periaatteessa saatu siirrettyä kasvin genomiin. Tätä ennen agrobakteereista on erotettu edellisissä työvaiheissa ne pesäkkeet, jotka sisältävät haluttua siirtogeeniä (Suominen ym. 2013.)

Transformaatiota varten kasvatetaan villityypin lituruohoja ensin lyhyen päivän olosuhteissa noin 3 viikkoa, minkä jälkeen kukkavarsien alkaessa muodostua kasvit siirretään pitkän päivän olosuhteisiin noin viikoksi. Kasvit istutetaan siten, että yhteen ruukkuun tulee 5 kasviyksilöä ja ruukkuja varataan kaksi yhtä kloonია varten, jotta ne riittävät haluttuihin transformaatioihin. Myöhemmin ruukkujen ympärille asetetaan muoviset kasvipussit, jotta eri geenein transformoidut kasvit voidaan eristää toisistaan helposti ja estää mahdollinen ristipölytys.

Haluttua siirtogeeniä sisältäviä glyseroliin pakastettuja agrobakteereja inkuboidaan ravistelijassa 28 asteessa yön yli ravinteikkaassa LB-mediassa (Lysogeny broth), jossa on aiemmin käytettyä selektioantibioottia ja rifampisiinia. Seuraavana päivänä liuos bakteereineen siirretään 15 ml Falcon-putkeen ja sentrifugoidaan 5 minuuttia 4000 rpm. Supernatantti kaadetaan pois ja pelletti jätetään putken pohjalle. Bakteerit sekoitetaan liuokseen, johon tulee MQ-vettä, sekä veden tilavuudesta 5 % sakkaroosia ja 0,05 %

Silwet L-77 –surfaktanttia (Zhang – Henriques – Lin – Niu – Chua 2006). Sakkarooosi toimii bakteereiden aktivaatioaineena ja Silwet L-77poistaa nestejännitettä, jotta kasville pipetoidut agrobakteeriliuospisarat eivät putoaisi kasvin pinnalta, vaan bakteerit pääsisivät siirtymään kasviin. 5 ml liuosta riittää infektoimaan kaksi ruukullista kasveja. Liuos pipetoidaan kasvin kukkiin ja nuppuihin kertakäyttöisellä Pasteur-pipetillä, minkä jälkeen kasvipussit suljetaan yöksi.

3.2 Kasvien steriiliviljely

Jotta olosuhteet saadaan vakaaiksi ja vertailukelpoiksi, ja halutuille kasveille voidaan tehdä estradiolikäsittely, on kasvatusmenetelmien oltava steriilejä. Lisäksi jokaiseen kasvualustaan pyritään saamaan mahdollisimman samanlaiset kosteus-, ravinne- ja valaistusolosuhteet. Tällä voidaan poissulkea kaikki ympäristöoloista johtuva muuntelu, jolloin voidaan olettaa muutosten johtuvan vain muuntogeenistä.

3.2.1 Sterilointi

Laboratorioon saapuneet siemenet steriloidaan joko pelkällä kloorikaasulla tai vaihtoehtoisesti kloori-etanoli –käsittelyllä. Tällä varmistetaan, että siementen pinnalla mahdollisesti olevat homeet ja bakteerit tuhoutuvat, eivätkä vaikuta kasvuun kontaminoimalla kasvualustaa.

Kloorikaasukäsittely tapahtuu siten, että siemeniä sisältävät avonaiset koeputket asetetaan vetokaapissa sijaitsevaan eksikaattoriin. Eksikaattorin sisälle laitetaan myös 50 ml klooriliuosta sisältävä astia. Kun astiaan kaadetaan 1,5 ml 37 % suolahappoa, kloori höyrystyy ja steriloi siemenet. Eksikaattori on suljettava välittömästi suolahapon lisäämisen jälkeen ja pidettävä vetokaapissa, jottei höyrystyvä kloori pääse huoneilmaan. Siemeniä steriloidaan muutaman tunnin ajan, minkä jälkeen ne peitetään 0,1 % agarosigeelillä. Kaasusterilointi sopii erityisesti suurten näytemäärien sterilointiin, sillä eksikaattoriin mahtuu kerralla useita koeputkia ja näin ollen eri linjoja edustavia siemeniä.

Siemenet voidaan steriloida myös nestemäisellä kloorilla. Tällöin siemeniä sisältäviin koeputkiin pipetoidaan Klorin-liuosta (natriumhypokloriitti) ja muutama tippa

nestejännitteen poistavaa Tween20-liuosta, ja näiden annetaan inkuboitua noin 3 minuuttia. Tämän jälkeen klooriliuos pipetoidaan pois ja siemenet pestään kertaalleen 70 % etanolilla ja kolmesti steriilillä vedellä. Pesujen tarkoitus on poistaa kloorijäämät, sillä kloori vaurioittaa siemeniä ja haittaa itämistä, mikäli sitä jää siementen pinnalle. Lopuksi siemenet peitetään 0,1 % agarosigeelillä samalla tavalla kuin kaasumenetelmää käytettäessä. Nestekäsittelyä on yleensä helpointa soveltaa pieniin steriloitavien siemenlinjojen määriin. Jos steriloitavia siemeniä on linjaa kohden paljon, mutta linjoja vähän, on protokolla muutoin sama kuin steriloitaessa pienempiä siemenmääriä, mutta tilavuudet ovat suurempia ja inkubaatioajat ovat hieman pidemmät suuren siementilavuuden vuoksi.

3.2.2 Idätys eli germinaatio

Lituruohon siemenet yleensä kylmäkäsittellään yhden tai mieluiten useamman vuorokauden ajan ennen protokollan aloittamista, jotta ne itäisivät synkronoidusti Siementen vaatimaa kylmäkäsittelyä nimitetään stratifikaatioksi (Salonen 2006.)

Kasvatusalustana toimii steriili viljelyalusta, jossa on kasvien tarvitsemia ravinteita ja sokereita, sekä tarvittaessa myös selektiossa käytettävää antibioottia. Kasvualustaa varten valmistetaan litran pulloon seos, jossa on 10 g sakkaroosia, 8 g kasviagar, 2,2 g kasvien tarvitsemia vitamiineja ja kivennäisaineita sisältävää MS-jauhetta (Murshige & Skoog Medium), sekä 0,5 g MES-monohydraattijauhetta puskurointiin. Pullo täytetään mittaviivaan saakka MQ-vedellä ja pH tasapainotetaan tarvittaessa 2 M kaliumhydroksidin tai 2 M natriumhydroksidin avulla lukemaan 5,7 - 5,7. Lopuksi pullo steriloidaan autoklavoimalla. Nestemäiseksi sulatettua kasvualustaa kaadetaan maljoille 50 ml maljaa kohden tasaiseksi kerrokseksi ja annetaan jähmettyä. Siemenet pyritään istuttamaan pipetinkärkeä apuna käyttäen suoraan riviin geelin päälle, jolloin juurten pituuksien ja kasvin kasvun vertailu on helpompaa. Kaikki työskentely geelin steriloinnin jälkeen suoritetaan laminaarivirtauskaapissa, jotta kasvualustaan ei pääse mikrobeja.

Joillain lajeilla valon määrä vaikuttaa itämiseen. Lituruoho on pienisiemeninen laji, jonka siemeniin ei mahdu paljonkaan vararavintoa. Niiden siemenille onkin edullista itää lähellä maanpintaa valoisassa, jolloin vararavintoa ei tarvita niin paljon maaperän läpi kasvamiseen (Salonen 2006). Laboratorion kasvatuskaapeissa käytetään niin sanottua

pitkän päivän sykliä, eli kasvit saavat valoa 16 tuntia ja ovat pimeässä 8 tuntia. Lämpötila pidetään lähellä 23 astetta. Näin ne taimettuvat nopeasti.

Tutkimuksista riippuen yhden tai kahden viikon ikäiset taimet voidaan istuttaa kosteaan kasvualustaan, joka sisältää vermikuliittia ja turvetta suhteessa 1:1. Kasvihuoneella ne peitetään ensin muovilla, jotta olosuhteiden muutos ei aiheuttaisi tarpeetonta stressiä. Ensimmäisinä viikkoina valo-olosuhteet vastaavat lyhyen päivän sykliä, eli 8 tuntia valoa ja 16 tuntia pimeää. Tällä saadaan kasvit tuottamaan pituuskasvun sijaan enemmän lehtiä ja kasvamaan tukevammiksi. Ensimmäisten kukkavarsien tultua näkyviin kasvit siirretään toiseen huoneeseen, jonka valo-olosuhteet vastaavat pitkää päivää, eli samaa kuin kasvatuskaapeissa. Tämä edistää vertikaalista kasvua ja nopeuttaa kukintaa.

3.2.3 Indusointi estradiolilla

Laboratoriossa on määritetty, että lituruohon sekundäärinen kasvu alkaa kyseisissä olosuhteissa noin neljän päivän iässä, joten neljän päivän kasvatuksen jälkeen taimet siirrettiin kasvamaan uusille maljoille indusointia varten. Estradiolimaljojen haluttu konsentraatio on 5 μM ja se tehdään pipetoimalla 125 μl 20 mM varastoliuosta 500 ml sulatettuun $\frac{1}{2}\text{GM}$ -liuokseen. Maljat valetaan estradiolikäsittelyyn sopivassa laminaarivirtauskaapissa ja niiden annetaan jähmettyä. Jotta estradiolin vaikutusta voidaan arvioida, valmistetaan myös kontrollimaljat, joissa geenin indusoitumista ei tapahdu. Koska estradiolin varastoliuos on laboratoriossa liuotettu DMSO:iin (dimetyylisulfoksidi), tehdään kontrollimaljat pipetoimalla 125 μl DMSO:a $\frac{1}{2}\text{GM}$ -liuokseen ja valamalla maljat kuten edellä. DMSO:lla itsellään ei ole laboratoriossa todettu olevan vaikutusta kasvin kasvuun.

3.3 Genotyypitys

Tutkimuksissa käytettävät geenimuunnellut siemenet tilataan ulkopuolisilta kantakeskuksilta, mikäli geenimuutosta ei tehdä laboratoriossa. Homotsygoottisuus siirtogeenin suhteen täytyy aina varmistaa joko antibioottiselektion avulla, tai genotyypittämällä PCR:n ja geelielektroforeesin avulla. Mikäli kasviin on tehty useampi kuin yksi insertio, tai antibioottiselektio ei anna selvää tulosta, voidaan käyttää genotyypitystä homotsygoottisuuden varmistamiseen.

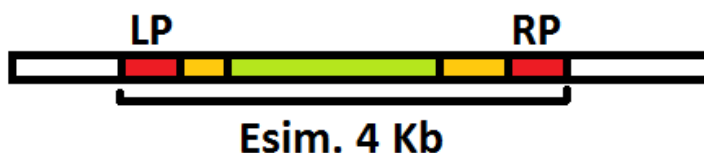
3.3.1 Genotyypitys PCR:n avulla

PCR-menetelmällä voidaan monistaa sekä siirtogeenisten, että villityypin kasvien lehdistä otettuja DNA-näytteitä. Geelielektroforeesierottelulla tarkasteltavien linjojen edustajat voidaan genotyypittää homotsygooteiksi tai heterotsygooteiksi, tai vastaavasti villityypin tai toivotun mutantin kaltaiseksi.

Jotta geelielektroforeesissa saadaan selville, onko yksilö siirtogeeninen ja jos on, onko se homotsygootti vai heterotsygootti, on siirtogeeniä varten pitänyt suunnitella alukkeita. Alukkeet suunnitellaan siten, että ne sitoutuvat villityyppi-PCR:ssa villityypin geenissä kahteen kohtaan, eli DNA-insertiokohdan oikealle ja vasemmalle puolelle. Jos DNA-insertio on onnistunut ja vierasta DNA:ta löytyy tarkastellusta geenistä, alukkeiden väliin jää niin paljon emäspareja, että monistaminen ei onnistu ja geelielektroforeesiin ei synny juostetta. Jos taas insertiota ei ole, alukkeiden väliin jäävä juoste on riittävän lyhyt ja siitä syntyy juoste geelielektroforeesissa (kuvio 8 ja 9).

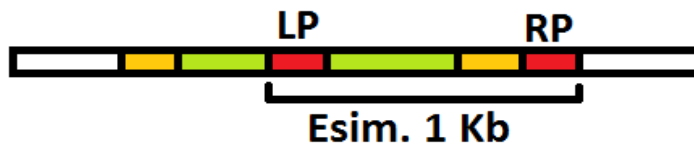


Kuvio 8. Kuvaan on merkitty alukkeiden paikat punaisella ja niiden väliin jäävä villityypin genomi keltaisella. Villityyppi-PCR:ssa monistuu alukkeiden väliin jäävän alue, mikäli se on tarpeeksi lyhyt. Yleensä alueen kooksi valitaan noin 1-2 Kb.



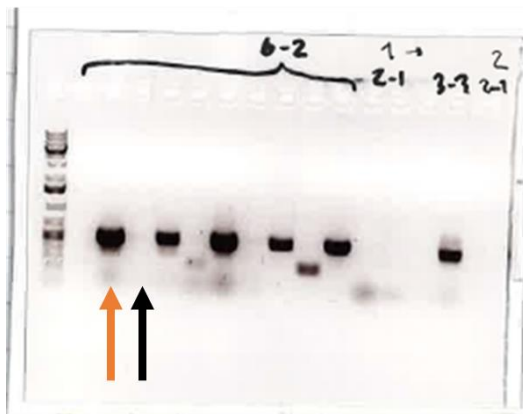
Kuvio 9. Kuvaan on merkitty alukkeet ja villityypin genomi kuten edellä, mutta insertio on värjätty vihreällä. Mikäli tutkittava DNA sisältää insertion, on alukkeiden väliin jäävä osa liian suuri monistettavaksi, ei monistustuotetta synny, eikä se näy siten geelielektroforeesissa.

Mutaation osoittava PCR suunnitellaan siten, että toinen aluke sitoutuu johonkin kohtaan insertiossa ja toinen sitoutuu insertiokohdan jälkeiseen DNA-juosteeseen. Insertiokohtaan sitoutuva alukkeelle ei ole vastinetta villityypin DNA:ssa, jolloin monistustuotetta ei synny. Jos insertio taas on onnistunut ja aluke sitoutuu siihen, saadaan geelielektroforeesierottelussa näkyviin tietyn mittaisia juosteita (kuvio 10).



Kuvio 10. Kuvaan on merkitty alukkeet, villityypin genomi ja insertiokohta kuten edellä. Alukkeet on suunniteltu niin, että ensimmäinen aluke sitoutuu insertion sisällä haluttuun kohtaan. Tällöin monistettava alue on riittävän lyhyt, yleensä noin 1 Kb, ja monistustuote syntyy. Mikäli insertiota ei ole, ei ensimmäinen aluke voi sitoutua, eikä monistustuotetta synny.

Eri PCR-tuotteet monistetaan eri reaktioissa. Toiseen reaktioon siis tulee alukkeiksi insertioon ja kasvigenomiin sitoutuvat alukkeet, ja toiseen villityyppiin sitoutuvat alukkeet. Kun tuotteet erotellaan geelielektroforeesilla, voidaan syntyvistä juosteista päätellä kasvin homo- tai heterotsygoottisuus. Mikäli molemmista PCR-tuotteista on syntynyt geelille juosteet, on kasvilla villityypin ja insertion alleelit ja kasvi on ominaisuuden suhteen heterotsygootti. Jos taas näkyviin tulee vain toisen PCR-tuotteen juoste näkyy, on kasvi ominaisuuden suhteen homotsygootti (kuvio 11).



Kuvio 11. Näkymä insertiogeelielektroforeesierottelun jälkeen. Mustan nuolen osoittamassa kohdassa kuuluu näkyä villityypin PCR-tuote, ja oranssin nuolen kohdalla mutaation PCR-tuote, eli jokaista näytettä kohden on kaksi näytepaikkaa. Koska villityypin PCR ei ole tuottanut geelille näkyvää juostetta, on nuolten osoittama DNA-näyte ollut insertion suhteen homotsygootista kasvista. Sen sijaan neljäs näyte vasemmalta oikealle on heterotsygootista kasvista, koska näkyvillä on tuotteet sekä mutaation, että villityypin PCR:sta.

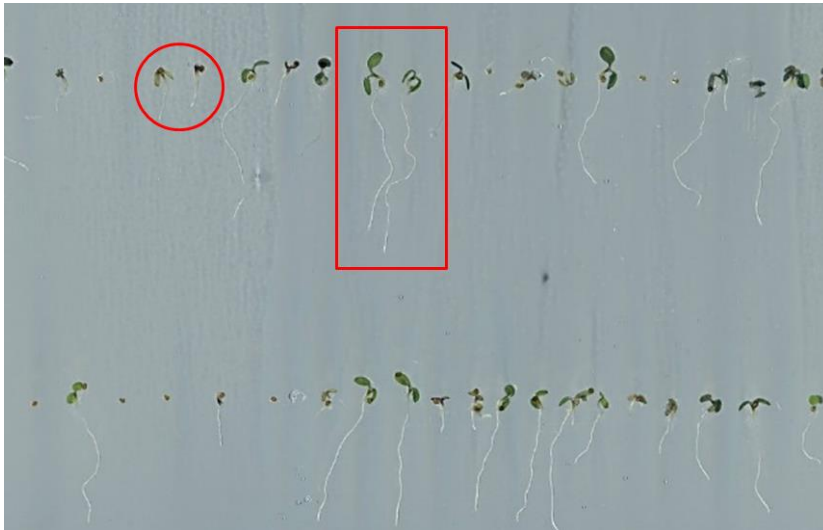
3.3.2 DNA:n eristysmenetelmät

Kasvin DNA:n eristämiseen käytetään laboratoriossa tehtyä puskuriliuosta, joka sisältää 10 ml 1M Tris (trishydroksimetyyliaminometaani) -HCl – puskuria, 2,5 ml 5M Na-Cl, 2,5 ml 0,5M EDTA:a (etyleenidiamiinitetraetikkahappo), 1,25 ml 20 % SDS:ia (natriumlayruulisulfaatti) ja 33,75 ml vettä. Näytteeksi kasvista irrotetaan yksi lehti, joka laitetaan inkuboitumaan 95 asteeseen puskuriliuoksen kanssa 15 minuutiksi. Kuumakäsittely puskuriliuoksessa saa näytteen hajoamaan ja DNA:n ja proteiinit liukenemaan puskuriin. Tämän jälkeen puskuriin pipetoidaan kylmää isopropanolia suhteessa 1:1, sekoitetaan välittömästi ja sentrifugoidaan näyte, jolloin DNA saadaan saostumaan ja epäpuhtaudet liukenevat nesteeseen. Isopropanolisupernatantti kaadetaan pois, tilalle pipetoidaan kylmää 70 % etanolia ja sentrifugoidaan. Etanolisupernatantti kaadetaan pois ja koeputkia kuivatetaan ylösalaisin, minkä jälkeen putken pohjalle jäänyt DNA-pelletti suspensoidaan steriiliin veteen ja pakastetaan.

DNA:ta voidaan myös eristää agarosigeeliltä kromatografisesti kaupallista pakkausta hyödyntäen. Tällöin haluttu geelillä oleva PCR-tuote leikattiin geelistä ultravioletivaloa apuna käyttäen. Geelipala punnitaan ja liuotetaan 50 - 60 asteessa puskuriliuokseen suhteessa 1 mg : 1 µl. Saatu liuos pipetoidaan pakkauksen mukana tuleviin silikaputkiin ja sentrifugoidaan, jolloin korkeassa ionivahvuudessa nukleiinihapot sitoutuvat silikaan ja epäpuhtaudet huuhtoutuva sen läpi. Putkiin lisätään vielä erityistä pesuliuosta, joka irrottaa loputkin proteiinit ja muut tuotteet, joita ei haluta näytteeksi. Pesun jälkeen DNA eluoidaan vedellä tai muulla matalan ionivahvuuden omaavalla liuksella puhtaaseen koeputkeen ja pakastetaan. Samalla menetelmällä voidaan eristää myös bakteereiden plasmidien DNA:ta (Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus 2006.)

3.4 Segregaatio

Antibioottiselektio perustuu siihen, että plasmidiin istutetaan mielenkiinnon kohteena olevan geenin lisäksi selektiogeeni, joka antaa resistenssin spesifille antibiootille. Mikäli insertio on onnistunut, tätä spesifiä antibioottia sisältävällä maljalla kasvatetut siemenet itävät normaalisti, kun taas insertion epäonnistuessa ja siten selektiogeenin puuttuessa antibiootti haittaa siementen itämistä ja kasvua (kuvio 12) (Suominen ym. 2013.)



Kuvio 12. Selektio antibioottimaljalla. Punaisella ympyrällä on merkitty taimet, joille ei ole siirtynyt antibioottiresistenssigeeniä ja siksi kasvavat huonosti tai kuolevat antibioottipitoisella maljalla. Punaisella suorakulmiolla on merkitty antibioottiresistentit taimet, jotka kasvavat normaalisti.

T1-sukupolven selektio aloitetaan steriloimalla transformoiduista kasveista kerätyt siemenet nestekloorimenetelmällä. Kylmäkäsitelyn jälkeen siemenet maljataan kasvualustoille siten, että yhtä maljaa kohden pipetoidaan siemeniä sisältävää geeliä 1 ml ja levitetään mahdollisimman tasaisesti maljalle. Näin siemeniä tulee noin 2000 maljaa kohden. Kasvualustan on sisällettävä sekä selektiossa käytettävää antibioottia, että agrobakteerin kasvua estävää antibioottia. Alle viikon iässä kaikki itäneet yksilöt siirrostetaan samoja antibiootteja sisältäville maljoille väljemmin, jotta niillä on tilaa kasvaa paremmin ja niistä on helpompi tarkastella haluttuja ominaisuuksia, kuten fluoresenssia. T1-polven selektiossa siis valikoidaan kaikki antibioottiresistentit yksilöt tuottamaan seuraavaa sukupolvea.

T2-selektioon käytetään T1-polven tuottamia siemeniä. Siemenet steriloidaan ja kylmäkäsitellään, minkä jälkeen ne maljataan resistenssigeenin mukaan valitulle antibioottialustalle riveihin. Selektiotekijän on siis oltava sama kuin ensimmäisessä selektiossa. Selektiossa käytetään suurta otantaa, sillä tällöin sattuman aiheuttaman hajonnan merkitys on pienempi prosentuaalisia määriä laskettaessa. Selektiossa valitaan heterotsygootit linjat siten, että itäneiden siementen kokonaismäärästä lasketaan elävien, eli antibioottiresistenttien taimien prosentuaalinen määrä ja verrataan sitä periytymissäännön mukaisesti prosenttimääriin. Tällöin T2-selektiossa

heterotsygooteiksi voidaan olettaa linjoja, joiden yksilöistä noin 75 % on antibioottiresistenttejä ja 25 % kuolevat maljalla. Tämän prosenttisuhteen omaavat linjat valitaan jatkamaan sukua.

T3-selektiota varten T2-polven tuottamat siemenet maljataan antibioottia sisältäville kasvualustoille noin 20 yksilön riveihin. Selektioantibiootti on samaa, joka on ollut käytössä aiemmissakin selektiovaiheissa. Tässä vaiheessa otannan ei tarvitse olla yhtä laaja kuin edellisissä vaiheissa, sillä linjoista valitaan vain ne, joiden siemenistä jokaisella on antibioottiresistenssigeeni ja ovat näin ollen periytymissäännön mukaan homotsygotteja alleelin suhteen. Homotsygotin linjan siemenistä siis 100 % pitäisi olla elossa antibioottialustalla.

3.5 Histologinen leike

Kasvatettujen *Arabidopsis thaliana* – mutaatiolinjojen fenotyyppejä tutkitaan ottamalla juurista poikkileikkeitä ja vertaamalla solukkoa villityypin soluksoon. Näin selvitetään mutaation vaikutusta kasvin jäljen paksuuskasvuun ja muodostumiseen.

3.5.1 Juurien leikkaus

Näytteeksi voidaan ottaa koko juuri, tai vain pieni osa siitä. Heti hypokotyylialueen alla on juuren vanhinta osaa, missä sekundäärikasvu on yleensä edennyt pisimmälle. Mikäli vain tätä osaa halutaan tarkastella, poistetaan pääjuuresta skalpellilla sivujuuret ja hypokotyylialueen yläpuolelle jäävä osa eli lehdet, minkä jälkeen pääjuuri katkaistaan muutaman senttimetrin päästä hypokotyylialueesta ja fiksoidaan. Koko juurta tutkittaessa pääjuurta ei katkaista laisinkaan.

3.5.2 GUS-värjäys

E. colista on eristetty β -glukuronidaasientsyymiä tuottava reportterigeeni GUS. Sitä käytetään ilmaisemaan transformoitujen kasvien geeniekspression sijaintia siten, että leikkeitä inkuboidaan substraatissa, joka muuttuu väriyhdisteiksi GUS-reportterigeenin vaikutuksesta. β -glukuronidaasilla ei ole todettu vaikutuksia kasviin ja se säilyy vakaana kasvin solukossa (Jefferson – Kavanagh – Bevan 1987.)

Näytteitä fiksoidaan 90% asetonissa jäillä 30 minuuttia, minkä jälkeen asetonijäämät pestään kahdesti siten, että näytteitä inkuboidaan jokaista pesua kohden 10 minuutin ajan 0,05 M natriumfosfaattiliuoksessa. Liuoksen pH on 7,4 ja se on valmistettu liuottamalla 1 M natriumfosfaattia MQ-veteen.

Pesujen jälkeen näytteet siirretään GUS-liuokseen. 500 ml 5 mM vahvuisen GUS-liuoksen valmistamiseen käytetään 15 ml 1 M Na_2HPO_4 , 10 ml 1 M Na_2HPO_4 , 0,105 g $\text{K}_4\text{Fe} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 0,082 g K_3Fe ja 250 mg X-Gluc-reagenssia liuotettuna 1ml eli DMF:in (dimetyyliformamidi). Jotta GUS-liuos vaikuttaisi nopeammin, pidetään näytteitä vakuumissa juuren paksuudesta riippuen viidestä minuutista kahteen tuntiin. Tämän jälkeen näytteitä inkuboidaan 37 asteessa pimeässä 20 minuutista tunteihin, kunnes saavutetaan haluttu värjäytymisaste. Värjäytymistä on tarkkailtava vähintään tunnin välein, jotta näytteet eivät ylivärjäytyisi. Värjäyksen jälkeen näytteitä pestään taas kahdesti 0,05 M natriumfosfaattiliuoksessa 10 minuuttia kerrallaan. Tämän jälkeen näytteet ovat valmiita fiksointiin ja muuhun prosessointiin.

3.5.3 Fiksointi ja kudospesointi

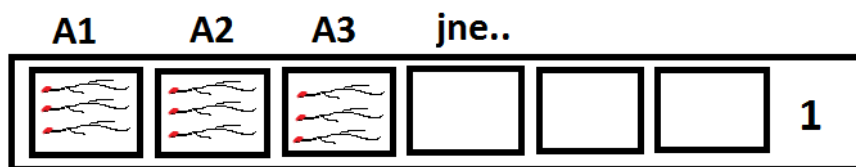
Ensin juuret fiksoidaan eli kiinnitetään liuoksessa, joka sisältää 1 % glutaraldehydiä ja 4 % formaldehydiä, sekä 5 % 0,05 M natriumfosfaattipuskuria, jolloin liuoksen pH on noin 7,4. Käytetty fiksaatiivi tappaa solut nopeasti, jolloin solun kuoleman jälkeiset muutokset tai hajoamisreaktiot ovat vähäisiä ja näytteet säilyvät samassa tilassa kun keräyshetkellä. Fiksointi myös muuttaa näytteen koostumusta siten, että kudoksesta tulee lujempaa ja edistää valon taittumista näytteessä (Näytteen valmistus 2006). Fiksointi tapahtuu kuoppalevyllä, jossa yhden kasvilinjan juuret laitetaan aina samaan kaivoon. Jokaisessa kaivossa on oltava fiksointiliuosta niin paljon, että juuret peittyvät kokonaan. Yleensä sopiva määrä on noin 2-3 ml kuoppaa kohden.

Näytteistä poistetaan vesi nousevalla etanolisarjalla siten, että juuria pidetään 20 - 30 minuutin ajan vuorollaan 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 96 % ja kahdesti absoluuttisessa etanolissa. Sarja aloitetaan poistamalla fiksointiliuos kuopasta ja lisäämällä 10 % etanoliliuos sen tilalle. Sarjaa jatketaan poistamalla inkubaatioajan päättyessä aina edellinen etanoli kuopasta mahdollisimman tarkoin ja lisäämällä sen tilalle vahvempi liuos, kunnes viimeisessä vaiheessa käytetään 100 % etanolia. Tämän jälkeen näytteet

jätetään vielä absoluuttisen etanolin ja kaupallisen Leica Historesin Solution A:n seokseen inkuboitumaan vähintään kolmeksi tunniksi. Lopuksi näytteet jätetään kolmeksi tunniksi inkuboitumaan Solution A:han, joka tällöin korvaa kudoksen etanolin. Veden poistamiseen käytetään etanolia siksi, että se liukenee sekä veteen, että valuaineena käytettävään Solution A:han. Solution A ei suoraan liukeneisi veteen, jolloin etanolin käyttö on välttämätöntä.

3.5.4 Näytteen valaminen muotteihin

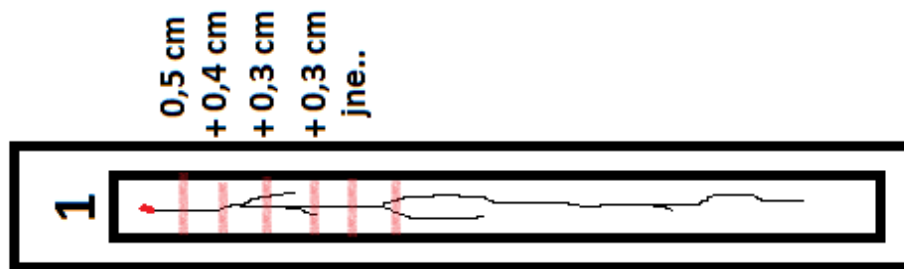
Näytteet valetaan ohueksi levyksi hapettomissa oloissa kovaksi muoviksi polymeroituvaan seokseen, jota varten sekoitetaan Solution A:ta ja Leica Historesin Hardeneria suhteessa 14:1. Samaa kasvilinjaa edustavien yksilöiden juurten hypokotyylialueet ovat näytteessä siis vierekkäin samassa tasossa, jolloin näytepalaa leikatessa saadaan kaikista juurista leikkeet samasta tasosta ja niiden kokoa ja morfologiaa voidaan myöhemmin vertailla keskenään. Eri linjojen edustajien juuret laitetaan omiin kammioihinsa, jolloin kustakin linjasta saadaan useita juuria sisältävä ohut levy. (kuvio 13) Levyt leikataan ja kasataan päällekkäin torniksi, joka kuivumisen jälkeen asetetaan vielä muottiin siten, että leikatut sivut tulevan samansuuntaisesti valoksen pohjaa kohti. Muotti täytetään samalla aiemmissä työvaiheissa käytetyllä muoviseoksella, joka kovetuttuaan muotista irrottamisen jälkeen liimataan puupalaan.



Kuvio 13. Juurten asettelu kammioihin. Samaa linjaa edustavat juuret asetetaan samaan kammioon hypokotyylialueet vierekkäin samansuuntaisesti tasoon, ja jokaiselle linjalle on oma kammionsa. Hypokotyylialue on merkitty kuvaan punaisella.

Mikäli halutaan tarkastella koko juuren matkalta jotain spesifiä solukkoa, leikataan juuria sisältävä levy paloihin, jotka asetetaan samansuuntaisesti päällekkäin. Lopputuloksena on torni, jossa ylimpänä on juuren kärkiosia sisältävä pala, ja alimpana hypokotyyli-aluetta lähinnä olevat juuren osat. Juuri leikataan paloihin siten, että ensimmäinen tarkasteltava

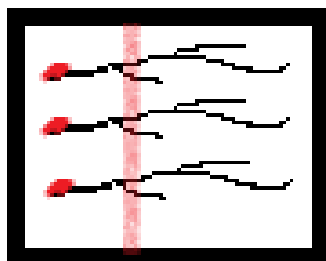
alue on 0,5 cm hypokotyylialueesta, seuraava 0,9 cm ja kaikki sitä seuraavat +0,3 cm edellisestä (kuvio 14).



Kuvio 14. Juuren leikkaaminen koko juuren tarkastelua varten. Haalealla punaisella on merkitty leikkauskohdat. Tummallalla punaisella on merkitty kasvin hypokotyylialue.

Jos taas halutaan vertailla eri linjoissa tapahtuvaa geeniekspressiota jollain juuren alueella, leikataan kaikki vertailtavat juuret vain yhdestä kohdasta 0,5 cm etäisyydeltä hypokotyylialueesta. Nämä palat asetetaan halutussa muistiin merkityssä järjestyksessä päällekkäin, jolloin yksi kerros edustaa aina saman kasvinlinjan juuria. Tarkastelun kohteeksi jää kaikista juurista sama kohta (kuvio 15).

0,5 cm



Kuvio 15. Juuren leikkaaminen linjojen vertailua varten. Haalealla punaisella on merkitty leikkauskohta 0,5 cm päähän tummanpunaisella merkitystä hypokotyylialueesta.

Kun pinojen on annettu kuivua ja kovettua yön yli, ne valetaan lopuksi samaan Solution A:n ja Historesin Hardenerin seokseen, johon juuret edellä valettiin. Pino asetetaan muotin pohjalle siten, että leikattu, tarkasteltava alue jää muotin pohjaa vasten. Pintaa

kohti siis tulee juuresta se osa, jota ei haluta tarkastella (kuvio 16). Päälle asetetaan ohut muovikalvo, jotta muottiin saadaan hapettomat olosuhteet ja liuos kovettuu.



Kuvio 16. Juuripinot valetaan Solution A:n ja Historein Hardenerin seokseen leikkauspuoli alaspäin. Hypokotyyli jää valoksen yläosaan.

3.5.5 Leikkeiden teko, jälkivärjäys ja leikkeiden tarkastelu

Kun muovin on annettu kovettua yön yli, irrotetaan palat muoteista ja liimataan kiinni puupalikoihin. Hypokotyylialue tulee puuta vasten, jolloin leikattavaksi sivuksi jää katkaistu pinta. Palasta leikataan mikrotomilla ensin ylimääräinen muovi pois niin, että tasoon saadaan näkyville kaikki tarkasteltavat juuret. Leikkeiden paksuudeksi valitaan 5 μm ja leikkeitä otetaan 5 μm , 50 μm ja 100 μm paksuudelta, kustakin kolme kappaletta. Leikkeet siirretään 50 asteiseen vesihauteeseen, siitä näytelaseille ja kiinnitetään lasiin 55 asteisellä lämpölevyllä.

Leikkeiden tekemisen jälkeen näytteet värjätään. Värjäystä varten valmistetaan veteen laimennettu 0,05 % ruthenium red -liuos, sekä 0,1 M natriumfosfaattipuskuriin laimennettu 0,05 % toluidine blue -liuos. Ruthenium red (ammoniated ruthenium oxychloride) värjää kasvista pektiiniä sisältävät soluseinät punaiseksi. (Mariani Colombo

– Rascio 1997). Toluidine blue (tolonium chloride) värjää sekundäärisen kasvun vaiheessa muodostuvien putkilosolujen selluloosaa ja ligniiniä sisältävät soluseinät kirkkaan siniseksi (Pradhan Mitra - Loqué. 2014). Näytelasit upotetaan ruthenium red – liuokseen noin kuudeksi sekunniksi ja huuhdellaan nopeasti vedellä. Tämän jälkeen näytteet vielä upotetaan neljäksi sekunniksi toluidine blue – liuokseen, huuhdellaan nopeasti vedellä ja annetaan kuivua.

Mikroskopoidessa päälle asetetaan veden avulla peitinlasi. Yleensä poikkileikkkeitä tarkastellaan niiden koosta riippuen joko 20- tai 40-kertaisena suurennoksena ja kuvataan myöhempää analysointia varten.

4 Toteutus

Toteutusvaiheessa käytettiin kaikkia yllä mainittuja menetelmiä. Menetelmien käyttö kuitenkin vaihteli kasvilinjan mukaan, sillä Dof-linjojen tutkimus oli vasta alussa, jolloin niiden tutkimiseen ja analysointiin tarvittiin eri menetelmiä kuin jo tutkimuksissa pidemmälle edenneiden CKX30- ja CKX32-linjojen tarkasteluun. Seuraavissa kappaleissa on kuvattu, miten näitä eri linjoja prosessoitiin.

4.1 Dof-geeniperhe

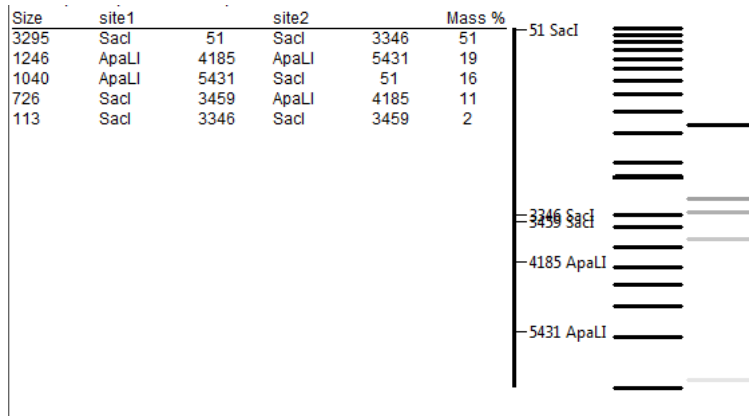
Dof-linjojen tutkimuksessa oli määrä luoda kokonaan uusi transgeeninen kasvilinja tutkimuksia varten. Alla on kuvattu linjan prosessikaavio (kuvio 17).



Kuvio 17. Yksinkertaistettu kaavio Dof-linjojen prosessoinnista.

Dof-geeniperheen tutkiminen aloitettiin valitsemalla mielenkiintoiset geenit, jotka oli määrä transformoida villityyppiä edustaviin kasveihin. Käytän tämän geeniperheen edustajista nimiä Dof1, Dof2 ja Dof3, joista kaksi ensimmäistä edustivat saman geenin eri variantteja DNA-juosteen pituuden suhteen.. Dof-linjojen luomiseen ja tutkimiseen käytimme Thermo Fisher Scientificin MultiSite Gateway 3-Fragment recombination reaction -transformaatiomenetelmää. Vektoriin tarvittiin promoottori, varsinainen geeni, sekä terminaattorialue. Terminaattori ja merkkigeeni oli tehty aiemmin samoilla reaktioilla ja varastoitu myöhempää käyttöä varten, joten teimme nyt vain promoottoria varten tarvittut reaktiot.

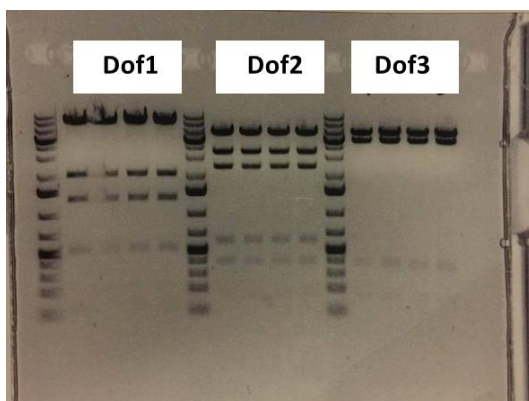
Kun haluttu promoottorialue oli siirretty plasmideihin BP-reaktioissa, tehtiin ensimmäinen digestio (kuvio 18). Dof1- ja Dof2-linjoihin oli siirretty saman geenin promoottori, mutta jälkimmäisessä DNA-juoste oli lyhyempi. Dof2- ja Dof3-geenin sisältäviin plasmideihin käytettiin samoja restriktioentsyymejä, mutta Dof1-plasmidit digestoitiin eri entsyymeillä. Kaikille reaktioille tehtiin sama PCR-ohjelma ja geielektroforeesi.



Kuvio 18. Ohjelman tuottama esimerkkinäkymä plasmidien digestiosta. Vasemmalla näkyy lukuina restriktioentsyymien tuottamien juosteiden koot. Oikeassa laidassa geelielektroforeesierottelun jälkeen odotettavat juosteet "ladderin", eli mallijuosteiden rinnalla.

Onnistuneiden plasmidien digestioiden jälkeen kullekin kloonille tehtiin LR-reaktiot, joiden avulla yhteen samaan plasmidiin siirrettiin kaikki kolme komponenttia. Nämä plasmidit siirrettiin elektroporaatiolla *E. coli*-bakteereihin.

Bakteereille tehtiin vielä uudet digestiot, jotta voitiin varmistaa LR-reaktioiden onnistuminen. Dof2- ja Dof3-linjat digestoitiin tässäkin vaiheessa samoilla entsyymeillä, ja Dof1-linja eri entsyymeillä (kuvio 19).



Kuvio 19. Geelielektroforeesierottelun tuottama näkymä Dof-linjoihin käytettyjen *E. coli*en digestiosta. Juosteita verrataan ohjelman antamaan oletukseen, minkä perusteella arvioidaan digestion onnistumista.

Kun reaktioiden onnistuminen oli todennettu digestoimalla, siirrettiin vektorit agrobakteereihin. Kun siirtovektoria oli kloonattu agrobakteereissa riittävästi, siirrettiin

geeni aiemmin protokollan mukaan kasvatettuihin villityypin kasveihin floral dip – menetelmällä. Näin ne saatiin tuottamaan transgeenisia siemeniä.

Transformoitujen kasvien siemenille sovellettiin keräämisen ja puhdistuksen jälkeen nesteklooristerilointimenetelmää. 15 ml koeputkeen mitattiin noin 0,5 ml siemeniä. Päälle pipetoitiin 4-5 ml Klorin-liuosta ja pari tippaa Tween20-liuosta. Putkea ravisteltiin 5 minuuttia, minkä jälkeen siemenet sentrifugoitiin putken pohjalle. Klorin-liuos kaadettiin pois ja tilalle pipetoitiin sama tilavuus 70 % etanolia, minkä jälkeen putkea taas ravistettiin ja sentrifugoitiin. Kun etanoli oli kaadettu pois, siemenet pestiin samalla tilavuudella MQ-vettä kolmesti. Lopuksi vesi kaadettiin pois ja tilalle pipetoitiin 3 ml 0,15 % agar-geeliä, johon siemenet jätettiin kahdeksi yöksi jääkaappiin.

Steriloiduille ja kylmäkäsitellyille siemenille tehtiin viikon iässä T1-selektio, jotta voitiin valita geeni-insertion sisältävät uudet kasviyksilöt. Selektiossa käytettiin rikkakasvien torjuntaan käytettävää glufosinaatti-ammoniumia sisältävää Basta-valmistetta (Basta. 2007) ja claforan (cefotaxime) -antibioottia ½GM-elatusalustalla suhteessa 50 µg/ml. Selektiota varten T1-siemenet istutettiin kolmelle maljalle yllä mainitulla menetelmällä. Kasvien kasvua tarkkailtiin maljoilla ja henkiin jääneet yksilöt siirrettiin vajaan viikon ikäisinä uusille Basta-maljoille kasvamaan, jotta niillä olisi enemmän tilaa. Siirrettäviä yksilöitä oli yhteensä noin 40 yhtä linjaa kohden.

Dof-linjoissa oli varsinaisen tutkittavan geenin ohella merkkigeeninä fluoresenssia aiheuttava RFP (Red Fluorescent Protein)-geeni, eli punaista fluoresenssia aiheuttava geeni. Fluoresenssigeenin aktivaatio on sidoksissa varsinaisen tutkittavan geenin proteiinisynteesiin, jolloin RFP-ekspression alkamisesta voidaan päätellä myös tutkittavan geenin aktivoituneen. Toisen kasvatusviikon jälkeen kasvien fluoresenssi tarkastettiin, minkä jälkeen kustakin Dof-linjasta istutettiin kasvihuoneelle noin 20 yksilöä yksittäisiin astioihin. Näin ne voitiin eristää toisistaan erityisillä muoviputkilla ja täten varmistaa, että kustakin yksilöstä saatavat siemenet olisivat vain itsepölytteisesti tuotettuja saman yksilön siemeniä. Näitä yksilöitä hyödynnetään mahdollisesti jatkotutkimuksissa.

Kustakin Dof-linjasta otettiin kolme kasviyksilöä värjäystä ja poikkileikkeitä varten. GUS-ekspressiota haluttiin tarkastella eri solukoissa juuren koko pituudelta sen eri

kehitysvaiheista, joten näytteeksi otettiin koko juuri. Tutkimukseen käytettiin kahden viikon ikäisiä Basta-maljalla kasvatettuja kasveja. GUS-värjäyksen ja fiksoinnin jälkeen suoritettiin kudospessointi, valumuottien teko ja leikkaus mikrotomilla. Jälkivärjäykseen käytettiin ainoastaan ruthenium red-liuosta ja näytteitä tarkasteltiin mikroskopoimalla 20x suurennoksella. Juuret kuvattiin ennen fiksointia lateraalisesti, ja fiksoinnin jälkeen vertikaalisesti poikkileikkeinä. Näin saatiin hyvä käsitys GUS-ekspressiosta juuren eri osissa ja täten eri kehitysvaiheita kuvaavaa materiaalia.

4.2 Sytokiniinioksideasigeenin yliekspressiolinjat

Sytokiniinioksideasigeenin yliekspressiolinjoja CKX30 ja CX32 tutkittaessa oltiin aiemmissa vaiheissa jo tehty sama protokolla, joka Dof-linjoille tehtiin. Jatkoin siis aiemmin aloitettua tutkimustyötä (kuvio 20).



Kuvio 20. Yksinkertaistettu kaavio sytokiniinioksideasigeenin yliekspressiolinjojen prosessoinnista.

Sytokiniinioksideasin yliekspressiolinjojen T1-segregaatio oli tehty jo aiemmin kanamysiinimaljoilla ja ensimmäisen sukupolven siemenet kerätty käsittelyä varten. Puhdistin ja steriloin siemenet nestekloorimenetelmällä, minkä jälkeen niitä kylmäkäsiteltiin jääkaappilämpötilassa 2 vuorokautta. Kasvatuksessa käytettiin

kanamysiiniä sisältävää ½GM-alustaa, jonka vahvuus oli 50 µg/ml. Kutakin linjaa istutettiin noin 40 - 60 siementä riviä kohden.

Kanamysiinimaljoilla viikon kasvaneille CKX30- ja CKX32-linjoille tehtiin T2-selektio, jossa valittiin yhden insertion linjat. CKX30-linjasta valittiin selektion perusteella jatkoon linjat 1, 6, 11, 14 ja 17 (Liite 1). CKX32-linjasta valittiin linjat 1, 2, 3, 9, 15, 16, 18 ja 20 (Liite 2.) Kustakin linjasta istutettiin 17 yksilöä kasvihuoneelle tuottamaan siemeniä seuraavaa selektiota varten.

Kun T2-selektiossa valittujen linjojen istutetut yksilöt olivat tuottaneet itsepölytteisesti siemeniä, valittiin kustakin linjasta summittaisesti kuusi edustajaa, joille tehtiin keräyksen ja puhdistuksen jälkeen kaasuklooristerilointi. Siemenet kylmäkäsiteltiin kuten edellä ja istutettiin kanamysiinimaljoille. Sitten niille tehtiin T3-selektio kanamysiinimaljoilla. Selektion perusteella homotsygooteiksi linjoiksi osoittautuivat linjat CKX30 1-12, 6-2, 11-1, 11-10, 14-5, 17-1 ja 17-3 (Liite 3.), sekä CKX32 1-2, 1-3, 3-9, 3-10, 9-1, 9-5, 18-4 ja 20-7 (Liite 4.). Kustakin linjasta valittiin viisi yksilöä istutettavaksi kasvihuoneelle siementuotantoon. Lisäksi valituista linjoista, sekä villityyppiä edustavasta Columbiasta istutettiin kustakin 20 siementä maljaa kohden ½GM-alustoille kasvamaan neljäksi päiväksi, minkä jälkeen itäneistä taimista puolet siirrettiin estradiolimaljalle indusoitavaksi ja puolet DMSO-maljoille kontroleiksi. Kasveja kasvatettiin uusilla maljoilla kuusi päivää, jolloin kasvit olivat leikattaessa ja fiksoitaessa kymmenen vuorokauden ikäisiä

Tutkittujen linjojen kasveissa oli estradiolilla indusoitava geeni, jonka vaikutuksesta sytokiniinioksidaasin vaikutus lisääntyy. Kokeessa haluttiin tutkia kasvin sekundääriseen kasvuun vaikuttavia tekijöitä, joten segregaatioissa homotsygooteiksi todettuja siemeniä ei suoraan istutettu estradiolimaljalle, vaan annettiin ensin kasvaa neljä päivää ½GM-maljalla. ½GM-maljalla siirretty geeni ei ekspressoitu, jolloin kasvit kasvoivat normaalisti. Siemeniä istutettiin linjaa kohden noin 20 kappaletta. Kasveja kasvatettiin neljä päivää ½GM –maljoilla ja 6 päivää estradioli- ja DMSO-maljoilla.

Linjoihin oli geenisiirron yhteydessä siirretty myös tutkittavaan geeniin kytketty ja siten sen aktivoitumista ilmaiseva fluoresenssia aiheuttava geeni. CKX30-linjaan oli siirretty jälsispesifinen XVE-konstrukti, kun taas CKX32-linjan yksilöillä oli kaikkialla kudoksessa ilmenevä XVE-konstrukti kukkakaalimosaiikkiviruksesta saadun promoottorin

alaisuudessa. Heti indusoinnin aloittamisen jälkeen kasvien fluoresenssi tarkastettiin ja tutkittavan sytokiniinioksidaasigeenin todettiin fluoresenssin perusteella aktivoituneen halutuissa solukoissa molemmilla linjoilla estradiolimaljoilla.

Linjoista haluttiin ainoastaan tutkia ja vertailla juuren paksuuksia eri linjojen ja eri maljoilla kasvaneiden saman linjan edustajien välillä. Tarkastelu suoritettiin 0,5 cm päästä hypokotyylialueesta, jolloin juuresta riitti pieni pätkä. Koska näytteeksi ei tarvittu koko juurta, sivujuurten ja hypokotyylialueen yläpuolelle jäävän osan leikkaamisen jälkeen juuren tyvestä leikattiin noin 2-3 cm pala fiksointia varten. Fiksoinnin, kudosprosessoinnin, valumuottien tekemisen ja mikrotomilla leikkaamisen jälkeen näytteet värjättiin ruthenium red- ja toluidine blue – liuoksilla.

5 Tulokset

Sekä Dof-linjoissa, että CKX30- ja CKX32-linjoissa tarkasteltiin silmämääräisesti RFP-ekspression voimakkuutta ja mahdollista kudosspesifisyyttä. Tämän lisäksi Dof-linjoissa tarkasteltiin koko juuresta GUS-ekspression voimakkuutta, sijaintia ja alkamisajankohtaa. CKX30- ja CKX32-linjojen analysointia varten mitattiin juurten paksuus 0,5 cm hypokotyylialueen alapuolelta, sekä juurten pituus kahdessa eri kasvuvaiheessa.

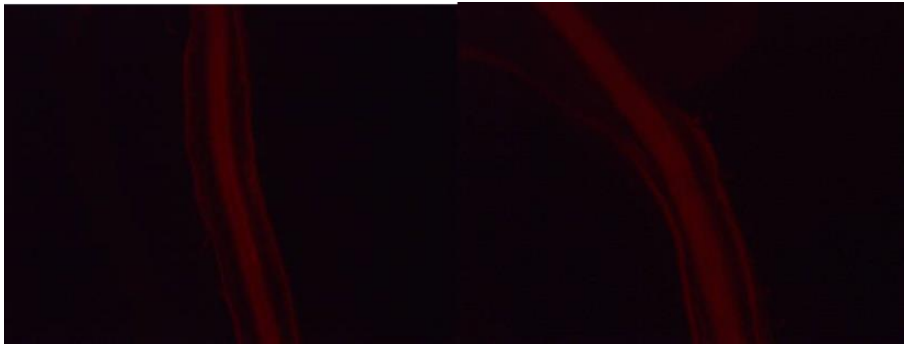
5.1 Dof-linjat

Dof-linjoissa tarkastelun kohteena oli ennen kaikkea GUS-värjäyksen avulla ilmenevät geenin ekspressioalueet, eli määränpäänä oli selvittää, missä solukossa tutkittavat geenit aktivoituvat. GUS-ekspression lisäksi niistä tarkasteltiin myös fluoresenssin ilmenemistä.

5.1.1 Fluoresenssi

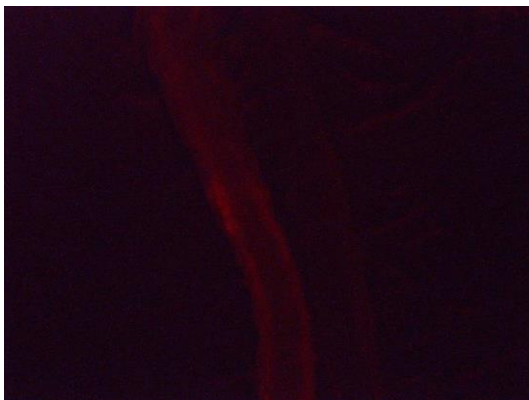
Dof-linjoissa ei ollut indusoitavaa geeniä, jolloin ekspressiota ja siten fluoresenssia aiheuttava geeni oli aktiivisena jatkuvasti Basta-maljallakin. Fluoresenssia tarkasteltiin kaikista kasveista koko juuresta samoilla suurennos- ja valotusasetuksilla, jotta niiden RFP-ekspressiota voitiin vertailla keskenään ja selvittää, missä geeni ekspressoituu.

Tarkastelu tehtiin kahdeksan päivän ikäisille kasveille, jotka oli siirretty uusille Basta-maljoille. Dof1- ja Dof2-linjoilla ekspression odotettiin ilmenevän jälsisolukossa, sillä niihin siirretty geeni oli oletettavasti johtosolukkospesifinen. Lateraalisista kuvista voi päätellä, että ekspressio ilmeni juuri jälsisolukossa ja fluoresenssi oli selvästi erottuva (kuvio 21).



Kuvio 21. Lateraalinen kuva Dof1- ja Dof2-linjojen juuren tyven RFP-ekspressiosta. Vasemmalla Dof1.

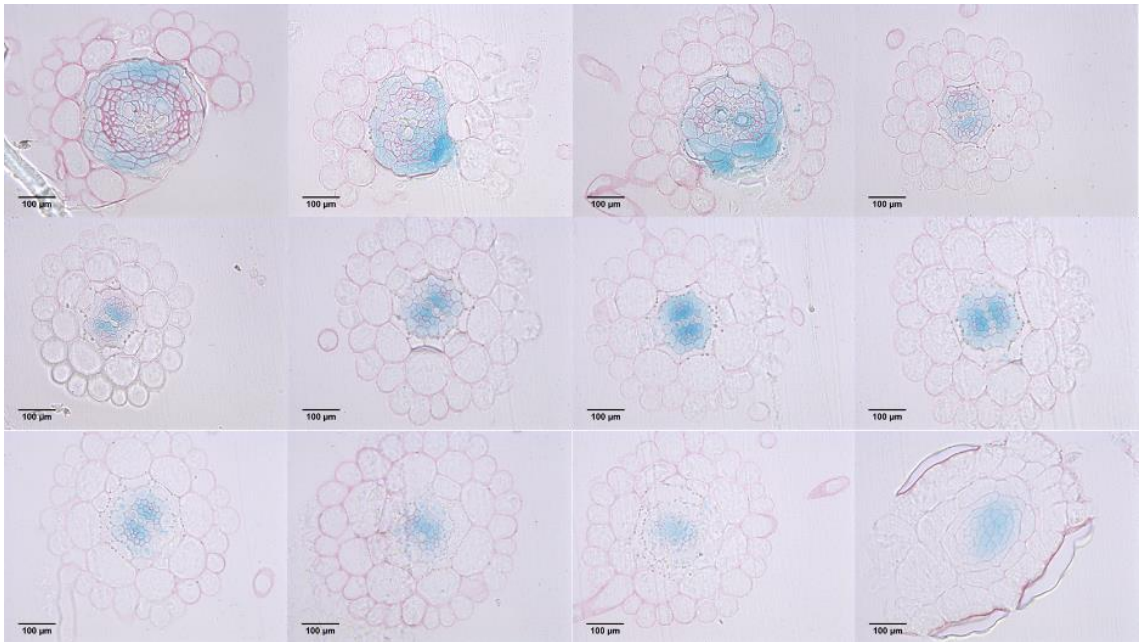
Dof3-linjan RFP-ekspressio oli ensimmäisellä tarkastelukerralla hyvin heikko (kuvio 22), joten siirsimme viikon ikäisiä taimia sytokiniinimaljalle kasvamaan. Sytokiniinin vaikutuksesta RFP-ekspressio voimistui huomattavasti aiemmasta.



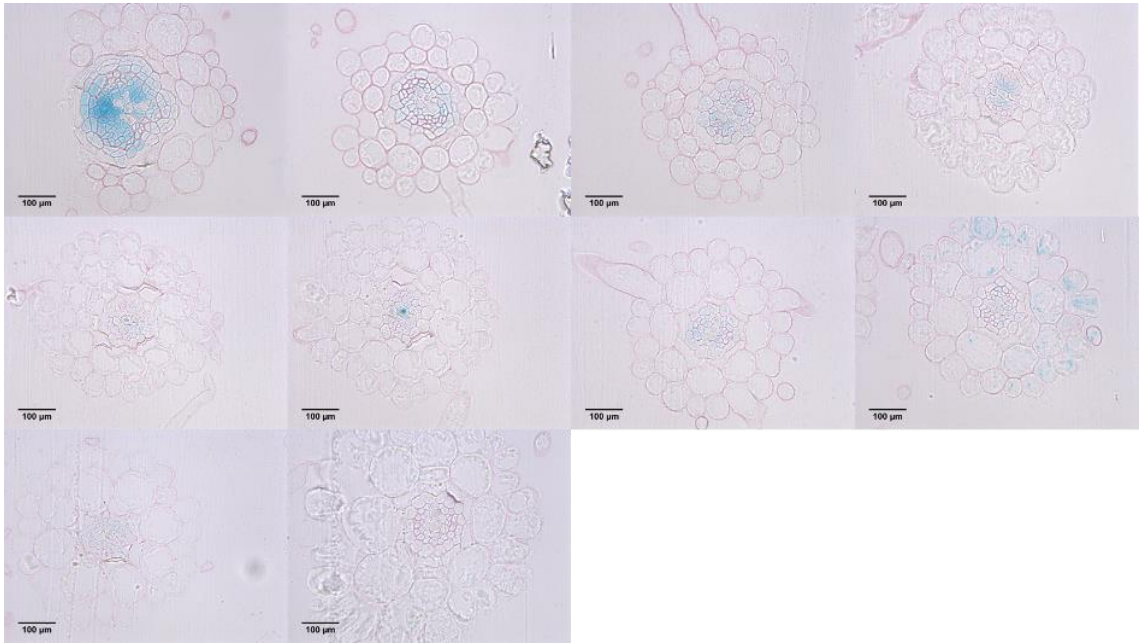
Kuvio 22. Lateraalinen kuva Dof3-linjan juuren tyven RFP-ekspressiosta.

5.1.2 GUS-ekspressio

Dof1- ja Dof2-linjoissa GUS-ekspression odotettiin näkyvän jälsisolukossa, sillä niihin siirretty geenin toivottiin olevan spesifi kyseisille soluille. Molemmista linjoista parenkyymisolukko oli värjäytynyt, mutta Dof2:ssa ekspressio oli heikompi juuren nuoremmista osissa (kuvio 23 ja 24). Lateraalista kuvista erottui myös hyvin, kuinka juuren kärjen parenkyymisolukko värjäytyi voimakkaasti (kuvio 25).



Kuvio 23. Dof1-linjan GUS-ekspressio poikkileikkeissä koko juuren pituudelta. Etäisyydet hypocotyylistä vasemmalta ylhäältä oikealle alas: 0,5 cm, 0,9 cm, 1,2 cm, 1,5 cm, 1,8 cm, 2,1 cm, 2,4 cm, 2,7 cm, 3,0 cm, 3,3 cm, 3,6 cm ja 3,9 cm.

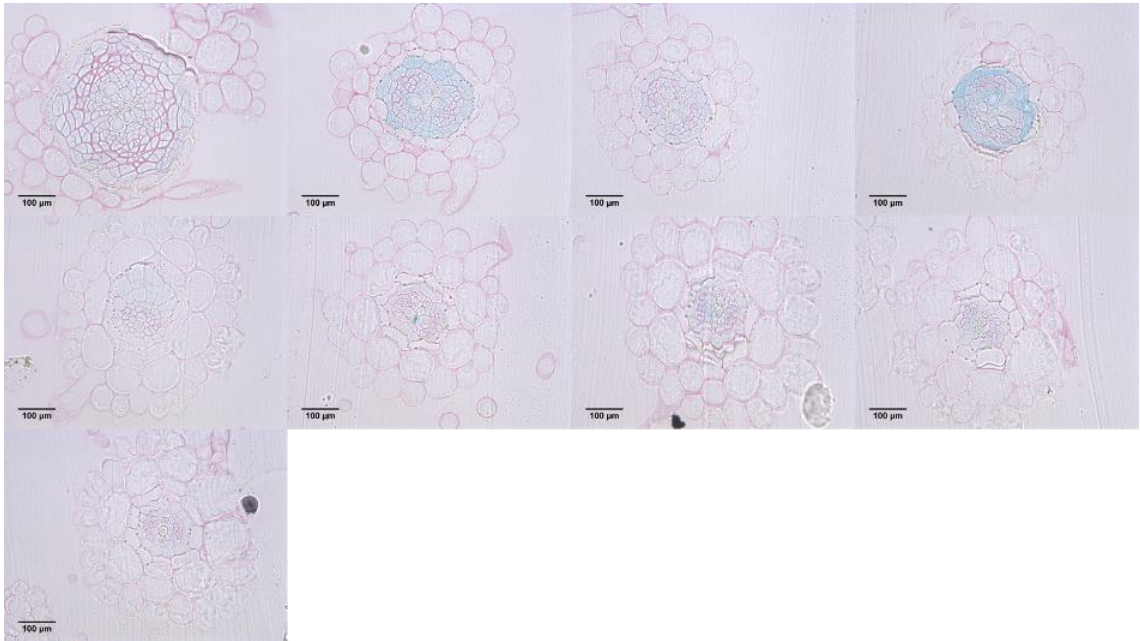


Kuvio 24. Dof2-linjan GUS-ekspressoio poikkileikkeissä koko juurten pituudelta. Etäisyydet hypokotyylistä vasemmalta ylhäältä oikealle alas: 0,5 cm, 0,9 cm, 1,2 cm, 1,5 cm, 1,8 cm, 2,1 cm, 2,4 cm, 2,7 cm, 3,0 cm ja 3,3 cm.

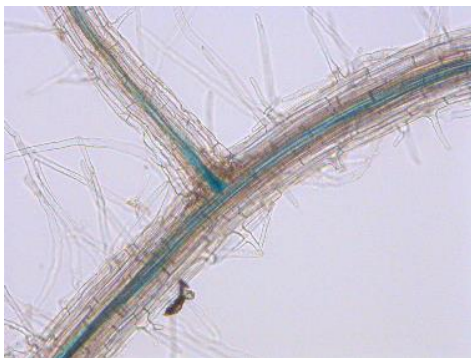


Kuvio 25. Lateraalinen kuva Dof1- ja Dof2-linjan GUS-ekspressiosta. Vasemmalla Dof1.

Dof3 -linjassa GUS-ekspressiota näkyi kaikissa juuren solutyypeissä, mutta vain vanhimmassa juuren osassa. Dof3-linjaa jouduttiin inkuboimaan huomattavasti muita pidempään GUS-värjäysliuoksessa heikon värjäytyvyyden takia, mutta siitäkään huolimatta kaikki juuret eivät värjäytyneet kunnolla (kuvio 26 ja 27).

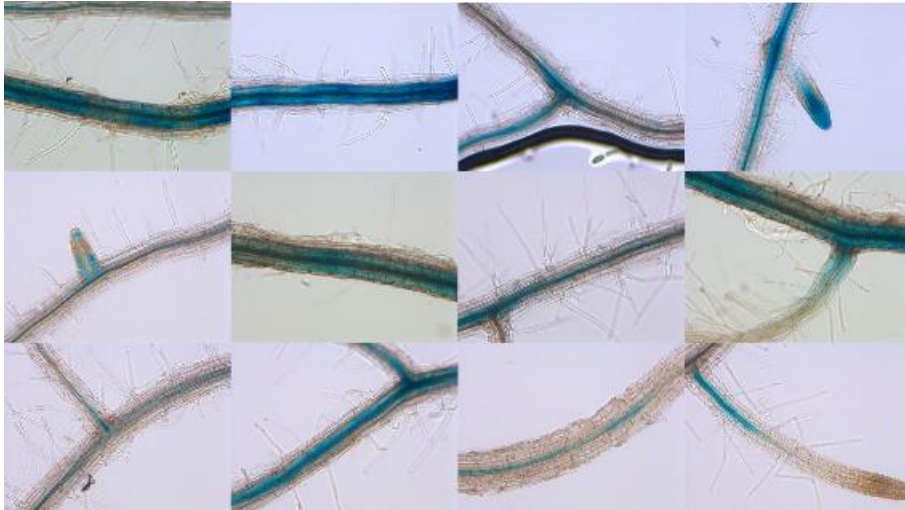


Kuvio 26. Dof3-linjan GUS-ekspressoio poikkileikkeissä koko juurten pituudelta. Etäisyydet hypokotyylistä vasemmalta ylhäältä oikealle alas: 0,5 cm, 0,9 cm, 1,2 cm, 1,5 cm, 1,8 cm, 2,1 cm, 2,4 cm, 2,7 cm ja 3,0 cm.



Kuvio 27. Lateraalinen kuva Dof3-linjan GUS-ekspressiosta.

Vertailemalla kaikkien Dof-linjojen lateraalisia kuvia niiden GUS-ekspressiosta, voidaan havaita että Dof1-linjan juurissa juurten kärjet ja johtojänteiden sivujuuria muodostavat osat ovat värjäytyneet voimakkaimmin. Dof2-linjassa juuren kärki ei värjäydy yhtä selkeästi. Dof3-linja värjäytyi heikoimmin, eikä GUS-ekspressoio ole lainkaan havaittavissa juurten kärkiosissa (kuvio 28).



Kuvio 28. Dof-linjojen GUS-ekspression vertailu lateraalisista kuvista. Ylärivissä Dof1, keskellä Dof2 ja alhaalla Dof3.

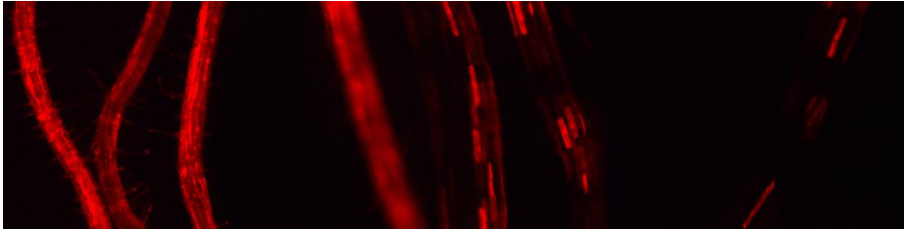
5.2 Estradioli-indusoidut sytokiniinioksidaasigeenin yliekspressiolinjat

Selektioissa tutkittaviksi homotsygooteiksi linjoiksi lopulta valikoituivat CKX30 1-12, 6-2, 11-1, 11-10, 14-5, 17-1 ja 17-3, sekä CKX32 1-2, 1-3, 3-9, 3-10, 9-1, 9-5, 18-4 ja 20-7. Näistä tarkkailtiin ensin RFP-ekspressiota, että primääri- ja sekundäärikasvua.

5.2.1 Fluoresenssi

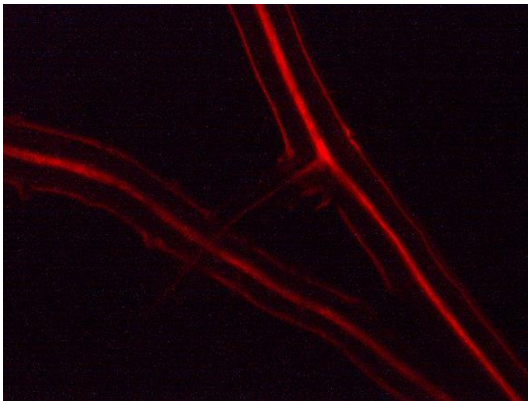
CKX30- ja CKX32-linjojen fluoresenssia tarkasteltiin 5 päivän ikäisistä kasveista pian estradioli- ja DMSO-maljoille siirtämisen jälkeen. DMSO-kontrollimaljoilla ei näkynyt ekspressiota, kuten oletettiin. Estradiolimaljoille siirrettyillä yksilöillä indusoitava geeni oli sen sijaan alkanut heti ekspressoitumaan ja tuottamaan näkyvää fluoresenssia. Kontrollina toimivilla villityypin edustajilla ei näkynyt fluoresenssia.

CKX32-linjassa merkkigeeni ekspressoituu kaikissa juuren soluissa eikä ole kudosspesifinen, jolloin fluoresenssi ekspressoituu kaikkialla juuressa. Fluoresenssi oli voimakas kaikissa juurissa, eikä kovin huomattavia eroja yksilöiden välillä ilmennyt. Heikoin se oli linjoissa CKX32 9-1, 9-5 ja 20-7, mutta oli siitä huolimatta selkeästi ilmentynyt. Fluoresenssi heikkeni juuren kärkeä kohden, mutta oli kuitenkin havaittavissa koko pituudelta (kuvio 29).

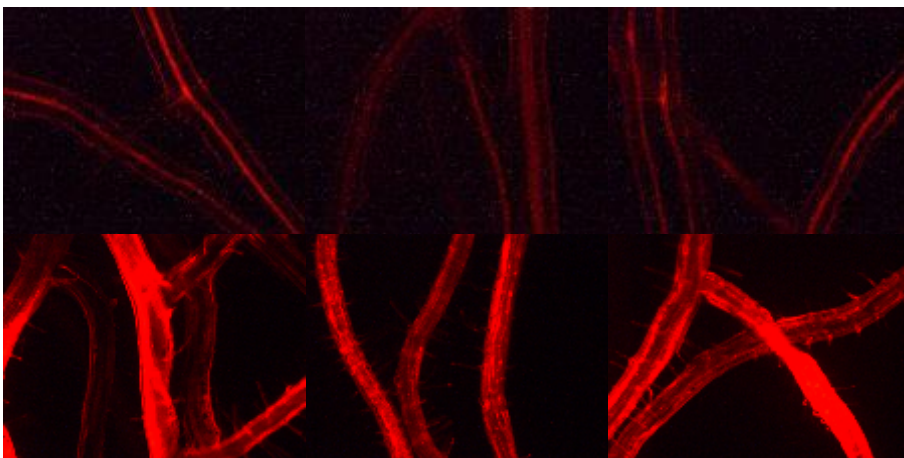


Kuvio 29. CKX32-linjan RFP-ekspressio juuren eri osissa. Vasemmalta oikealle: juuren tyvi, juuren keskiosa ja juuren kärki.

Sen sijaan CKX30-linjassa fluoresenssin aikaansaava promoottori oli jäälispesifinen (kuvio 30). Fluoresenssi näkyikin hyvin juuri jäälisolukossa juuren keskellä. Fluoresenssi oli heikempi kuin linjalla CKX32, ja CKX30-linjan yksilöiden välillä oli jonkin verran eroa. Ekspressio kuitenkin näkyi kaikissa linjoissa. Heikoin ekspressio ilmeni linjassa CKX30 1-12 ja vahvin linjoissa CKX30 17-1 ja 17-3 (kuvio 31).



Kuvio 30. Lateraalinen kuva CKX30-linjan RFP-ekspressiosta.



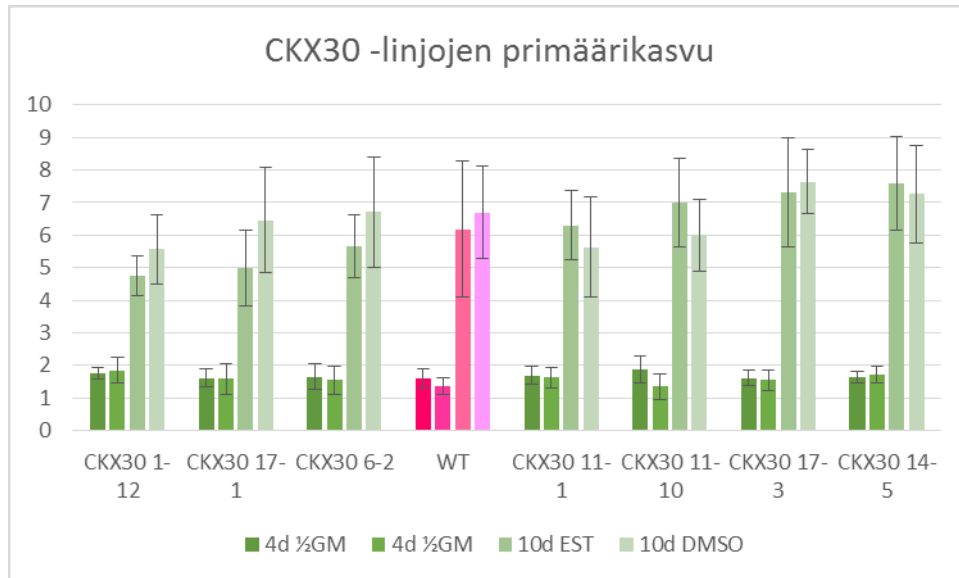
Kuvio 31. CKX30- ja CKX32-linjojen vertailu. Ylärivissä näkyy CKX30-linjan jälsispesifinen RFP-ekspressio ja alarivissä CKX32-linjan RFP-ekspressio. Kuvat on otettu kasvien juurten tyvialueelta.

5.2.2 Kasvu

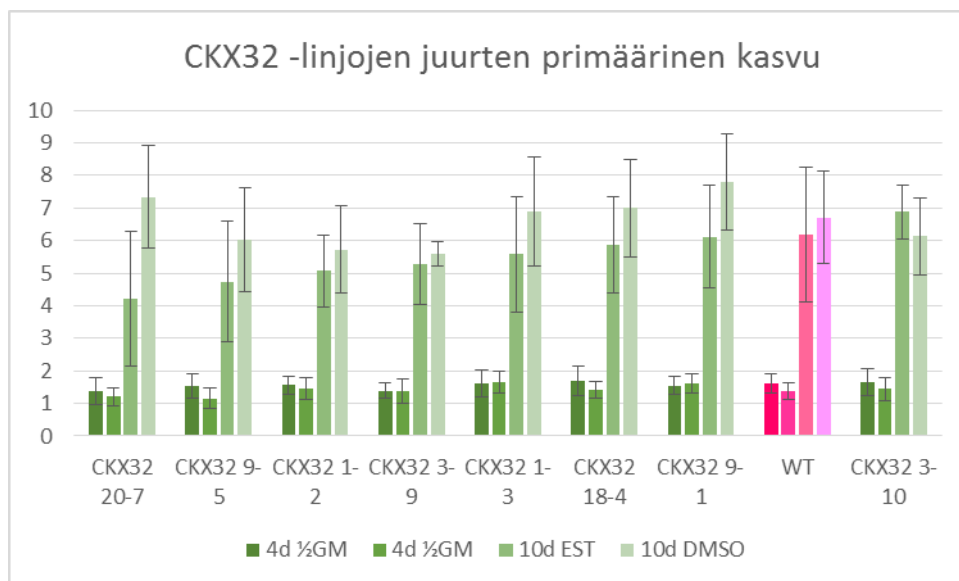
Juuret analysoitiin Image-J-ohjelman avulla. Juurten kärjet merkittiin maljoille heti estradioli- ja DMSO-maljoille siirron jälkeen neljän päivän iässä, sekä uudelleen 10 päivän iässä. Näin voitiin tarkastella estradioli-indusoinnin vaikutusta juurten pituuskasvuun. Pituuskasvua pidetään merkittävänä indikaattorina kasvin kasvusta ja hyvinvoinnista ja sitä voidaan hyödyntää pohdittaessa, johtuuko kasvin sekundääriseissä kasvussa havaittava näennäinen fenotyyppi yleisestä kasvun heikkoudesta vai vain sekundääriseen kasvuun vaikuttavista tekijöistä. Sekundääriseen kasvuun arviointia varten kymmenen päivän ikäisistä kasveista tehtiin leikkeet 0,5 cm hypokotyylialueen alapuolelta. Paksuus mitattiin tekemällä lineaarinen viiva akselille primäärinila – puuakselin keskiosa – primäärinila. Sekä juurten pituuksista, että paksuuksista laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat (Liite 5. ja Liite 6.) Vain sekundääriseen kasvuun analysointia varten suoritettiin Studentin t-testit SPSS-analyysiohjelmalla. Primääriskasvussa saattaa olla luonnostaan paljon hajontaa, joten Studentin t-testiä ei pidetty tarpeellisena, vaan silmämääräisen arvioinnin koettiin riittävän niiden analysointiin.

Juurten pituuksissa eri maljoilla kasvatettuna ei ole havaittavissa silmämääräisesti merkittäviä eroja ensimmäisen neljän päivän jälkeen missään linjoissa, kun kaikkia kasveja oli kasvatettu ½GM-maljoilla, eikä hajontaa vielä esiinny paljonkaan. Linjassa CKX32 20-7 oli eniten vaihtelua ja estradiolimaljalla kasvaneet yksilöt erosivat DMSO-maljalla kasvaneista kontrollikasveista keskimäärin -3 cm. Keskimäärin lyhin estradioli-indusoitu CKX30-linja oli CKX30 1-12 (ka=4,75 cm) ja pisin CKX30 14-5 (ka=7,59 cm), joiden välillä eroa 2,8 cm (kuvio 32). Estradiolilla indusoiduista CKX32-linjoista lyhin oli CKX32 20-7 (ka=4,21 cm) ja pisin CKX32 3-10 (ka=6,89 cm), joiden keskiarvoisten pituuksien väli oli 2,7 cm (kuvio 33). Hajontaa oli kaikissa linjoissa niin paljon, ettei eroja voida pitää kovin merkittävinä.

Lisäksi huomattiin, että linjassa CKX30 1-12 ilmeni kasvun suhteen poikkeava fenotyyppi. Juurten kärjet näyttivät kiertyvän ja kasvavan eri suuntiin, kun ne normaalisti pyrkivät kasvamaan melko suoraan alaspäin.



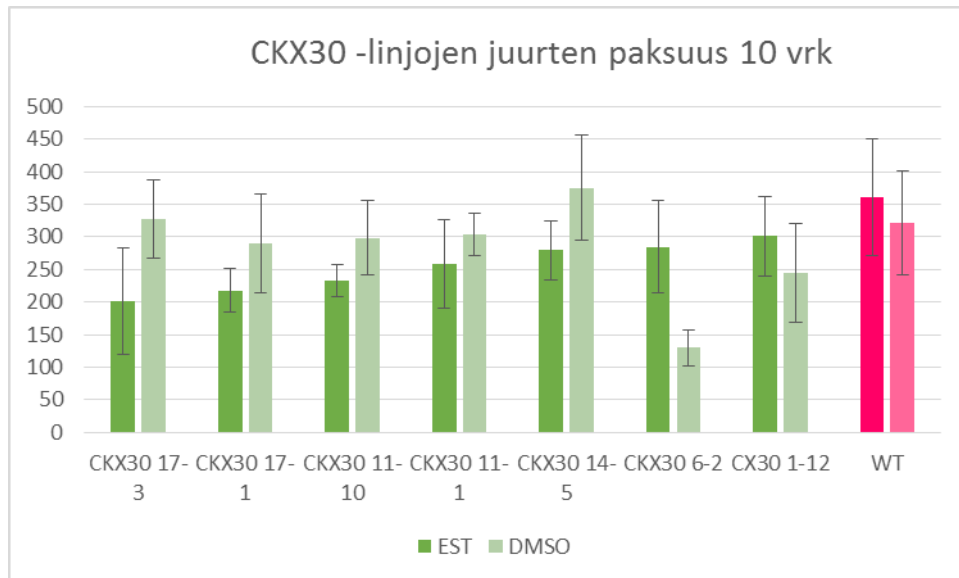
Kuvio 32. CKX30-linjan juurten kasvua havainnollistava kuvaaja. Villityypin edustaja on merkitty vaaleanpunaisella.



Kuvio 33. CKX32-linjan juuren kasvua havainnollistava kuvaaja. Villityyppiä edustava Columbia on merkitty vaaleanpunaisella.

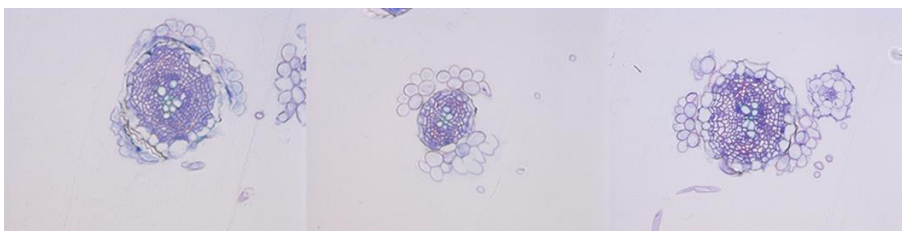
Useissa CKX30-linjoissa estradiolimaljalla kasvaneet juuret olivat jääneet DMSO-maljalla kasvaneita verrokkeja ohuemmiksi, paitsi linjoissa CKX30 6-2 ja CKX30 1-12. Ohuin estradiolilla indusoitu linja oli CKX30 17-3 ($\mu\text{ka}=201,4 \mu\text{m}$) ja paksuin oli Columbia ($\mu\text{ka}=360,9 \mu\text{m}$). Studentin t-testillä analysoituna merkitseviä tilastollisia eroja DMSO- ja estradiolimaljoilla kasvaneiden kasvien välillä oli linjoissa CKX30 17-3 ($p=0,002$), CKX30

14-5 ($p=0,004$) ja CKX30 6-2 ($p=0,000$). Estradiolilla indusoitujen mutanttilinjojen ja Columbian välillä merkitseviä eroja löytyi linjoista CKX30 17-3 ($p=0,002$), CKX30 17-1 ($p=0,001$) ja CKX30 11-10 ($p=0,002$) (kuvio 34).



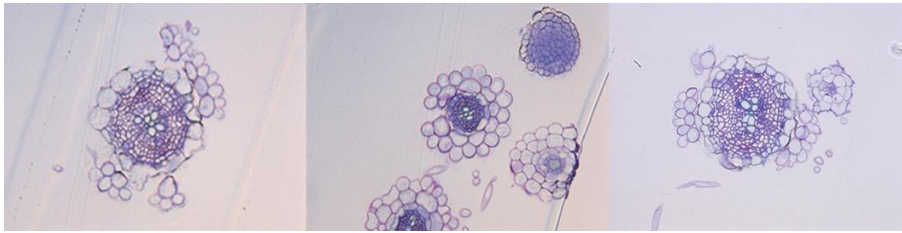
Kuvio 34. CKX30-linjan juurten paksuus estradioli- ja DMSO-maljoilla kymmenen päivän iässä. Villityypin edustava Columbia on merkitty vaaleanpunaisella.

Linjassa CKX30 17-3 estradiolilla kasvaneet juuret jäivät keskimäärin 127 µm DMSO-maljalla kasvaneita saman linjan kontrollikasveja ohuemmiksi, ja 160 µm villityypin estradiolimaljalla kasvaneita kontrollikasveja ohuemmiksi. Tämä näkyi myös poikkileikkeissä fenotyypinä (kuvio 35).



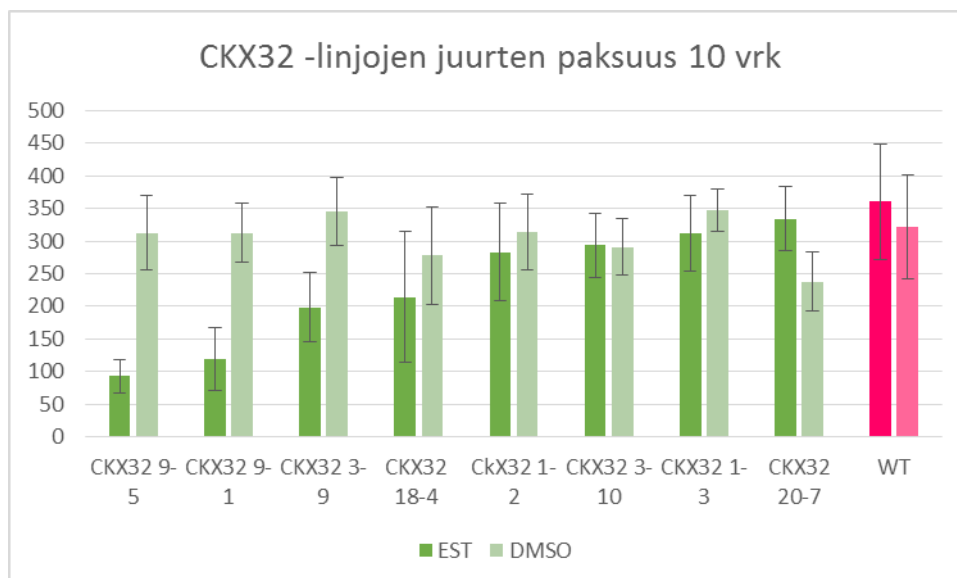
Kuvio 35. Linjassa CKX30 17-3 näkyi selvä muutos estradioli- ja DMSO-maljoilla kasvaneiden juurten välillä. Vasemmalla DMSO-maljalla ja keskellä estradiolimaljalla kasvanut juuri. Oikealla on villityypin edustaja vertailua varten. Kuva on 20x suurennos alkuperäisestä.

Etenkin linjassa CKX30 6-2 maljojen väliset erot olivat suuret ja päinvastaiset hypoteesiin nähden. Estradiolilla indusoitu juuri oli paksuudeltaan keskimäärin 155 µm DMSO-maljalla kasvaneeseen verrattuna (kuvio 36).



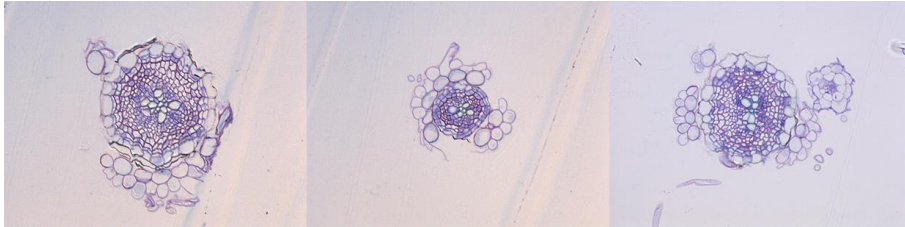
Kuvio 36. CKX30 6-2-linjan juuret. Vasemmalla estradioli-indusoitu juuri, keskellä DMSO-maljalla kasvaneita kasveja ja oikealla villityypin edustaja vertailua varten. Kuva on 20x suurennos alkuperäisestä.

Linjoissa CKX32 3-9 ($p=0,000$), CKX32 9-1 ($p=0,000$) ja CKX32 9-5 ($p=0,000$) estradioli on saanut aikaan insertoidun geenin ekspansion ja täten erittäin merkitseviä muutoksia DMSO- ja estradiolimaljojen välillä. Geenin aktivoitumisen vaikutuksesta sekundäärinen kasvu on hidastunut tai loppunut kokonaan. Suurin ero eri maljoilla kasvatettujen kasvien juurten paksuuksien välillä oli linjalla CKX32 9-5 ($k_a=92,5$ cm), jonka estradioli-indusoidut juuret olivat jääneet jopa keskimäärin $220 \mu\text{m}$ ohuemmiksi kuin DMSO-verrokeilla ($k_a=312,3$ cm), ja $269 \mu\text{m}$ ohuemmiksi kuin estradiolilla kasvatettujen villityypin edustajien ($k_a=360,9$ cm) juuret. Myös villityyppiin nähden merkitseviä tilastollisia poikkeamia löytyi linjoista CKX32 9-5 ($p=0,000$), CKX32 9-1 ($p=0,000$) ja CKX32 3-9 ($p=0,000$). Villityypin kasvuun estradioli ei sen sijaan vaikuttanut (kuvio 37).



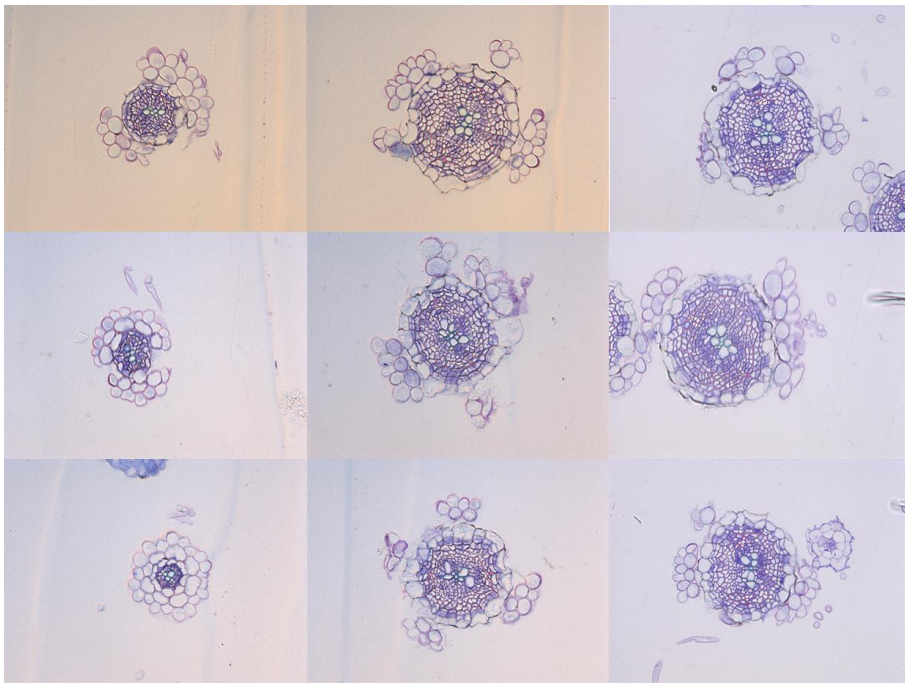
Kuvio 37. CKX32-linjan juurten paksuus estradioli- ja DMSO-maljoilla kymmenen päivän iässä. Villityyppiä edustava Columbia on merkitty vaaleanpunaisella.

CKX32 20-7 – linjassa on muutaman CKX30-linjan tapaan hypoteesiin nähden päinvastaisia lukemia, eli DMSO-maljalla kasvatettu linja erosi estradiolilla indusoidusta verrokista -97,7 cm ja eri maljoilla kasvaneiden kasvien välillä oli tilastollisesti melko merkitseviä eroja ($p= 0,002$) (kuvio 38).



Kuvio 38. CKX32 20-7 –linja. Vasemmalla tietojen mukaan estradioli-indusoitu ja keskellä DMSO-maljalla kasvanut juuri. Oikealla villityypin edustaja vertailua varten.

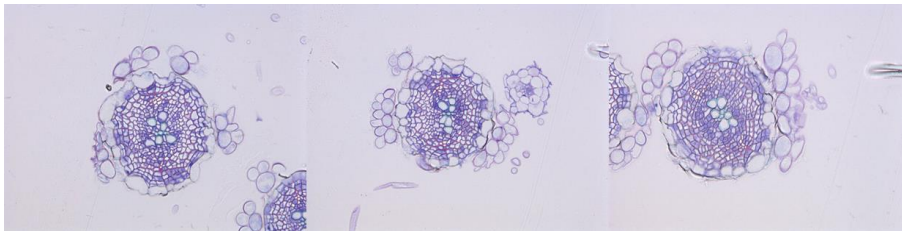
Poikkileikkeistä tarkasteltiin myös mahdollisia fenotyyppieroja estradioli- ja DMSO-maljoilla kasvaneiden yksilöiden välillä. Selviä fenotyyppien eroja löytyi ainakin linjoista CKX32 3-9, 9-1, 9-5, joissa estradiolilla kasvaneet yksilöt olivat silminnähten pienempiä ja kehittymättömpiä. Estradioli-indusoiduilla juurilla oli monesti vielä kuorikerros ympärillään, vaikka se normaalisti irtoaa sekundäärisen kasvun edetessä (kuvio 39).



Kuvio 39. Estradioli- ja DMSO-maljoilla kasvaneiden linjojen vertailua. Kaikki kuvat on otettu 20 kertaisena suurennoksena. Estradiolilla indusoidut juuret ovat kuvan vasemmalla puolella, keskivivissä on DMSO-maljalla kasvaneita kasveja ja oikean puolimmaisessa

rivissä on villityypin edustajia vertailua varten. Linjat ylhäältä alas: CKX32 3-9, CKX 32 9-1 ja CKX32 9-5.

Kontrollina toimivat villityypin edustajat olivat odotetusti keskenään melko saman kokoisia siitä huolimatta, millä maljoilla ne olivat kasvaneet. Samalla maljalla kasvaneilla juurilla oli jonkin verran koon vaihtelua, mikä on kuitenkin täysin luonnollista (kuvio 40).



Kuvio 40. Villityyppiä edustavia Columbia-kasvin juuria. Vasemmalla reunimmaisena on DMSO-maljalla kasvatetun kasvin juuri ja keskellä ja oikealla estradiolimaljalla kasvatettujen kasvien juuria. Eri maljoilla kasvaneiden yksilöiden välillä ei ollut merkittävää eroa.

6 Johtopäätökset ja pohdinta

6.1 Dof-linjat

Dof1- ja Dof2-linjojen RFP-ekspressio oli tarkasteltaessa melko voimakas ja jälsispesifinen, kuten hypoteesissa oltiin oletettu. Näihin linjoihin siirretyn geenin promoottori oli muuten sama, mutta siirretty DNA-juoste oli Dof2-linjassa lyhempi. Tämän takia linjojen RFP-ekspressiot ovat keskenään melko samanlaiset. Dof3-linjan RFP-ekspressio poikkesi kahdesta edeltävästä, sillä se ei ollut jälsispesifinen. Ekspressio oli hyvin heikko ensimmäisellä tarkastelukerralla, mutta konfokaalimikroskoopilla tarkasteltuna näkyi kuitenkin selvät viitteet ekspressiosta, joten päätimme kokeilla sytokiniini-indusointia siirtämällä kasvit sytokiniinimaljalle. Sytokiniinikäsittely sai heti aikaan RFP-ekspression voimistumisen.

Dof1- ja Dof2-linjojen GUS-ekspression intensiteetin vaihteluista havaittiin, että geeni ilmentyi parenkymisolukossa molemmissa linjoissa, mutta Dof2-linjassa värjäytyminen vaikutti heikommalta. Vanhemmat juuren osat olivat värjäytyneet paremmin. Dof3-linjan GUS-värjäys tuotti vaikeuksia, sillä vain osa juurista värjäytyi ja niitä piti inkuboida huomattavasti kauemmin kuin Dof2- ja Dof3-linjojen juuria. Juurten paksuudesta ja

pituudesta, sekä poikkileikkeistä näkyvästä solukosta päätellen näytti siltä, että vain kehityksellisesti vanhimmat juuren osat värjäytyivät. Näissä osissa myös sekundäärinen kasvu oli edennyt pidemmälle. Tästä voidaan mahdollisesti päätellä, että kyseinen geeni aktivoituu vasta sekundäärisen kasvun aikana ja vaikuttaisi siten ennen kaikkea juuren paksuuskasvuun. Värjäytyneiden juurien poikkileikkeistä huomattiin, että väri ja siten geeni ekspressoitui aktivoituttuaan kaikkialla solukossa.

Kaikissa Dof-linjoissa oli havaittavissa jonkinlainen RFP- ja GUS-ekspressio, mistä voidaan päätellä transformaation onnistuneen. Dof-linjojen GUS-ekspressiota tutkittaessa tutkimusotos oli todella pieni, sillä leikkeet tehtiin vain kolmesta yksilöstä linjaa kohden. Tarkoituksena olikin vain todentaa, että transformaatioprosessi on kaikkiaan onnistunut ja tarkistaa geenin ekspresion sijainti.

6.2 Estradioli-indusoidut sytokiniinioksidaasigeenin yliekspressiolinjat

Linjoissa CKX32 9-1 ja CKX30 9-5 oli heikoin RFP-ekspressio, sekä suurimmat erot DMSO- ja estradiolimaljoilla kasvaneiden kasvien juurten välillä. DMSO-maljalla fluoresenssia ei muodostu laisinkaan estradiolin puuttuessa, joten indusoitava geeni käynnistää fluoresenssin muodostumisen aktivoituessaan. Tällöin olisi oletettavissa, että paksuuden suhteen voimakkaimmissa fenotyypeissä olisi voimakkain RFP-ekspressio. Havainto ei kuitenkaan tue oletusta. Juuret olivat hyvin ohuita, jolloin yksinkertaisesti pienemmän biomassan vuoksi fluoresoivaa solukkoa on vähemmän ja siten fluoresenssi näyttää heikommalta. RFP-ekspressiota tarkasteltiin vain silmämääräisesti, joten mitään spesifiä mittaria fluoresenssin voimakkuudelle ei ole. Kuitenkin estradiolimaljalla voimakkaimman fenotyypin kehittäneessä linjassa CKX30 17-3 ilmentyi voimakkain fluoresenssi. Eri linjojen tulokset ovat ristiriitaisia, minkä voisi arvioida johtuvan siirrettyjen geenien erilaisista ekspressioista. Koska esimerkkejä on tässä tapauksessa hyvin vähän pienen otoksen vuoksi, ei voida sulkea pois sattuman merkitystä.

Estradioli-indusoitujen juurten oletettiin jäävän verrokkeja ohuemmiksi, mikäli geeni ekspressoituu odotetulla tavalla. Sen sijaan primääriseen eli pituuskasvuun estradiolilla ei pitäisi olla merkittävää vaikutusta, jolloin saman linjan juurten pituuksien ei pitäisi vaihdella merkittävästi siitä huolimatta, olivatko ne kasvaneet estradioli- vai DMSO-maljalla. Siitä huolimatta että estradioli-indusoinnilla ei pitäisi olla vaikutusta kasvin pituuskasvuun, lähes kaikissa linjoissa DMSO-maljoilla kasvatetut yksilöt olivat pidempiä

kuin estradiolilla indusoidut linjat. Eroja ei kuitenkaan tarkasteltu Studentin t-testillä, joten erojen merkitsevyys jäi selvittämättä. Villityypin edustajaan verrattuna linjoissa ei ollut silmämääräisesti merkittäviä pituuseroja.

Juurihunnun solujen sisällä oleva tärkkelysjuväset aktivoivat soluseinää kasvamaan niissä kohdin, mihin ne osuvat. Tärkkelysjuväset vajoavat painovoiman vaikutuksesta solujen maata kohti osoittavaan osaan, joten normaalisti juuri pyrkii kasvamaan suoraan alaspäin (Raudaskoski 1998). CKX30 1-12- ja CKX32 1-2- ja 1-3-linjojen juuret näyttivät kuitenkin kasvavan enemmän ikään kuin rullalle sen sijaan, että olisivat kasvaneet alaspäin painovoiman ohjaamana. Fenotyyppi voi johtua geenin aiheuttamasta häiriöstä juuren kärkisulokossa tai sen tärkkelysjuväissä. Primäärikasvun fenotyyppiä voisi tutkia jatkossa kasvattamalla näytteet kaikista CKX30 1- ja CKX32 1-linjojen kasveista, kun nyt kohteena oli vain muutama esimerkkilinja. Sekundäärisen kasvun suhteen nämä linjat eivät sen sijaan vaikuttaneet lupaavilta, joten linjoja ei liene tässä sekundäärikasvua tarkkailevassa tutkimuskokonaisuudessa syytä tutkia tarkemmin mielenkiintoisesta primäärikasvun fenotyypistä huolimatta.

Paksuuskasvun suhteen tulokset vastasivat muutoin hypoteesia, mutta CKX30 6-2- ja CKX30 1-12-linjoissa DMSO-maljoilla kasvaneet yksilöt näyttäisivät olevan ohuempia kuin estradioli-indusoidut verrokkit, eli tulokset olivat päinvastaiset hypoteesiin nähden. CKX30 1-12-linjassa oli niin suurta hajontaa, ettei eroa voida pitää merkittävänä, mutta CKX30 6-2 -linjassa erot maljojen välillä olivat merkitsevät, joten sille olisi syytä uusia koe ja verrata uutta tulosta nyt saatuun lopputulemaan, jotta voitaisiin varmistaa tulosten oikeellisuus ja poissulkea esimerkiksi näytteiden sekoittuminen keskenään, minkä itse vahvasti epäilin tapahtuneen jossain aiemmassa vaiheessa. Mikäli DMSO- ja estradiolimaljojen tulokset näissä tapauksissa todella olisivat sekoittuneet keskenään ja todellisuudessa estradioli olisi vaikuttanut oletettavalla tavalla lopettaen juuren sekundäärisen kasvun, voitaisiin CKX30 6-2 -linjaa pitää jatkotutkimuksia ajatellen mielenkiintoisena kohteena vahvan geeniekspression vuoksi. Mikäli nykyisen kokeen tulos on oikea, ainoa potentiaalinen oloinen linja on Studentin t-testien ja silmämääräisen arvioinnin valossa CKX30 17-3. Linjassa vaikuttaisi olevan suurin ero estradioli-indusoitujen ja kontrollimaljalla kasvaneiden yksilöiden välillä, eli geeniekspressio on vahvin tarkastelluista linjoista.

Joidenkin CKX32-linjojen juurten paksuuskasvussa taas tapahtui huomattavia muutoksia estradioli-indusoinnin myötä. Linjoissa CKX32 3-9, 9-1 ja 9-5 geeni ekspressoitui estradioli-indusoinnin vaikutuksesta ja sekundäärinen kasvu oli vähästä. CKX32 20-7 -linjassa on muutaman CKX30-linjan tapaan hypoteesiin nähden päinvastaisia lukemia, joten sen kohdalla olisi syytä selvittää myös tulosten oikeellisuus, kuten muillakin vastakkaisia tuloksia saaneilla linjoilla.

Lopputulena voidaan siis sanoa, että jatkon kannalta merkittävimpiä tutkimuskohteita tulosten perusteella olisivat varmasti linjat CKX30 17-3 ja CKX32 3-9, 9-1 ja 9-5. Fenotyyppi oli selkein ja kaikissa havaittiin tilastollisesti merkitseviä tai erittäin merkitseviä eroja. Lisäksi linjat CKX-30 6-2 ja CKX32 20-7 saattavat olla lupaavia, mikäli koetta uusittaessa todettaisiin DMSO- ja estradiolinäytteiden sekoittuneen tässä koejärjestelyssä, mutta erot linjojen välillä olisivat muutoin yhtä suuret.

6.3 Luotettavuus

Tutkimusta tehtäessä noudatettiin tutkimusryhmän laboratorion työohjeita ja yleisiä käytäntöjä, jotka oli suunniteltu juuri kyseisen laboratorion käyttöön. Kaikista työvaiheista tehtiin merkinnät henkilökohtaiseen laboratoriapäiväkirjaan. Näin päiväkirjasta voitiin jälkikäteen selvittää esimerkiksi onnistuneen PCR-reaktion komponentit ja käytetty ohjelma, käytettyjen liuosten pitoisuudet tai mahdollisia virhelähteitä. Näin kaikki prosessit voidaan jäljittää yksityiskohtaisesti ja tarvittaessa toistaa dokumenttien pohjalta.

Pyrin käyttämään työssäni monipuolisesti sekä kotimaisia, että ulkomaisia lähteitä. Erilaisina lähdeformaatteina käytin esimerkiksi kirjoja, verkkoartikkeleita, videomateriaalia, sekä suullista tiedonantoa. Lähteitä valitessani pyrin kriittisesti arvioimaan niiden oikeellisuutta, sekä valitsemaan tunnettujen ja arvostettujen tahojen, kuten Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America- ja Nature- lehtien julkaisuja. Käytin myös jonkin verran lähteenä yliopistojen oppimateriaalia. Käytetyt lähteet dokumentoin viitteisiin.

Opinnäytetyön alkuperäisyys tarkistettiin Turnitin-analyysiohjelmalla, joka antoi vastaavuusprosentiksi 10 %. Varsinaisessa tekstissä vastaavuus on kuitenkin huomattavasti pienempi, sillä ohjelma etsii vastaavuuksia myös lähdeviitteistä. Lisäksi

se ilmoitti jonkin verran yhtäläisyyksiä muiden Metropolia AMK:lle tehtyjen opinnäytetöiden kanssa, sillä laitoksella on yhtenäinen linjaus opinnäytetyön ulkoasun ja sisältövaatimusten kanssa, jolloin esimerkiksi otsikot saattavat olla eri töissä samanlaisia.

Kaikkia linjoja tutkittaessa otokset olivat hyvin pienet ja kokeet suoritettiin vain kerran. Tarkoituksena oli kuitenkin ensisijaisesti poissulkea CKX30- ja CKX32-linjojen joukosta ne linjat, joilla ei ole syytä jatkaa tutkimuksia, sekä Dof-linjoissa osoittaa alustavasti transformaation onnistuminen ja geeniekspression karkea sijainti. Siksi otoksen pienuus ei tässä yhteydessä haittaa. Hypoteesin vastaisia tuloksia tuottaneet linjat CKX30 6-2 ja CKX32 20-7 voidaan halutessa jättää myös jatkossa kokonaan pois, sillä jo varmasti jatkotutkimuksia varten mielenkiintoisiksi osoittautuneet neljä linjaa riittävät hyvin. Niissä oli kuitenkin sikäli merkitseviä eroja, että resurssien puitteissa kokeet voidaan uusia. Mahdollinen virhe on todennäköisesti tapahtunut inhimillisen erehdyksen kautta, jossa linjat on vain yksinkertaisesti merkitty väärin tehtäessä leikkeitä. Vastaavia virheitä pyritään tietenkin välttämään, mutta siitä huolimatta niitä sattuu silloin tällöin, jolloin tulosten kriittinen tarkastelu onkin erittäin tärkeää.

6.4 Ammatillinen kehittyminen

Opinnäytetyöprosessin alussa olin sähköpostitse yhteydessä opiskelijaohjaajaani, sekä tutkimusryhmän johtajaan ja muihin työelämäohjaajiini tutkimusryhmässä. Koko tutkimuksen ajan tein töitä yhdessä ohjaajani kanssa, jolloin kommunikaatio oli jatkuvaa ja vuorovaikutteista. Myös muut tutkimusryhmässä työskentelevät henkilöt opastivat kaikissa tehtävissä mielellään ja sain osallistua tasavertaisesti kaikkeen ohessa tapahtuvaan toimintaan, kuten kokouksiin ja vapaa-ajan aktiviteetteihin. Tämä lujitti vuorovaikutussuhteita ja helpotti kommunikointia. Tutkimusryhmän kanssa työskentely ja sen dynamiikka tarjosi uutta näkökulmaa työelämään, sillä en ollut aiemmin työskennellyt vastaavassa ympäristössä. Kokeellisen osuuden jälkeen olin vielä sähköpostitse yhteydessä työelämäohjaajiini, opponointipariini, sekä opiskelijaohjaajaani ja sain palautetta opinnäytetyöstäni viimeistelyä varten.

Opinnäytetyön tekeminen on syventänyt huomattavasti ymmärrystäni etenkin bioteknologian hyödyntämisestä ja genetiikan alasta yleisesti. Tehtäviin kuului myös paljon kudosprosessointia ja jonkin verran mikrobien kanssa työskentelyä, joten

opinnäytetyön aikana olen laajentanut tietojani ja taitojani näiltäkin aloilta merkittävästi. Käytännön tekeminen ja tutkiminen laajensi kirjallista teoriapohjaa, sekä opintojen aikana hankittua aiempaa osaamista. Kasvibiologia oli minulle tieteenalana aivan vieras, joten niiltä osin jouduin hankkimaan kaiken tietopohjan perusteista lähtien ennen tutkimusta ja sen aikana. Tässä hyödynsin yliopisto-opetuksessa käytettäviä perusteoksia kasvien anatomiasta ja juuren osien toiminnasta, sekä tutkimusryhmältä saatua tietoa ja materiaalia. Tein opinnäytetyöhön liittyvää toiminnallista tutkimusta työelämäohjaajani kanssa jatkuvassa vuorovaikutuksessa, jolloin opin havainnoimaan oikeita asioita ja toimimaan kyseisen tutkimusryhmän käytänteiden mukaan. Oppimisen kannalta oli hyvin tärkeää, että käytännön opastamista oli koko ajan saatavilla ja sain heti palautetta tekemisistäni.

Tutkimusryhmässä työskentely antoi arvokkaan kokemuksen työelämää ja jatko-opintoja varten, sillä työtavat poikkesivat merkittävästi aiemmista kokemuksistani.

6.5 Etiikka

Merkittävimmän eettisen ongelman aiheuttaa riski muuntogeenisten kasvien tai niiden siementen leviämisestä ympäristöön, sillä sen vaikutuksia on hankala ennustaa ja kasvien leviämistä on hankalaa estää kokonaan. Laboratoriossa ylläpidetään lainmukaisia käytäntöjä, joilla pyritään ehkäisemään geneettisesti muunneltujen siementen ja kasvien leviäminen luontoon. Kaikki siementen, bakteerien tai antibioottien kanssa mahdollisesti kosketuksissa olleet jätteet lajitellaan GMO-jätteeseen, joka autoklavoidaan ennen jatkokäsittelyä. Autoklavoimalla pyritään tappamaan kaikki elävät organismit, jotta niistä ei olisi enää uhkaa ympäristölle.

Lituruoho on Suomessa luonnonvaraisena elävä laji, joten ympäristöön joutuneen geenimuunnoksen selviytyminen ja risteytyminen luonnossa on mahdollista. Luontoon päästessään geenimuunnellut siemenet kuitenkin todennäköisesti leviävät samalla tehokkuudella luonnonvaraisten kasvien siementen kanssa (Persley 2003). Geenimuunnos saattaa kuitenkin usein häiritä kasvin normaalia kasvua, jolloin se ei välttämättä muutoinkaan pärjäisi kilpailussa villityypin kanssa. Lisäksi varsinaisista geenimuuntelun riskeistä ja haitoista on toistaiseksi löytenyt erittäin vähän todisteita (Nicolia – Manzo – Veronesi – Rosellini 2014).

Kasvihuoneella kasvatettavien lituruohojen tuholaistorjuntaan käytetään ensisijaisesti biologista tuholaistorjuntaa, kuten esimerkiksi tuhohyönteisiä syöviä petohyönteisiä. Tämän lisäksi tarvittaessa käytetään myös torjunta-aineita kasvien suojeluun. Tutkimusryhmän kasvattamissa lituruohoissa käytetään jonkin verran geenimuunnosta, joka antaa resistenssin Basta-kasvintorjunta-aineelle. Mikäli tällainen lituruoho leviää luonnossa ja risteytyy villityypin kanssa, on mahdollista, että resistenssigeeni leviää tai jopa siirtyy muihin lajeihin. Lituruoho ei pidetä merkittävänä torjuttavana rikkakasvina, jolloin torjunta-aineresistenssistä ei ole todennäköisesti kilpailuetua. Mikäli geeni voisi levitä toiseen haitallisena rikkakasvina pidettyyn lajiin, voisi resistenssigeeni olla merkittävä kilpailuetu ja geenimuunnos menestyä suhteessa sen lajin villityyppiin. Tämä voisi pitkällä tähtäimellä köyhdyttää biodiversiteettia. Resistenssin ei ole kuitenkaan toistaiseksi todettu siirtyvän yli lajirajojen, joten uhka on epätodennäköinen.

6.6 Opinnäytetyön merkitys työelämässä

Kasvien kasvua säätelevien tekijöiden perustutkimus on tärkeää, koska näiden prosessien tuntemus antaisi uusia menetelmiä paitsi biopolttoaineiden kehittelyyn, niin myös ravintokasvien jalostukseen. Maapallon suurimpia uhkakuvia ovat tällä hetkellä ilmaston lämpeneminen ja myös osittain tästä johtuva nälänhätä. Kasvien biomassan tuoton tehostaminen voisi ainakin jossain määrin tuoda osaratkaisuja näihin ja moniin muihin maailmanlaajuisiin kysymyksiin. Perustutkimusta tehdään kasvattamalla tietopohjaa pieni yksikkö kerrallaan kohti suurempien kokonaisuuksien ymmärtämistä ja hyödyntämistä. Opinnäytetyössäni saatuja tuloksia voidaan hyödyntää yhtenä osana näitä laajempia kokonaisuuksia. Tulosten pohjalta voidaan varmasti poissulkea useita CKX30- ja CKX32-linjoja, sekä jatkaa tutkimuksia muutaman mielenkiintoa herättäneen linjan kanssa.

Lähteet

The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (6814). 796-815. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/full/408796a0.html>>. Luettu 25.9.2015.

The Arabidopsis Information Resource. 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>>. Luettu 27.9.2015.

Bais, H. P – Park, S.-W. – Weir, T. L. – Callaway, R. M. – Vivanco, J. M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends In Plant Science*. Vol. 9. 26-32.

Basta. 2007. Kasvinsuojeluaineet. Turvallisuus- ja kemikaalivirastoTukes. Verkkodokumentti. <<https://kasvinsuojeluaineet.tukes.fi/KareDocs%5C1597Basta.pdf>>. Luettu 31.3.2016.

Bishopp, A. – Help, H. – El-Showk, S. – Weijers, D. – Scheres, B. – Friml, J. – Benková, E. – Mähönen A. P. – Helariutta, Y. 2011. A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology* 21. 917-926.

Blomster, Tiina – Mähönen, Ari Pekka 2013. Lituruohon juuren jälsisolukon molekyylibiologinen tutkimus. *Luonnon Tutkija* 117 (20013:4). 160-163. Suomen biologian seura Vanamo.

Cambium. Plant anatomy. Encyclopedia Britannica Inc. Päivitetty 23.10.2015. Verkkodokumentti <<http://global.britannica.com/science/cambium>>. Luettu 29.10.2015.

Cullis, Christopher A. 2004. Plant genomics and proteomics. John Wiley & Sons Inc, Kanada.

Davis, Amanda M. – Hall, Anthony – Millar, Andrew J. – Darrah, Chiarina – Davis, Seth J. 2009. Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*. 5:3. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.plantmethods.com/content/5/1/3>>. Luettu 28.10.2015.

Fagerstedt, K. - Pellinen, K. - Saranpää, P. - Timonen, T. 2004. Mikä puu - mistä puusta. Yliopistopaino, Helsinki 2004.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4). 557–580.

Happonen, Päivi – Holopainen, Mervi – Sotkas, Panu – Tenhunen, Antero – Tihtarinen-Ulmanen, Marja – Venäläinen, Juha 2004. Bios 2: Solu ja perinnöllisyys. Kustantaja Werner Söderström Osakeyhtiö. WSOY Oppimateriaalit Oy, Helsinki 2007.

Happonen, Päivi – Holopainen, Mervi – Sariola, Hannu – Sotkas, Panu – Tenhunen, Antero – Tihtarinen-Ulmanen, Marja – Venäläinen, Juha 2006. Bios 5: Bioteknologia. WSOY Oppimateriaalit Oy, Helsinki.

Helariutta, Yrjö 2002. "Kasvikunnan banaanikärpäsen" lituruohon geenikartoitusta jouduttaa myös metsäpuiden geenistön tuntemista. *Metsätieteen aikakauskirja* 2. 172-173. Metsäntutkimuslaitos. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.metla.fi/aikakauskirja/full/ff02/ff022172.pdf>>. Luettu 26.9.2015.

Jefferson, R. A. – Kavanagh, T. A. – Bevan, M. V. 1987. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*. 20; 6(13): 3901–3907. Luettavissa myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC553867/>>.

Jones, Robert J – Schreiber, Beth M. N. 1997. Role and function of cytokinin oxidase in plants. *Plant Growth Regulation* 23. 123-134. Kluwer Academic Publishers.

Kasvianatomia. 2006. Histologia. Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/kasvianatomia/>>. Luettu 20.9.2015.

Kasvien osat. 2015. Ruokatieto Ry. Verkkodokumentti. <<http://www.ruokatieto.fi/ruokakasvatus/ruokaketju-ruuan-matka-pelloilta-poytaan/luonto/kasvien-biologiaa/kasvin-osat>>. Luettu 2.10.2015.

Lituruoho. 2006. Pinkka: Lajintuntemuksen oppimisympäristö. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://pinkka.helsinki.fi/virtuaalikasvio/plant.php?id=19679#>>. Luettu 24.9.2015.

Lituruoho. 2015. Luontoportti. Verkkodokumentti. <<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/lituruoho>> . Luettu 20.10.2015.

Mariani Colombo, P – Rascio, N. 1997. Ruthenium red staining for electron microscopy of plant material. *Journal of Ultrastructure Research* 2. 60. 135–139.

Matsumoto-Kitano, M. – Kusumoto, T. – Tarkowski, P. – Kinoshita-Tsujimura, K. – Václavíková, K. – Miyawaki, K. – Kakimoto, T. 2008. Cytocinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105. 20027-20031.

Magnoliopsida – Dicots. 2015. Department of Botany. University of Wisconsin-Madison. Verkkodokumentti. <<http://botit.botany.wisc.edu/courses/systematics/Phyla/Magnoliophyta/Magnoliopsida.html>>. Luettu 25.10.2015.

Miyawaki, Atsushi - Shcherbakova, Daria M. – Verkhusha, Vladislav V. 2012. Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. *Current Opinion in Structural Biology*. 22(5): 679–688. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737244/pdf/nihms496183.pdf>>.

MultiSite Gateway® ThreeFragment Vector Construction Kit. Using Gateway® Technology to simultaneously clone multiple DNA fragments. 2007. User Manual. Invitrogen Corporation.

Mähönen, Ari Pekka 2006. Growth dynamics in *Arabidopsis thaliana* root cambium. Biotekniikan instituutti. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/mahonen/research/index.htm>>. Luettu 25.9.2015.

Nicolia, Alessandro – Manzo, Alberto – Veronesi, Fabio – Rosellini, Daniele 2014. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Critical Reviews in Biotechnology* 1. Vol. 34. 77-88. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2013.823595>>.

Nieminen, Kaisa M. – Kauppinen, Leila – Helariutta, Ykä 2004. A Weed for Wood? *Arabidopsis* as a Genetic Model for Xylem Development. *Plant Physiology*. 135. 653–659. American Society of Plant Biologists. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.plantphysiol.org/content/135/2/653.full.pdf>>. Luettu 28.10.2015.

Noguero, Mélanie – Atif, Rana Muhammad – Ochatt, Sergio – Thompson, Richard D. 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science* 209. 32-45.

Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. 2006. Histologia. Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/>. Luettu 22.12.2015.

Nuorteva, Matti 2005. Puun runkojen kertomaa sanoin ja kuvin. Kustantaja Maahenki Oy. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä.

Näytteen valmistus. 2006. Histologia. Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/naytteenvalmistus/>>. Luettu 22.12.2015.

Pradhan Mitra, P. - Loqué, D. 2014. Histochemical Staining of *Arabidopsis thaliana* Secondary Cell Wall Elements. *Journal of Visualized Experiments* (87), e51381, doi: 10.3791/51381. Luettavissa ja katsottavissa myös sähköisesti. <<http://www.jove.com/video/51381/histochemical-staining-arabidopsis-thaliana-secondary-cell-wall>>.

Persley, G. J. 2003. New Genetics, Food and Agriculture: Scientific Discoveries – Societal Dilemmas. The International Council of Science. Verkkodokumentti. <http://www.icsu.org/publications/reports-and-reviews/new-genetics-food-and-agriculture-scientific-discoveries-societal-dilemmas-2003/Executive_Summary>. Luettu 12.4.2016.

Raudaskoski, Marjatta 1998. Miksi porkkana kasvaa alaspäin? *Tiede* 2000. Verkkodokumentti. <http://www.tiede.fi/artikkeli/kysy/miksi_porkkana_kasvaa_alaspain>. Luettu 12.4.2016.

Siligato, Riccardo – Wang, Xin – Yadav, Shri Ram – Lehesranta, Satu – Ma, Guojie – Ursache, Robertas – Sevilem, Iris – Zhang, Jin – Gorte, Maartje – Prasad, Kalika – Wrzaczek, Michael – Heidstra, Renze – Murphy, Angus – Scheres, Ben – Mähönen, Ari Pekka 2016. MultiSite Gateway-Compatible Cell Type-Specific Gene-Inducible System for Plants. *Plant Physiology* 2. Vol. 170, pp. 627–641. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://www.plantphysiol.org/content/170/2/627.full#corresp-1>>.

Salonen, Veikko 2006. Kasviekologia: Millaista on luonnonkasvien elämä? WSOY Oppimateriaalit Oy, Helsinki.

Stepanenko, Olesya V. - Stepanenko, Olga V. - Shcherbakova, Daria M. - Kuznetsova, Irina M. - Turoverov, Konstantin K – Verkhusha, Vladislav V. 2011. Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. *Biotechniques* 51(5): 313. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4437206/pdf/nihms689831.pdf>>.

Suomen luontotieto. Päätoimittaja Juha Valste. WS Bookwell Oy, Porvoo 2006

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2013. *Geenitekniikka*. Oppimateriaaleja 52. Turun ammattikorkeakoulu. Saarijärven Offset Oy, Saarijärvi. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://julkaisut.turkuamk.fi/geenitekniikka>>.

Tenhunen, Jukka - Ulmanen, Ismo - Yläne, Jari 2004. *Biologia: Geeni ja biotekniikka*. WSOY. Helsinki

Tirri, Rauno – Lehtonen, Juhani – Lemmetyinen, Risto – Pihakaski, Seppo – Portin, Petter 2001. *Biologian sanakirja*. Otava, Keuruu.

Transformaatio. 2006. *Solubiologia*. Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/transformaatio/2/>>.

Voesnek, L. A. C. J. – Blom, C. W. P. M. 1996. Plants and hormones: An ecophysiological view on timing and plasticity. *Journal of Ecology*. 84. 111-119.

Welling, Annikki 2008. *Luonnossa. Kasvit 2. Toim.* Piirainen, Mikko. WSOY. Porvoo 2008.

Yksisirkkaiset. 2006. *Pinkka: Lajintuntemuksen oppimisympäristö*. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://h108.it.helsinki.fi/virtuaalikasvio/index.php?bundle=2303&pcat=4>>. Luettu 23.3.2016.

Zhang, Xiuren – Henriques, Rossana – Lin, Shih-Shun – Niu, Qi-Wen – Chua, Nam-Hai 2006. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 1. 641 – 646.

Zuo – Jianru, Niu – Qi-Wen, Chua – Nam-Hai 2000. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal. Society for Experimental Biology* 2. Vol. 24. 265-273. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-313x.2000.00868.x/full>>.

LIITE 1

T2-selektio CKX30

T2-selektio CKX30						
Malja	Elossa	%	Kuolleita	%	Yhteensä	
1	40	77	12	23	52	
2	28	62	17	38	45	
3	26	61	17	39	43	
4	14	31	31	69	45	
5	34	85	6	15	40	
6	29	74	10	26	39	
7	37	93	3	7	40	
8	37	86	6	14	43	
9	34	87	5	13	39	
10	34	87	5	13	39	
11	41	70	18	30	59	
12	30	60	20	40	50	
13	25	43	33	57	58	
14	38	73	14	27	52	
15	35	61	22	39	57	
16	51	86	8	14	59	
17	46	81	11	19	57	
19	8	13	56	87	64	
20	13	19	57	81	70	
22	42	62	26	38	68	

LIITE 2

T2-selektio CKX32

T2-selektio CKX32						
Malja	Elossa	%	Kuolleita	%	Yhteensä	
1	48	71	19	28	67	
2	54	73	20	27	74	
3	55	80	14	20	69	
4	63	86	10	14	73	
5	61	84	12	16	73	
6	47	100	0	0	47	
7	56	86	9	14	65	
8	29	40	43	60	72	
9	57	75	19	25	76	
10	43	63	25	37	68	
11	44	66	35	34	35	
12	39	52	36	48	75	
13	51	69	23	31	74	
14	42	59	29	41	71	
15	38	75	13	25	51	
16	55	76	17	24	72	
17	57	81	13	19	70	
18	58	76	18	24	76	
19	50	64	28	36	78	
20	44	72	17	28	61	
21	41	63	24	37	65	
22	52	81	12	19	64	
23	46	68	22	32	68	

LIITE 3

T3-selektio CKX30

T3-selektio CKX30								
	Linja	Elossa	%	Kuollut	%	Yhteensä		
CKX30-1	1	14	77,77778	4	22,22222	18		
	2	7	63,63636	4	36,36364	11	Huono itävyys	
	3	19	90,47619	2	9,52381	21		
	4	24	96	1	4	25		
	5	21	77,77778	6	22,22222	27		
	12	22	100	0	0	22		
CKX30-6	1	19	70,37037	8	29,62963	27		
	2	25	100	0	0	25		
	3	24	77,41935	7	22,58065	31		
	4	21	84	4	16	25		
	5	22	78,57143	6	21,42857	28		
	6	22	91,66667	2	8,333333	24		
CKX30-11	1	19	95	1	5	20		
	2	15	78,94737	4	21,05263	19		
	3	17	85	3	15	20		
	4	21	80,76923	5	19,23077	26		
	6	16	80	4	20	20		
	10	20	100	0	0	20		
CKX30-14	2	20	80	5	20	25		
	3	8	61,53846	5	38,46154	13		
	4	1	100	0	0	1	Huono itävyys	
	5	25	100	0	0	25		
	6	11	84,61538	2	15,38462	13		
	7	1	100	0	0	1	Huono itävyys	
CKX30-17	1	16	100	0	0	16		
	2	19	95	1	5	20		
	3	23	100	0	0	23		
	4	20	100	0	0	20	Ei istutettu	
	5	10	76,92308	3	23,07692	13		
	10	13	86,66667	2	13,33333	15		

LIITE 5

Juurten pituudet CKX30 ja CKX32

	4d ½GM	stdev	4d ½GM		10d EST		10d DMSO	
CKX32 20-7	1,3728	0,399983	1,2056	0,261532	4,2087	2,073576	7,3378	1,576421
CKX32 9-5	1,5334	0,375077	1,158	0,299694	4,7437	1,838668	6,007	1,595169
CKX32 1-2	1,562444	0,275306	1,454111	0,321924	5,070333	1,101795	5,725778	1,348685
CKX32 3-9	1,389	0,235464	1,379	0,376855	5,2892	1,237091	5,5891	0,376855
CKX32 1-3	1,6144	0,404945	1,6568	0,325532	5,5735	1,780486	6,874	1,673666
CKX32 18-4	1,6941	0,465623	1,4164	0,248872	5,8535	1,474945	6,9911	1,502016
CKX32 9-1	1,5503	0,286627	1,6099	0,285023	6,117	1,587312	7,7941	1,491671
WT	1,6074	0,297832	1,370727	0,246449	6,1822	2,080518	6,700182	1,413565
CKX32 3-10	1,6549	0,412268	1,442	0,346391	6,8774	0,831025	6,1248	1,18941

	4d ½GM	StDev	4d ½GM	Stdev	10d EST	Stdev	10d DMSO	Stdev
CKX30 1-12	1,7649	0,18051	1,8508	0,390418	4,7537	0,597102	5,5761	1,05971
CKX30 17-1	1,6203	0,261677	1,5863	0,459375	4,988444	1,169425	6,464	1,599787
CKX30 6-2	1,6548	0,405665	1,5599	0,434396	5,6703	0,958498	6,7045	1,68499
WT	1,6074	0,297832	1,370727	0,246449	6,1822	2,080518	6,700182	1,413565
CKX30 11-1	1,6999	0,267889	1,6298	0,324757	6,3068	1,061409	5,6323	1,531138
CKX30 11-10	1,8758	0,399653	1,357778	0,387158	7,0016	1,375466	5,995778	1,113629
CKX30 17-3	1,6203	0,233242	1,5495	0,305717	7,3176	1,675952	7,6441	0,981583
CKX30 14-5	1,6544	0,173868	1,7219	0,245072	7,5942	1,426239	7,2546	1,507862

LIITE 6**Juurten paksuudet CKX30 ja CKX32**

	EST	StDev	DMSO	
CKX32 9-5	92,49825	26,33432	312,3146	56,88011
CKX32 9-1	118,8032	48,4349	312,9421	45,87088
CKX32 3-9	198,6331	53,39332	345,5561	51,64056
CKX32 18-4	213,907	100,3256	278,0248	74,86428
CKX32 1-2	282,7536	74,61169	313,9305	58,44838
CKX32 3-10	293,8768	48,9281	290,8963	43,52429
CKX32 1-3	311,3628	58,02774	347,4783	31,57469
CKX32 20-7	334,237	49,38408	237,2441	45,23586
WT	360,9156	88,82207	321,488	79,3983

	EST	std	DMSO	std
CKX30 17-3	201,411	80,91116	327,9723	59,68214
CKX30 17-1	217,8019	33,58052	290,2264	75,8668
CKX30 11-10	232,5384	24,11694	298,463	56,6069
CKX30 11-1	258,2038	67,60137	303,9414	32,79158
CKX30 14-5	279,3611	44,71455	374,8996	80,77239
CKX30 6-2	284,7465	71,50547	129,7367	27,8765
CKX30 1-12	301,4747	61,16198	244,7149	76,52572
WT	360,9156	88,82207	321,488	79,3983