



HELSINGIN YLIOPISTO  
HELSINGFORS UNIVERSITET  
UNIVERSITY OF HELSINKI

# Ruoka ja geenit

## 3. Kasvibioteekniikan menetelmiä

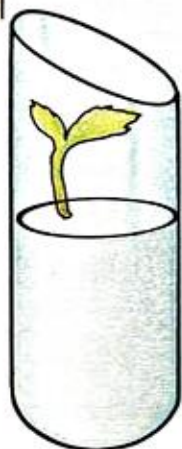
Jussi Tammissola  
kasvinjalostuksen dosentti  
[jussi.tammissola@helsinki.fi](mailto:jussi.tammissola@helsinki.fi)  
<http://geenit.fi>  
13.9.2012

**Koulutus- ja kehittämiskeskus Palmenia**

TAIMI ON  
EMOPUUN KLOONI



TAIMET  
ISTUTETAAN  
MULTAAN

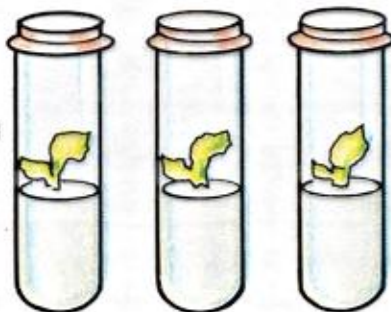


PIENET  
KASVINPOIKASET  
SIIRRETÄÄN  
JUURRUTUS-  
ALUSTALLE

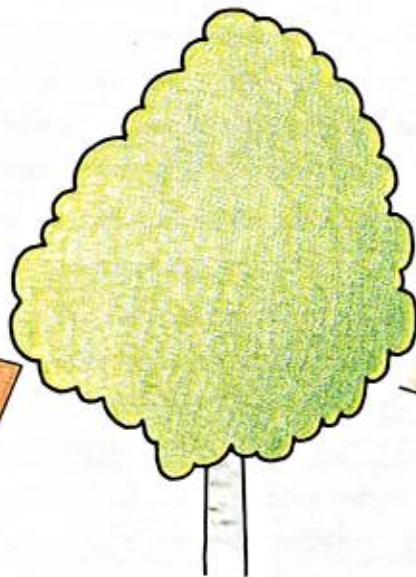
VERSOT  
EROTELLAAN



VERSOT ISTUTETAAN  
KASVATUSALUSTALLE  
MONISTAMISTA VARTEN



## MIKROLISÄYS- MENETELMÄ



KASVUPISTE  
SIIRRETÄÄN  
VILJELYYN



KASVUSOLUKKO  
MUODOSTAA  
VERSOJA

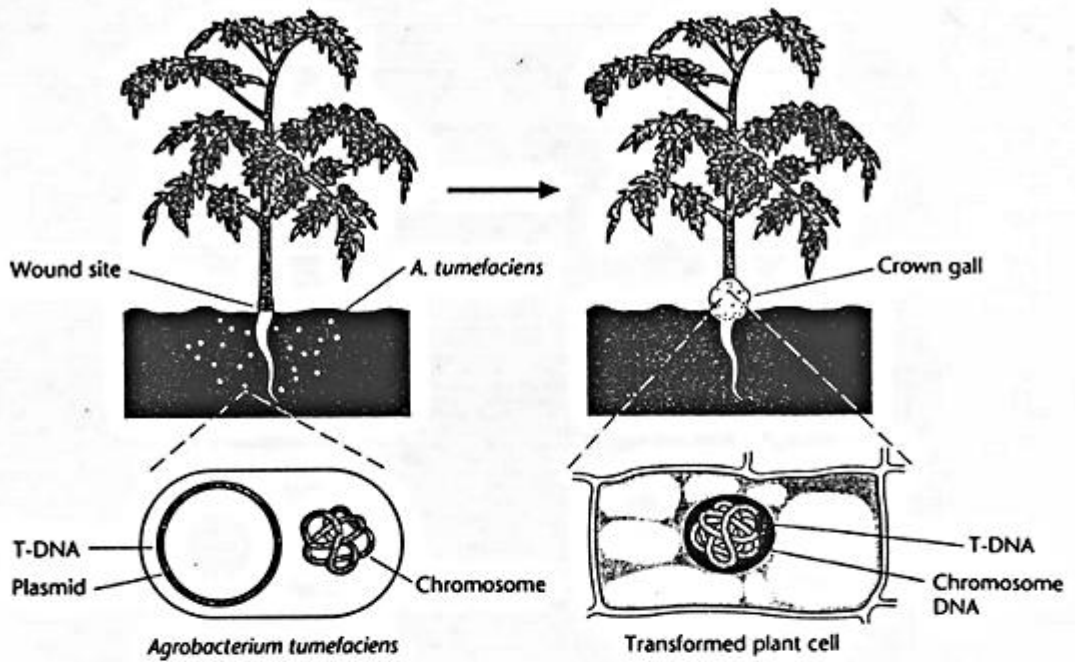
SYNTYY UUSIA  
VERSOJA

# Solu- ja solukkoviljelyyn perustuvat menetelmät

- tekivät läpimurron – ovat jalostuksen arkipäivää
- vähättelijöistä (mm. JT) piittaamatta!

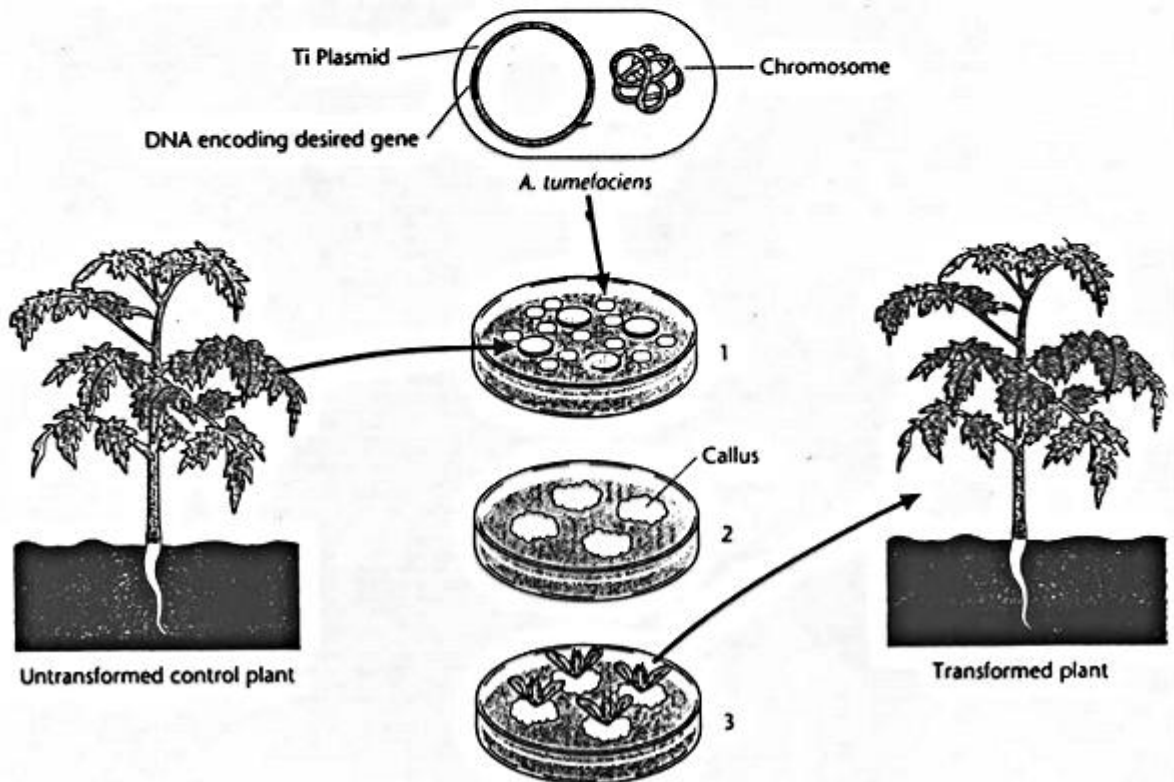


**Koivun somaattinen alkio**



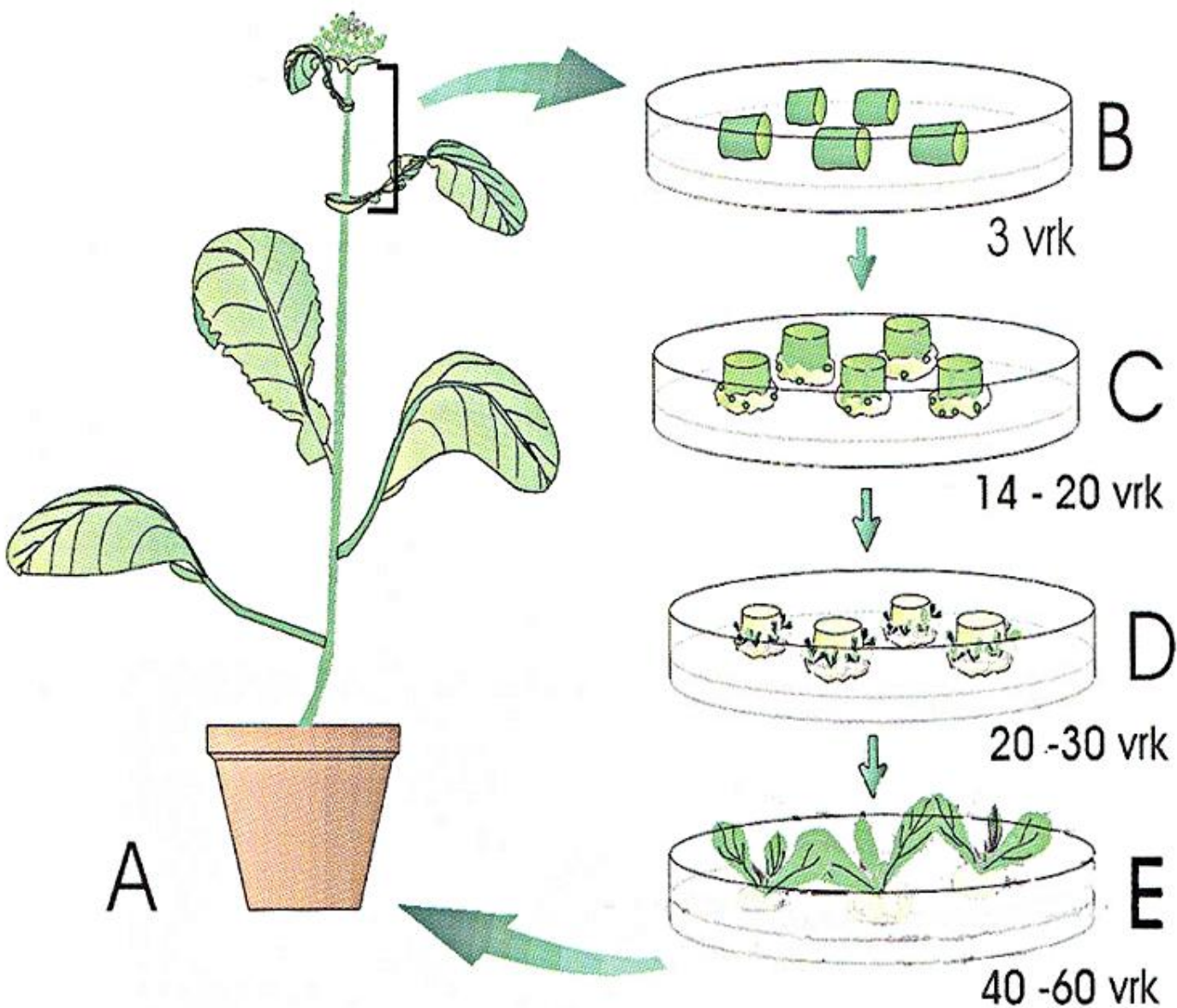
(a) Crown Gall Disease

## Agrobakteeri siirtää itse geenin kasvin perimään



(b) Transformation in the Laboratory

# GEENINSIIRTO RYPSIIN

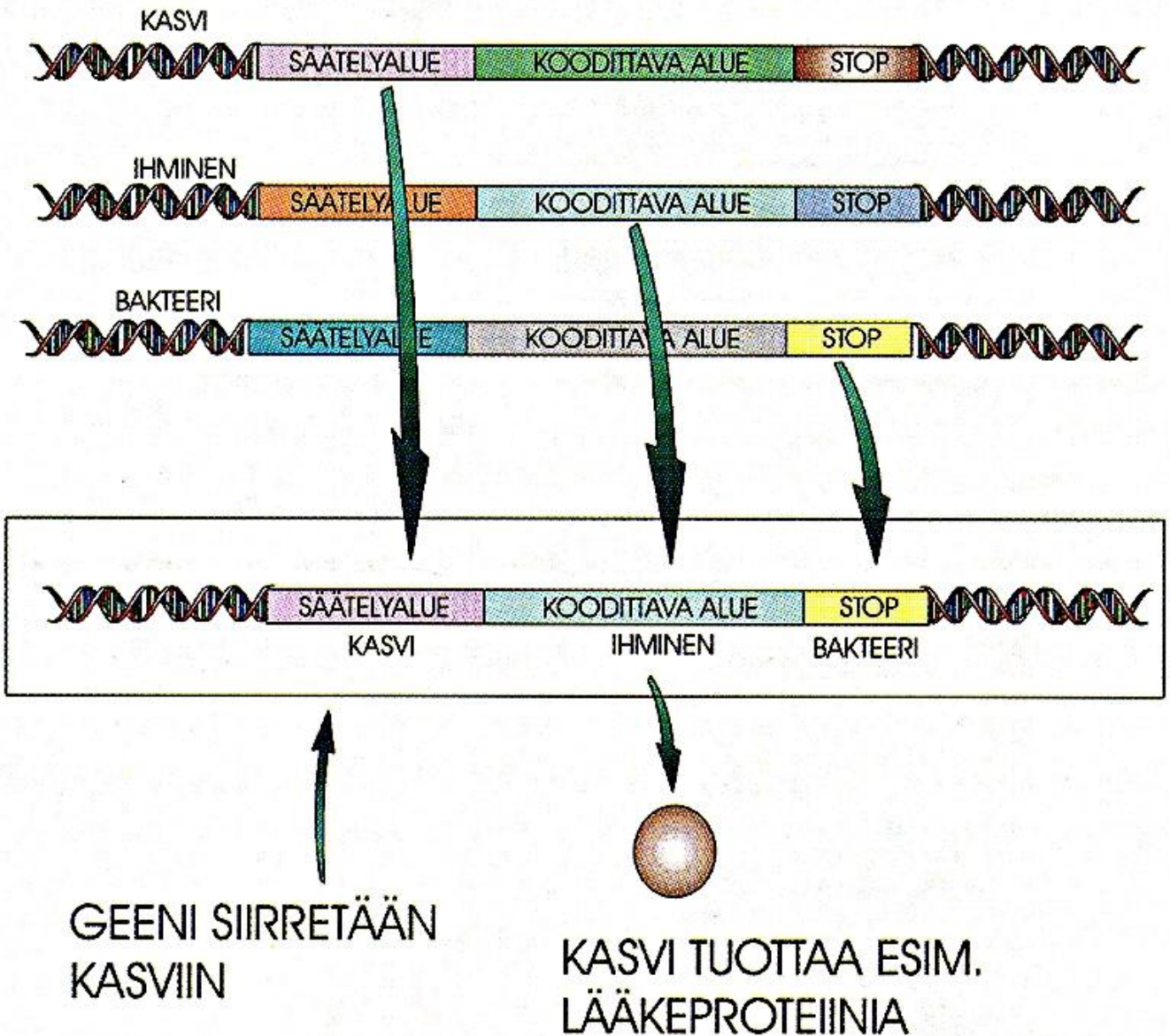


# Klassillisia geenimuuntelumenetelmiä 3. Geenin siirto tupakkaan geenipyssyllä



Boije (1999)

## TOIMIVA GEENI VOIDAAN KOOTA USEIDEN ELIÖIDEN DNASTA



# Kasvigeenitekniikan uusia kehityslinjoja

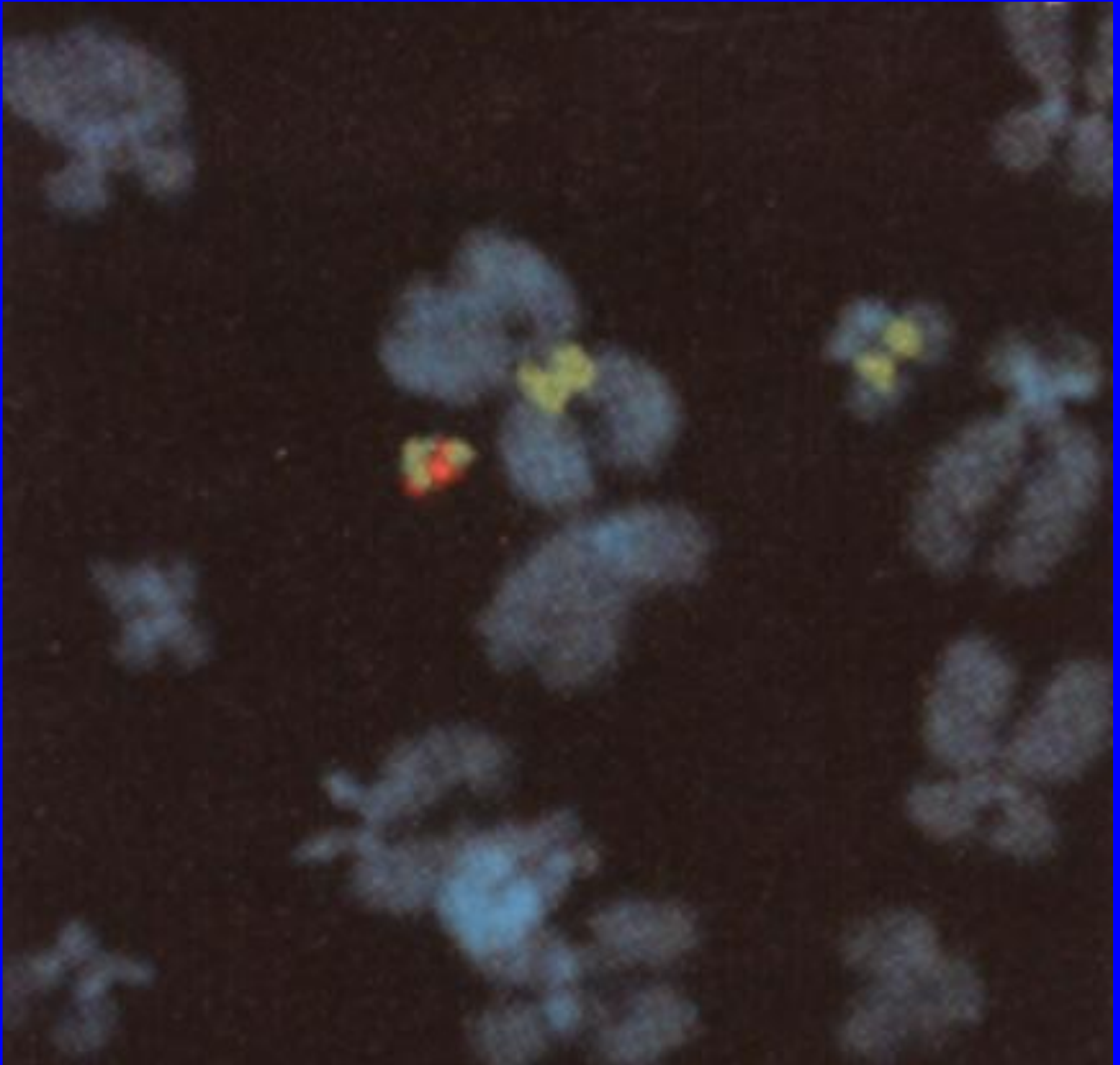
---

- ◆ Kasvigeenien toimintaa ja säätelyä selvitetään
  - kasvin omia geenejä hienosäädetään
- ◆ Geenistön toiminnan analysointi
  - proteomiikka, dna- ja rna-sirut
- ◆ Usean geenin jalostaminen yhtäikää
- ◆ Esivalitut geenien kiinnittymiskohdat
- ◆ Geenin eristäminen toiminnallisesti naapureistaan
- ◆ Haittageenin eliminointi laserilla
- ◆ Kohdennettu mutageneesi
  - rna/dna-hybridimolekyylien avulla
  - sinkkisorminukleaaseilla
- ◆ Kasvien pienet keinokromosomit



# Nisäkkään keinotekoinen kromosomi (MAC)

---



YAC-materiaalia

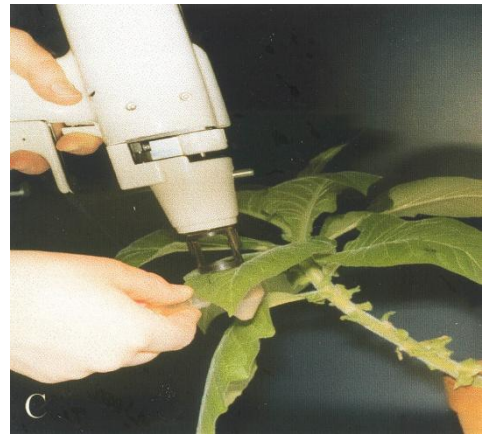
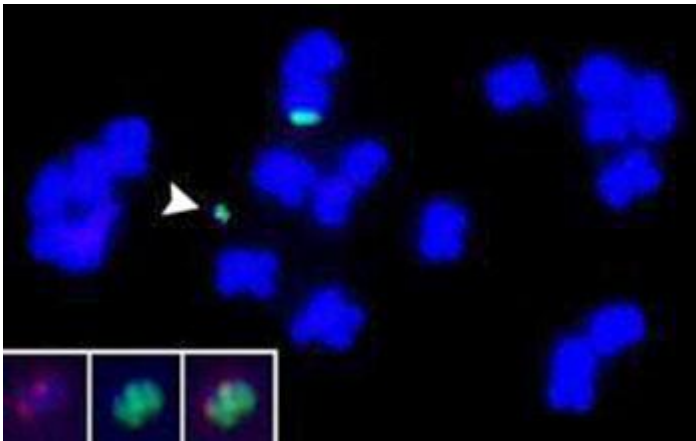
(Ikeno ym.1998)



Ihmisen kr. 21 sentromeerimateriaalia

# Monta geeniä voidaan jalostaa kasviin yhtäikää minikromosomissa

- Heinäkasveilla on soluissaan usein myös ylimääräisiä pieniä, ns. B-kromosomeja
  - käyttäytyvät kuin muut kromosomit
  - lukumäärä voi olla suurikin
  - ovat geneettisesti (lähes) tyhjiä, mutta niissä on välttämättömät kromosomin rakenneosat (liikutinosa eli *sentromeeri* sekä kromosomin päät eli *telomeerit*)
- Tyhjennettyyn B-kromosomiin voidaan viedä monta jalostettavaa geeniä yhtäikää geenitekniikan avulla (ns. geenikasettina)
  - tuloksena toimiva **minikromosomi**, joka sitten voidaan siirtää kasvisolun tumaan geenipyssyllä



Minikromosomi on merkitty kuvassa nuolella

- Koetulosten mukaan minikromosomit siirtyvät normaalisti solusukupolvesta toiseen mitoosissa ja kasvisukupolvesta toiseen meioosissa
- ☞ Carlson ym. (2007). *PLOS Genetics* 3: 1965-1974  
[http://genetics.plosjournals.org/archive/1553-7404/3/10/pdf/10.1371\\_journal.pgen.0030179-L.pdf](http://genetics.plosjournals.org/archive/1553-7404/3/10/pdf/10.1371_journal.pgen.0030179-L.pdf)
- ☞ Yu ym. (2007). 14.5.2007 *PNAS*  
<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/0700932104v1>



# Geenin vienti esivalittuun paikkaan kromosomissa rekombinaatio- systemin avulla (Cre/lox, FLP/FRT ym) 1.

- Siirtogeeni voidaan ohjata esivalittuun, hyvin toimivaksi testattuun paikkaan kasvin perimässä
- Samaan paikkaan voidaan myöhemmin lisätä muita geenejä tarpeen mukaan

## Expression of transgenes from specific chromosome locations (David Ow, ABIC 2004)

### What determines gene expression ?

#### DNA construct

- regulatory elements, codon usage
  - transcription, translation, localization

#### Genomic configuration

transformation technology

- single copy - more stable
- structural fidelity - lacking mutations & rearrangements

#### Genomic location

transformation technology

- neighboring genes - expression interference
- (not linked to undesirable alleles - breeding process)



# Geenin vienti esivalittuun paikkaan kromosomissa rekombinaatio-systeemin avulla (Cre/lox, FLP/FRT ym) 2.

- Rekombinaatiosysteemejä on kehitetty useita
- Ne perustuvat löydettyyn rekombinaasientsyymiin, joka aiheuttaa rekombinaation kahden ko. entsyymille spesifisen dna-jakson ("tunnistusjakson") kesken
- Tuloksena voi silloin (yksityiskohdista riippuen) olla joko
  - ...noiden jaksojen välisen dna-pätkän *irtoaminen* kromosomista (ks. Merkkigeenin poisto), tai
  - ...soluun tuodun, tunnistusjaksoilla varustetun dna-pätkän *kiinnittyminen* kromosomiin tunnistusjakson kohdalle (siihen kohdennettu geeninsiirto) (Ow 2002)
- Faagilta löydetty Cre-geeni koodaa Cre-rekombinaasientsyymiä, joka tunnistaa *lox*-jakson
- Hiivalta löydetty FLP-geeni koodaa FLP-rekombinaasia, joka tunnistaa *FRT*-jakson:  
AAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC  
(Fladung ym. 2009)



# Geenin vienti esivalittuun paikkaan kromosomissa rekombinaatio- systeemin avulla (Cre/lox, FLP/FRT ym) 3.

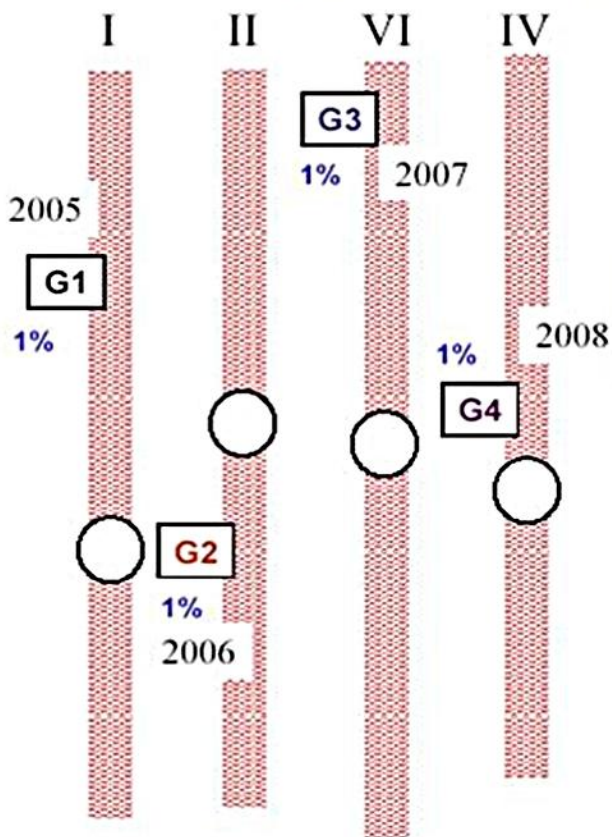
- Hyvin toimivien geenipaikkojen kokoelma:
- Kasvilajille kannattaa tehdä suuri joukko muuntogeenisiä testilinjoja, joissa (ko. tunnistusjaksolla varustettu) koegeeni sijaitsee (satunnaisesti) eri paikoissa kromosomistoa
- Hyvin toimivat testilinjat tallennetaan jalostuksen peruskokoelmaksi
- Hyötygeeni kannattaa sitten siirtää johonkin peruskokoelman linjaan
  - ...siinä olevan koegeenin tilalle
- Jos kasvilla on jo olemassa jokin hyvin toimiva (ko. tunnistusjaksolla varustettu) muuntogeeninen lajike
  - ...niin uusi hyötygeeni kannattaa liittää sen seuraksi
    - ...samaa tunnistusjaksoa hyödyntäen



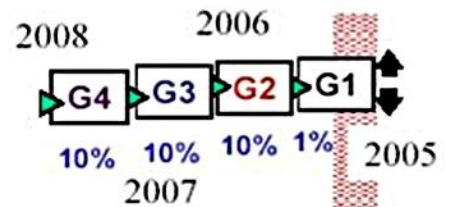
# Geenin vienti esivalittuun paikkaan kromosomissa rekombinaatio-systeemin avulla (Cre/lox, FLP/FRT ym) 4.

- Siirrettävät geenit kannattaa lisätä yksi kerrallaan ”paketiiksi” (vierekkäin) yhteen, hyväksi tunnettuun paikkaan kromosomissa

## Conventional gene stacking



## Stacking via recombination



### Why cluster the transgenes ?

- ✓ familiar site:
  - predictable structure & function
  - eases regulatory approval
- ✓ reduce breeding time

(Ow 2004)



# (Merkki)geenin poisto muunnetusta kromosomista jälkikäteen (Cre/lox, FLP/FRT ym)

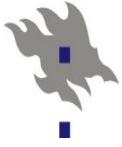
1.

- Näillä metodeilla tehdystä gm-kasvilinjasta valinnan merkkigeeni\* voidaan myöhemmin leikata pois
- ...tai itse siirtogeeni voidaan ohjelmoida leikkautumaan aina pois tietystä solukosta, esim.
  - muodostuvista siitepölyhiukkasista (geenivirran esto)
  - ...tai syötävistä kasvinosista (geenipelot).

## Site-specific recombination: What might we do next ?

- **Excision of unneeded DNA**
    - ✓ Marker free transgenics
    - ✓ Resolution to single copy
  - **Site-specific transgene placement**
    - ✓ Reproducible gene expression
    - ✓ Predictable structure
  - **Gene Stacking**
    - ✓ Repeated use of favorable chromosome locations
    - ✓ GMO tracking
  - **Facilitated Introgression**
    - ✓ Rapid breeding
  - **Control of Transgene Dispersal**
    - ✓ Biosafety
    - ✓ (IP protection)
- (Ow 2004)

\*Geeninsiirron apugeeni, jonka avulla viljelmästä voidaan valita jatkokasvatukseen ne kasvisolut, joissa geeninsiirto on onnistunut



# Uudet jalostusmenetelmät kasveilla

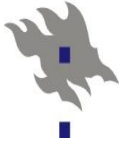
## Säädäntö

- EU:n ympäristödirektooraatin perustama asiantuntijatyöryhmä ”Uudet jalostusteknologiat” selvittää parhaillaan (2009–10), muodostuuko tiettyjen uusien tekniikoiden käytöllä EY:n geenitekniikkasäännösten (dir. 2001/18/EY ja 2009/41/EY)\*# mukaan ’geneettisesti muunnettu’ organismi
  - ...eli koskeeko säädäntö esimerkiksi tiettyjä uusia kohdennetun mutageneesin menetelmiä vai ei
- Selvitettäväksi valittiin puolen tusinaa uutta jalostusmenetelmää, esim:
  - Oligonukleotidiohjattu mutageneesi (esim. RTDS)
  - Sinkkisorminukleaasi-mutageneesi
  - ”Käänteishybridi”menetelmä (Reverse Breeding)

\* Geenimuuntelun määritelmä on koottu Rinnakkaiselon asiantuntijatyöryhmän väliraporttiin (sivulle 25):  
[http://www.hare.vn.fi/upload/Julkaisut/9300/2762\\_trm2005\\_9.pdf](http://www.hare.vn.fi/upload/Julkaisut/9300/2762_trm2005_9.pdf)

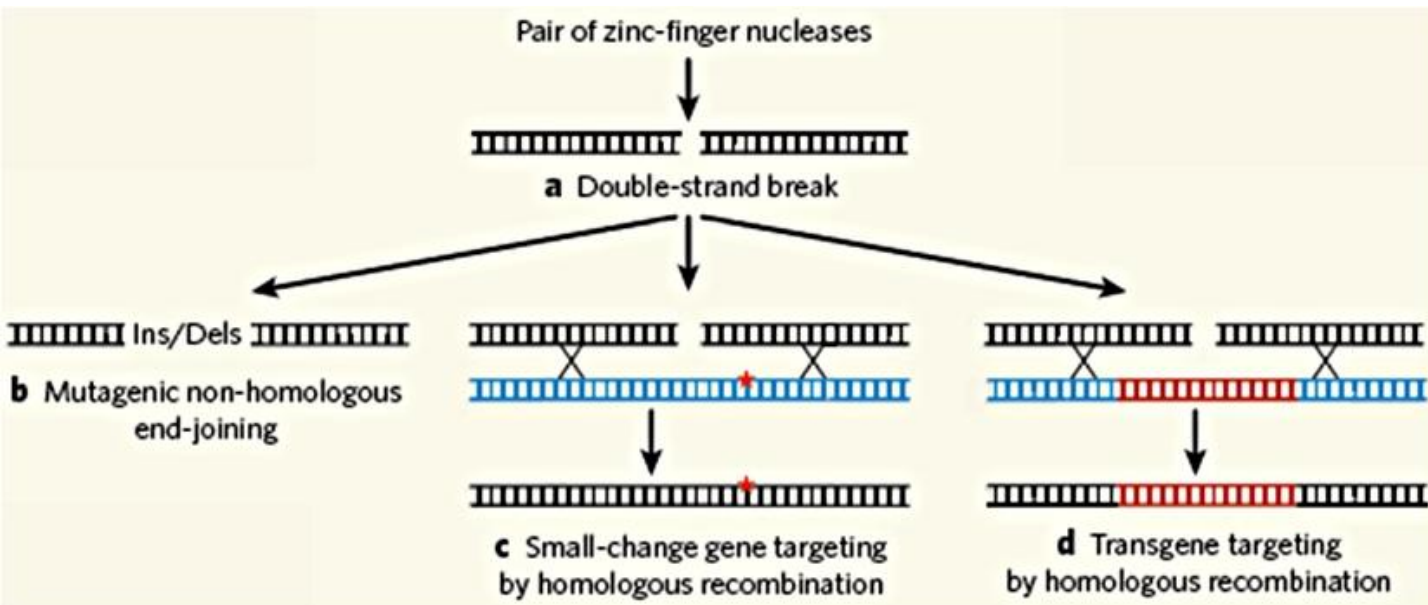
# JT: Määritelmässä ei juuri ole biologista järkeä, mikä on johtanut tieteellisen riskinarvioinnin ja terveen järjen vastaisiin käytäntöihin sekä biotaantumaa Euroopassa:  
<http://geenit.fi/EP101006LiitelK.pdf>  
<http://geenit.fi/LabL12.pdf>





# Kohdennettu mutageneesi sinkkisorminukleaasien avulla 1.

- Sinkkisorminukleaasit (ZFN) ovat muunnettuja dna:n katkaisuentyymejä, joissa katkaisuosaan on fuusioitu dna-jaksojen tunnustuselementtejä solun dna-korjausjärjestelmästä
- Kukin niistä katkaisee dna-juosteen täsmälleen paikasta, johon tunnustuselementti sen kohdistaa, ja katkaisuentyymille spesifisen emäsjakson kohdalta
- Sopivasti valittu entsyymipari katkaisee kaksisäikeisen dna:n molemmat juosteet samalta kohdalta
- Kyseiseen kohtaan saadaan viedyksi geneettinen muutos, kun solun omat korjausentsyymit houkutellessaan korjaamaan katkos
  - ...jolloin tarjottu korjaava dna-jakso kiinnittyy katkoskohtaan homologisella rekombinaatiolla (kuvassa vaihtoehdot c ja d)



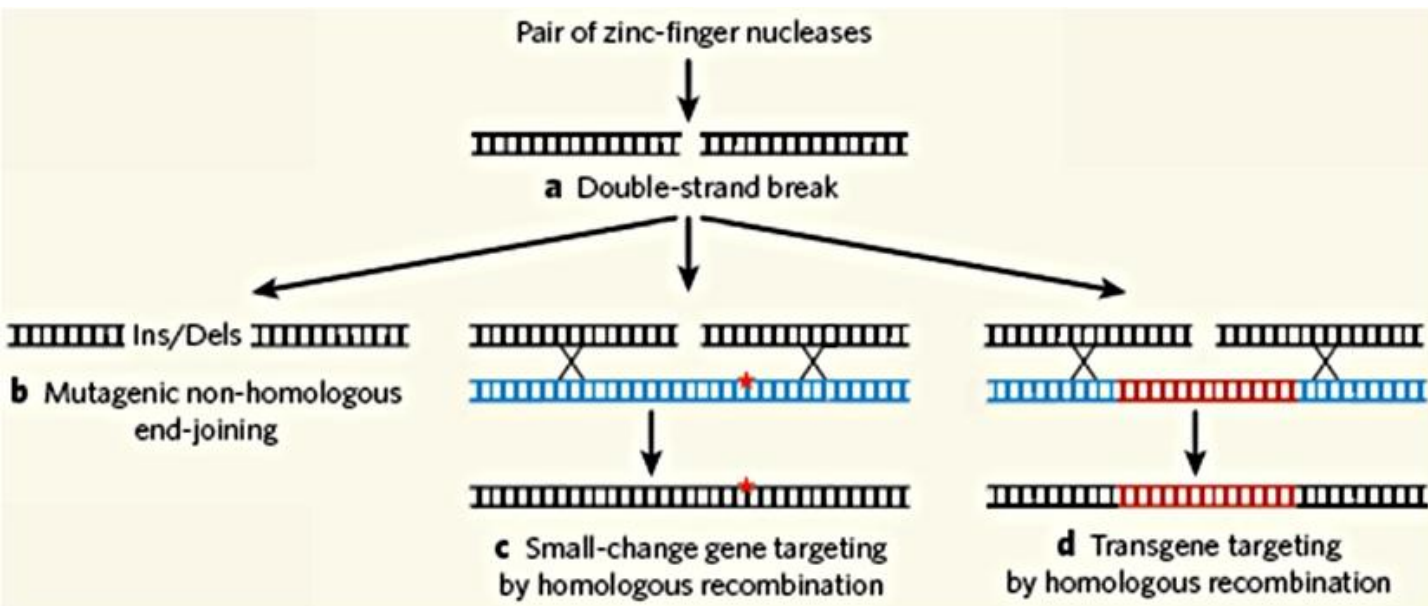
([Shukla ym. 2009](#), [Townsend ym. 2009](#))

Kuva: [Porteus 2009](#)



# Kohdennettu mutageneesi sinkkisorminukleaasien avulla 2.

- b) Jos solulle ei tarjota korjaavaa dna-jaksoa, niin katkos voi korjaantua siten, että katkoksen päät tarttuvat takaisin toisiinsa
- Tällainen ns. epähomologinen korjautuminen on kuitenkin epätarkkaa
- ...joten katkoskohtaan syntyy usein (satunnainen) mutaatio:
  - yhden tai muutaman nukleotidin muutos (poistuminen eli deletio tai lisäys eli insertio)
- Kohdentamalla tällainen mutaatio geenin toiminnallisesti tärkeään osaan (esim. entsyymin aktiivisen keskuksen alueelle) saadaan (haitta)geeni usein ”sammutetuksi”
  - kyseisen geenin toimivaa lopputuotetta ei solussa synny



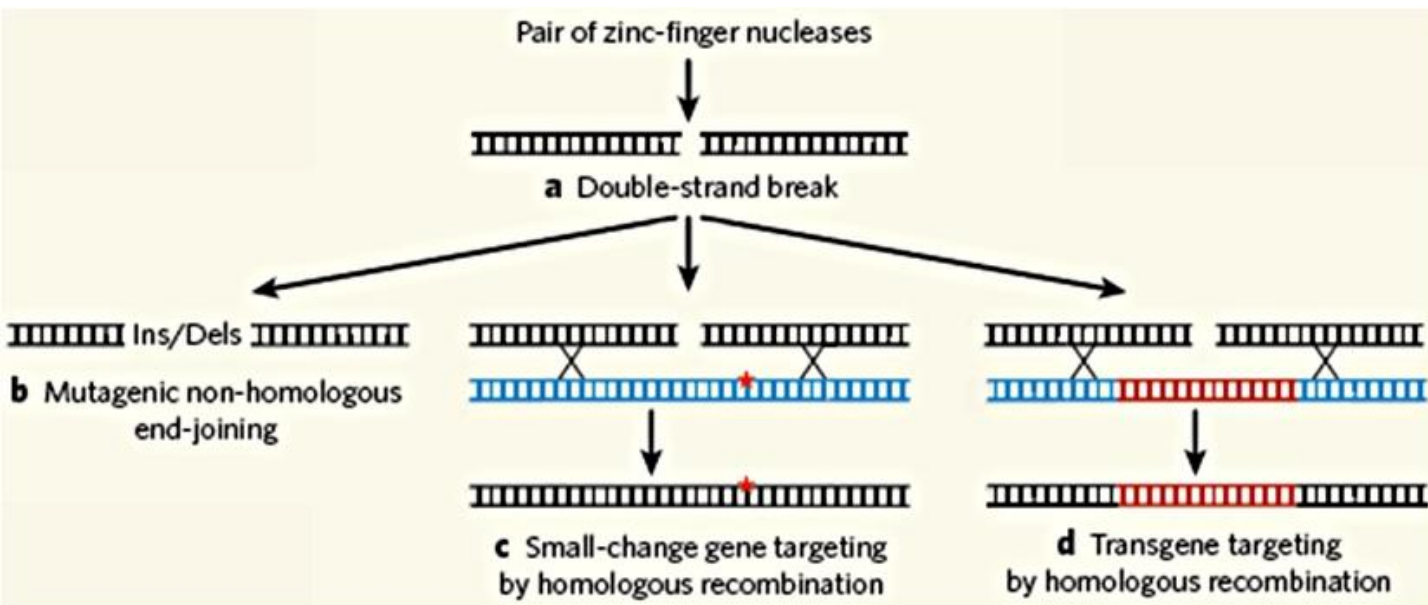
Kuva: [Porteus 2009](#)



# Kohdennettu mutageneesi sinkkisorminukleaasien avulla

3.

- c) Jos solulle tarjotaan korjaava dna-jakso, jossa on
  - pieni geneettinen muutos (yksi tai muutama dna-emäs vaihdettu)
  - ...ja homologiseen rekombinaatioon tarvittavat vastaavuusjaksot katkoskohdan molemmilla puolilla
- ...niin katkos korjautuu tarkasti, kyseisellä muutoksella varustettuna
- d) Korjaavaan dna-jaksoon voidaan vastaavasti sijoittaa myös kokonainen siirtogeeni
  - ...joka siten saadaan viedyksi solun perimään kyseiselle kohdalle
  - Onnistumistaajuus saattaa olla varsin korkea (maissilla jopa 3-20%)



Kuva: [Porteus 2009](#)



# Kohdennettu mutageneesi sinkkisorminukleaasien avulla 4.

## ■ c-d) Käyttömahdollisuuksia:

- 1. Geenin hienosäätö yksittäisiä dna-emäksiä vaihtamalla
  - esim. ”virheiden” poisto, geeniterapia
- 2. Haittageenin hallittu sammuttaminen
  - esim. viedään geenissä valittuun paikkaan stop-kodoni, jolloin geeni tuottaa proteiinista vain (inaktiivista) tynkämutoa
- 3. Haittageenin korvaaminen hyötygeenillä
  - viedään toimiva hyötygeeni täsmälleen haitallisen päälle perimässä
  - ...jolloin haittageeni inaktivoituu (mikä on haitatonta ja hyödyllistä!)
- 4. Periaatteessa voidaan kasvin oma, epätyydyttävä geenimuoto myös täydelleen korvata paremmalla geenimuodolla
  - ”pilkuntarkasti” eli ”yhden emäksen tarkkuudella”
  - ...vaikka biologian kannalta käyttötapa 3 on yleensä yhtä hyvä
  - Leikataan geeni irti: katkaistaan dna sen molemmilta puolilta
  - Geeni ei aina kiinnity takaisin paikoilleen vaan jää irralleen ja häviää
  - Kromosomin ”tynkäkohtaan” viedään sitten ko. parempi geenimuoto kohdan d) menettelyllä.
- Esimerkiksi riisin huono pakkaskestävyysgeeni voidaan korvata Etelämanteren lauhan\* paljon paremmalla

\* *Deschampsia antarctica* -heinälaji, kestää -30°C



# Kohdennettu mutageneesi sinkkisorminukleaasien avulla

## 5.

- Kuinka näin tarkkaan työskentelyyn on lopulta päästy kasveillakin?
- Sinkkisorminukleaasit tunnistivat katkaisukohtansa alun perin vain muutaman dna-emäksen pituisen jakson perusteella. Se oli kovin epätarkkaa, eikä sillä voitaisi päästä jalostajia tyydyttäviin tuloksiin.
  - Toivotun kohdan ohella entsyymi katkoisi nimittäin aina perimää myös lukuisista muista, ei-toivotuista paikoista
  - Kohdennetun mutaation lisäksi syntyisi siis sivuvaikutuksena usein myös
    - ...jalostajan kannalta epäsuotavia mutaatioita
    - ...ei toki likikään niin summittaisia kuin perinteisessä mutaatiojalostuksessa
- Näiden entsyymien tunnistustarkkuutta on nyt onnistuttu huimasti parantamaan mm lisäämällä niiden dna-tunnistuselementtien lukumäärää
- Parannetut entsyymit päättävät nyt katkaisukohdasta paljon pidemmän dna-emäsjakson perusteella
- ...joten katkaisukohta määräytyy monta kertaluokkaa yksikäsitteisemmin
- Tahattomia lisäkatkoksia syntyy siksi enää ”tähtitieteellisen” harvoin
- Tarkkuus riittääkin jo mainiosti jopa geeniterapiaan (jossa vioittuneita soluja ei saa syntyä juuri ollenkaan)
- ...ja kasvinjalostuksen vaatimukset ylitetään jo suuresti:
  - Perinteisesti jalostuksessa huonoja kasvilinjoja saisi syntyä aluksi paljonkin
  - ...sillä linjoista vain parhaat valitaan jatkoon lajikkeita kehitettäessä.



# Oligonukleotidihjattu mutageneesi Rapid Trait Development System

RTDS (Cibus Inc.), synonyymi mm. ODGM 1.

## Rapid Trait Development System (*RTDS™*) in Plants

Cells

Plant cell

Nucleus

Strands of DNA

Leaf

This figure shows how *RTDS* can be used to convert a red flowering plant to a white flowering plant. *RTDS* uses molecules known as Gene Repair Oligonucleotides (GRONs) to create a structure in a plant gene (see insert) that appears to the cell as a typographical error in the way in which the gene is spelled. These 'errors' also known as mismatches are repaired by natural enzymes using the plant's own DNA. A single change in the genetic code is enough to repair genes and in some cases create new valuable plant characteristics, known as traits.

GRON

Natural enzyme

One nucleotide change

Red flowering plant

New *RTDS* plant now with white flowers

Cibus' RTDS illustrations are carefully vetted scientific documents and available for reprint by journalists. These files are property of Cibus LLC and are not to be altered in any way, shape or form.

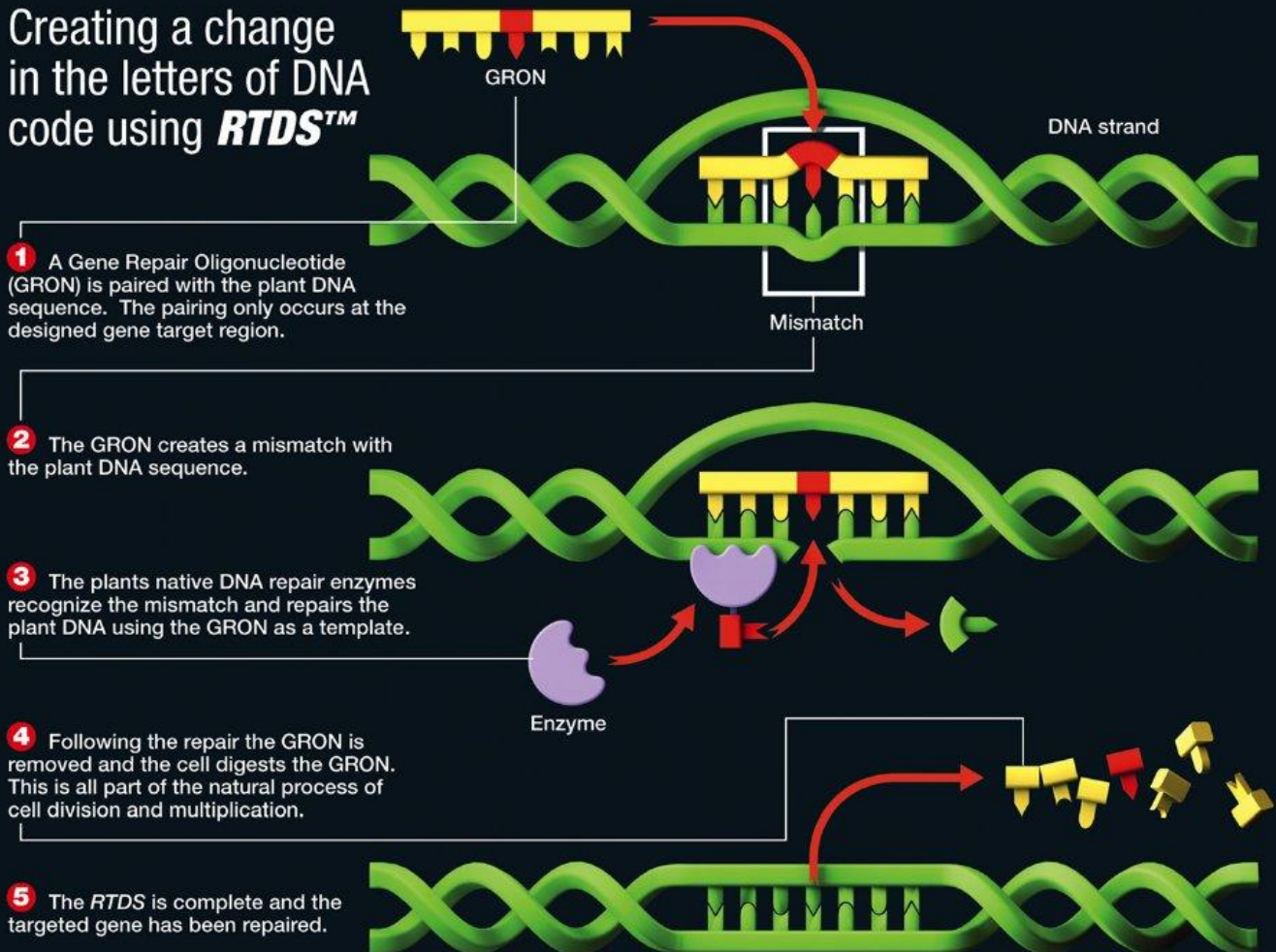


# Oligonukleotidihjattu mutageneesi

## RTDS

2.

Creating a change  
in the letters of DNA  
code using **RTDS™**



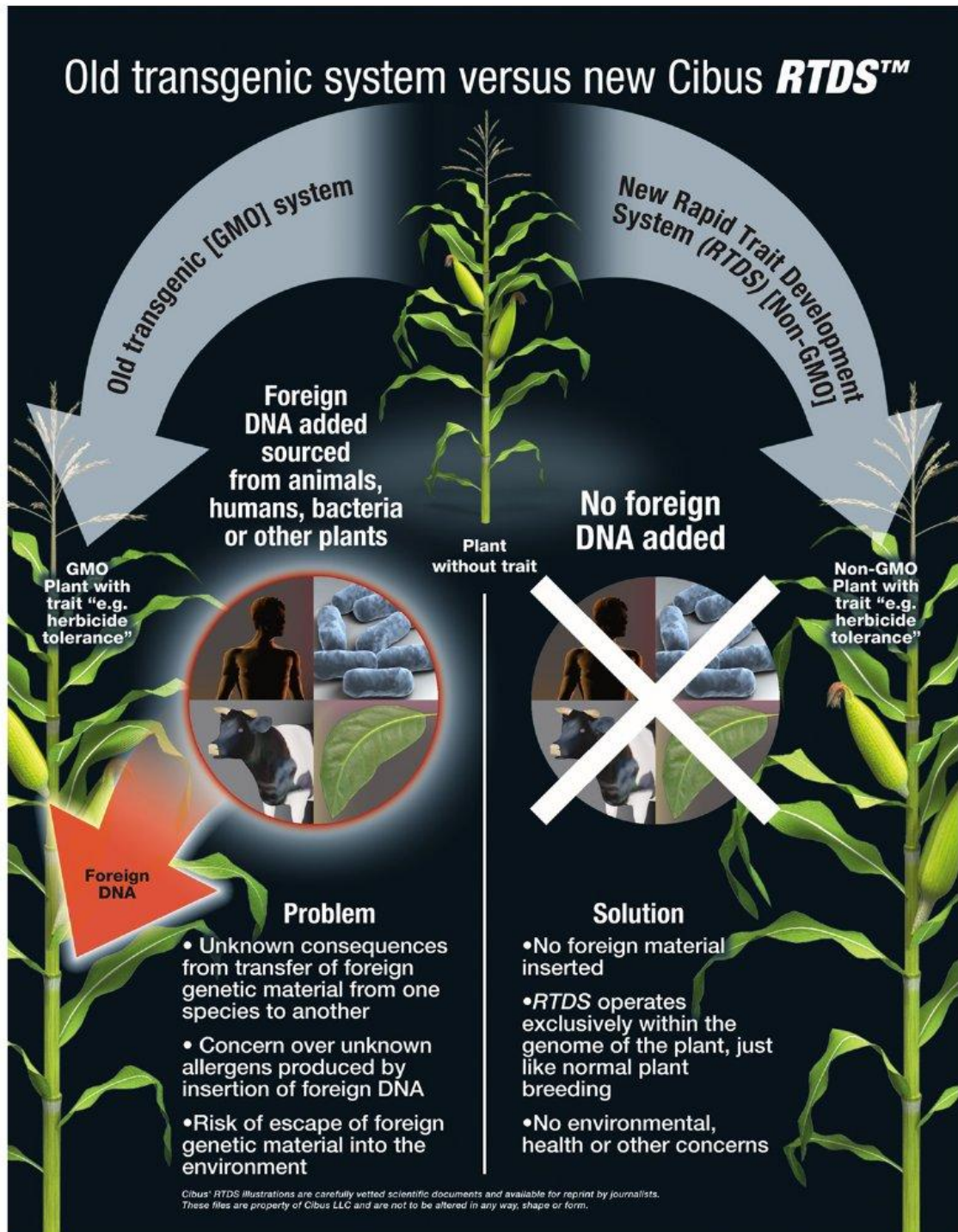
Cibus' RTDS illustrations are carefully vetted scientific documents and available for reprint by journalists. These files are property of Cibus LLC and are not to be altered in any way, shape or form.



# Oligonukleotidihjattu mutageneesi

## RTDS

3.





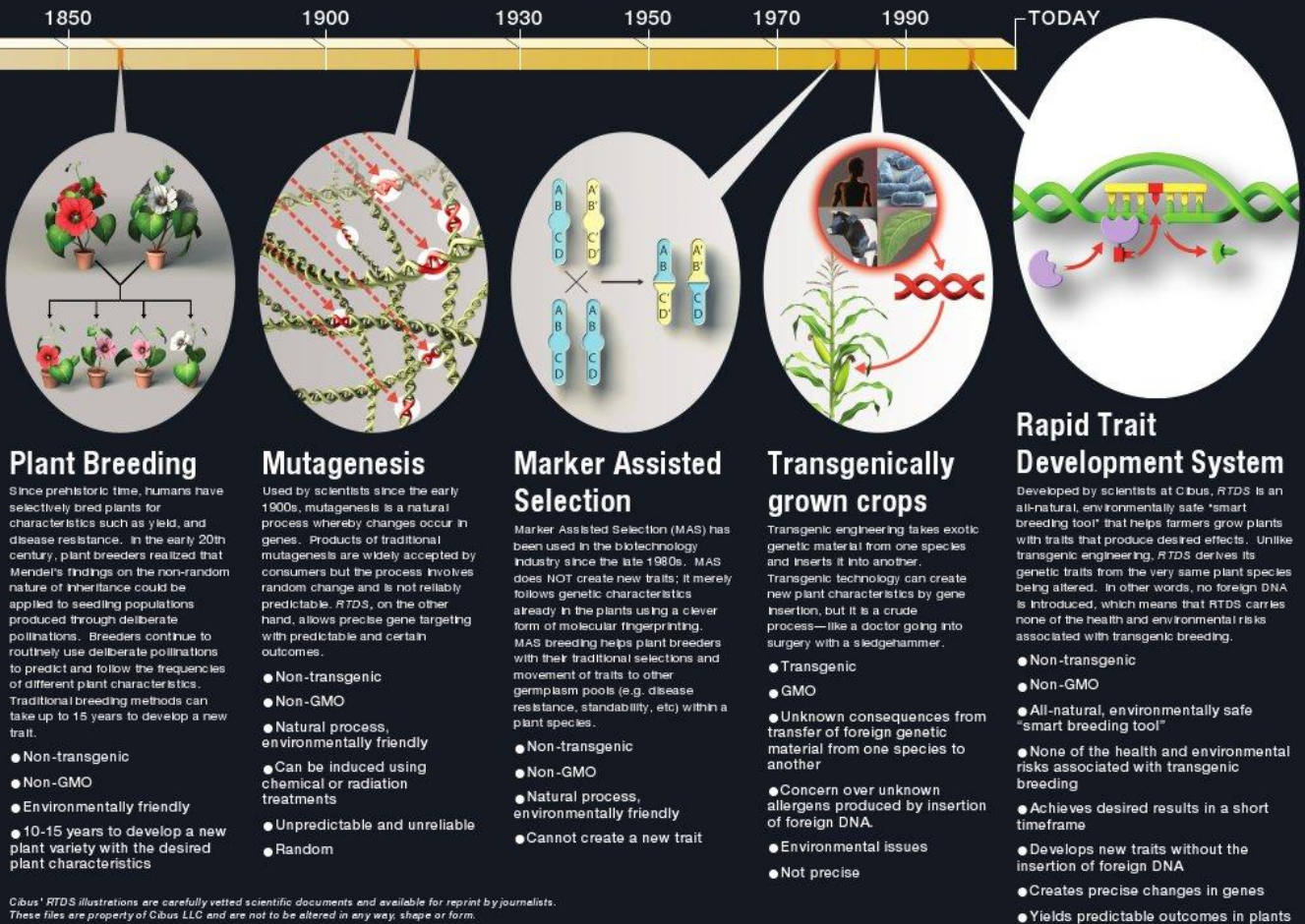


# Oligonukleotidihjattu mutageneesi

## RTDS

4.

### The Evolution of Plant Breeding: **RTDS™** versus other technologies



## Harjoitustehtävä:

Erittele, kuinka firma

– markkinoi muuntamistapaansa ratsastamalla

”hieman vinosti” yleisillä gm-erhekäsityksillä

– toivoo saavansa pianakin myydä menetelmää

”ei-geenimuunteluna” (myös EU:ssa!)

Jussi Tammisola, Kasvibioteknikan menetelmiä



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

1.

- Kasviaineistoista löytyy toisinaan jokin muita paljon parempi genotyyppi, ”huippuyksilö”
  - ...joka säännön mukaan on hyvin heterotsygoottinen\*
- Kuinka tätä huippuyksilöä voitaisiin viljellä kasvilajikkeena?
- ...kun suvullinen lisääntyminen ”sotkee kaiken” (edullinen genotyyppi on jälkeläistössä hajonnut).
  
- 1. Vanha osaratkaistu: **kloonaus**
  - ...niillä kasvilajeilla, joita manipuloinnin yleismies Jantunen on vuosituhansien kuluessa oppinut lisäämään suvuttomasti
- 2. Uusi yleisratkaisu: ”**käänteishybridit**”
  - ...toimii myös kasvilajeilla, joita osaamme toistaiseksi lisätä vain suvullisesti (siemenistä)
    - ...jollei kasvin kromosomiluku ole kovin korkea
- 3. Tuleva yleisratkaisu: **suvuttomat siemenet** (apomiksia\*\*)
  - ...joiden genotyyppi on sama kuin äitikasvilla
  - ...on vielä pääosin perustutkimuksen vaiheessa.

\* Täysin homotsygoottinen yksilö on harvoin paras edes itsesiittoisilla kasvilajeilla (vehnä, ohra, riisi)

\*\* Varsinkin puuvartisilla kasveilla kehitetään myös solukkoviljelyn avulla tuotettavia, ”somaattisia siemeniä”



# Taustaa: Perinteistä Frankenstein-ruokaa?

- Ovatko siniset perunat kloonattuja? <http://geenit.fi/KloonPer.pdf>



- Viljellyt omena- ja viinirypälelajikkeet on iät ja ajat kursittu kokoon ”terävän veitsen taiteella”



(J. Tuomisto: 100 kysymystä ympäristöstä ja terveydestä, Duodecim 2005)

- ...ymppäämällä jalo-oksa ”villiin” perusrunkoon
- Suvuttomasti eräitä kasvilajeja osataan lisätä mm. mukuloista, sipuleista, itusilmuista, rönsyistä, pistokkaista, taivukkaista, ymppäämällä, tai nykyisin jo myös solukko- tai soluviljelyllä
  - ...mutta aina se ei ole käytännön viljelyssä taloudellisesti mahdollista



# Taustaa: ”Perinteiset” hybridilajikkeet

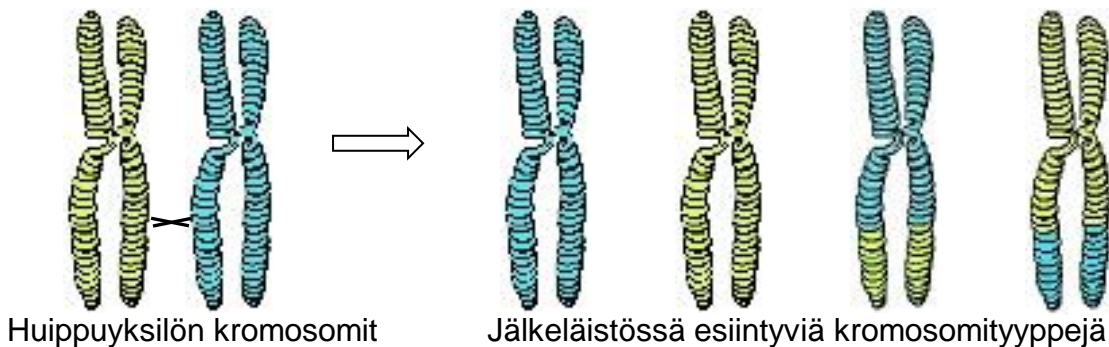
- Arvokkaita **hybridilajikkeita** jalostetaan perinteisesti yrityksellä ja erehdyksellä
- ”Risteytyselinvoimaa” (heteroosia) etsitään kokeellisesti
- ...tekemällä hyvin heterotsygoottisesta kasviyksilöstä (keinotekoisesti) (melko) homotsygoottisia jälkeläislinjoja
  - (pakotetulla) sisäsiitoksella (monen sukupolven ajan), tai
  - kasvattamalla yksilön siitepölystä soluviljelmien avulla ns. kaksoishaploideja kasviyksilöitä (yhdessä sukupolvessa)
- ...ja yhdistelemällä näitä homotsygoottisia linjoja sitten pareittain laajoilla risteytyskokeilla
  - Jotkin yhdistelmistä (hybridilinjosta) saattavat olla jopa 30–40 % parempia kuin tavalliset lajikkeet
  - Parasta yhdistelmää ryhdytään sitten viljelemään (hybridi)lajikkeena.
- Kaikkien mahdollisten yhdistelmien testaaminen koekentällä vaatisi ”käsittämättömän” paljon työtä:
  - M kasvilinjasta saadaan  $M(M-1)/2$  pareittaista yhdistelmää
    - ... joten esim. 1000 linjasta olisi siis testattava 500 000 yhdistelmää
- ...joten käytännössä vain *pieni* osa mahdollisista linjoista ja niiden yhdistelmistä voidaan testata jalostusohjelmissa
- ...ja parhaat hybridilinjat jäävät siksi käytännössä ”aina” löytymättä.



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

4.

- **Perinteisten hybridilajikkeiden** kylvösiemen saadaan risteyttämällä kaksi geneettisesti erilaista kasvinlinjaa massamitassa
- Jotta hybridilajikkeen kasviyksilöt voivat kaikki olla yhtä elinvoimaisia, niiden tulisi olla geneettisesti (lähes) identtisiä
  - ...mikä on ihanteellista myös sadon tasaisen laadun kannalta
- ... joten risteytettävien vanhemmaislinjojen täytyy olla (lähes) homotsygoottisia.
- **Huippuyksilön rekonstruointi risteytyksellä**
- (Hyvin heterotsygoottisen) huippuyksilön suvullinen jälkeläistö on erittäin kirjava, syynä kromosomien rekombinaatio ja kromosominosien tilkkutäkkejä tuottava crossing-over:



- ...joten huippuyksilön genotyyppiä on lähes mahdotonta tuottaa uudelleen risteyttämällä keskenään sen jälkeläisiä (tai niistä johdettuja homotsygoottisia linjoja) (taulukko 1).



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

5.

## ”Käänteishybridit”

- Jos sukusolujen muodostumisessa **crossing-over estetään**, niin huippuyksilön jälkeläistö on kuitenkin paljon vähemmän kirjavaa:
  - Kromosominosien tilkkutäkkejä ei synny
  - ...vaan ainoastaan uusia yhdistelmiä huippuyksilön ”ehjistä” kromosomeista
- Huippuyksilöstä voi tällöin syntyä vain *kohtuullinen määrä* erilaisia homotsygoottisia jälkeläislinjoja
  - ...jos vain kasvin kromosomiluku ei ole kovin korkea
- ...joten huippuyksilö voidaan **melko helposti tuottaa uudelleen** risteyttämällä keskenään kaksi sopivasti valittua homotsygoottista jälkeläislinjaa (taulukko 2)
- Näitä kahta valittua homotsygoottista kasvinlinjaa voidaan lisätä puhtaina siemenistä viljelymittakaavaan asti
- ...ja risteyttämällä näitä kahta linjaa keskenään massamitassa
  - ...kuten perinteisillä hybridilajikkeilla
- ...voidaan sitten tuottaa kylvösiementä viljelijöille huippuyksilön (kopioiden) kasvattamiseksi pelloilla ”huippulajikkeena”.
- Yksityiskohtia on käsitelty jäljempänä (kalvot 6–14).



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

6.

## Perinteiset hybridilajikkeet

- Heterotsygoottisesta huippuyksilöstä voidaan tuottaa hyvin suuri joukko erilaisia *homotsygoottisia* jälkeläislinjoja
  - ”Jos on onnea”, niistä löytyy komplementaarinen linjapari, jotka risteyttämällä ko. huippuyksilö voidaan tuottaa uudelleen
  - Tuota linjaparia lisäämällä kylvösiementä sitten voitaisiin tuottaa massamitassa ko. huippuyksilön viljelemiseksi lajikkeena
- Käytännössä tehtävä saisi mahdolliset, gigantiset mittasuhteet, sillä hyvin heterotsygoottinen yksilö tuottaa suvullisessa lisääntymisessä ”tähtitieteellisen” lukumäärän erilaisia jälkeläislinjoja:
  - Jos kasvi on diploidinen ja...
  - heterotsygoottinen  $m$  geenilokuksessa, niin...
  - erilaisia gameetteja (ja siis myös homotsygoottisia jälkeläisiä) on voinut syntyä  $2^m$  kpl  
( $2^{10} = 1024$ ,  $2^{20} = 1\,048\,576$ ,  $2^{30} = 1\,073\,741\,824$ )



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

7.

## Perinteiset hybridilajikkeet

- Kullekin homotsygootille linjalle on löydettävissä vain yksi sille komplementaarinen linja

Soveltamalla ehdollista todennäköisyyttä voidaan johtaa **tulos**:

- Jos tutkitaan  $k$  homotsygoottista jälkeläislinjaa, niin todennäköisyys että joukkoon ei vielä ole osunut yhtään komplementaarista paria (joista huippuyksilö voitaisiin rekonstruoida) on

$$\begin{aligned} P\{0;k,m\} &= \prod_{i=1}^k [1 - (i-1)/2^m] = \prod_{i=1}^k \{[2^m - (i-1)]/2^m\} \\ &= [(2^m-1)!/(2^m-k)!] / 2^{(k-1)m} \quad (\text{JT 21.1.2010}) \end{aligned}$$

- Esim. jos  $m=10$  (eli huippuyksilössä olisi vain 10 heterotsygoottista lokusta) ja tutkitaan 10 homotsygoottista jälkeläislinjaa ( $k=10$ ), niin on hyvin todennäköistä, että yhtään komplementaarista paria ei niiden joukosta löydy:  $P\{0;10,10\} \approx 0,96$ .  
Onnistumisen mahdollisuudet olisivat fifty-fifty vasta, kun tutkitaan 40 linjaa:  $P=0,46$ . Käytännössä heterotsygoottisen huippuyksilön ( $m \gg 10$ ) rekonstruointi olisi erittäin vaikeaa (taulukko 1).





# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

8.

## Perinteiset hybridilajikkeet

### Taulukko 1. Perinteinen jalostus.

Todennäköisyys, että huippuyksilön homotsygoottisista jälkeläislinjoista löytyy ainakin yksi geneettisesti komplementaarinen pari, joka risteyttämällä huippuyksilö voidaan rekonstruoida

Tutkittujen homots. jälkeläislinjojen lkm	Huippuyksilön heterotsygoottisten geenilokusten lkm			
	10	20	30	40
10	0,04	0,00004	$4 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-11}$
20	0,17	0,0002	$1,8 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-10}$
30	0,35	0,0004	$4 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-10}$
40	0,54	0,0007	$7 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-10}$
50	0,70	0,0012	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-9}$
100	0,99	0,0047	$4,6 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-9}$
200	1	0,019	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-8}$
500	1	0,11	0,00012	$1,1 \cdot 10^{-7}$



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena? Perinteisistä ”käänteishybrideihin”

9.

- Päätelmä: perinteisessä jalostuksessa huippuyksilön rekonstruointi lajikkeeksi ei onnistu käytännössä, sillä
  - tutkittavia jälkeläislinjoja olisi aivan liikaa
  - ...ja niiden kaikkien täysi genotyypitys (dna-merkein?) tulisi aivan liian raskaaksi
- *Tarvittiin siis oivallus:*
- **”Käänteishybridi”-menetelmässä crossing-over meioosissa estetään** (sopivalla muuntogeenillä\*)
  - ...kun homotsygoottisia jälkeläislinjoja tehdään
- Tulos: Erilaisten homotsygoottisten linjojen lukumäärä saattaa romahtaa
  - ...sillä niitä voi syntyä enintään  $2^n$  erilaista (missä  $2n =$  kasvin kromosomiluku: ohralla  $2n=2x=14$ , vehnällä  $2n=6x=56$ )
    - täysin riippumatta heterotsygoottisten lokusten lukumäärästä!
  - ...joten komplementaarinen linjapari löytyy käytännössä helposti, *mikäli* kasvilajin kromosomiluku ei ole suuri (taulukko 2).

\*Siksi EY-työryhmä selvittää, onko syntyvä lajike ’muuntogeeninen’



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

10.

## ”Käänteishybridit”

**Taulukko 2. ”Käänteishybridi”menetelmä.  
Todennäköisyys, että heterotsygoottisen\*  
huippuyksilön homotsygoottisista  
jälkeläislinjoista löytyy ainakin yksi  
geneettisesti komplementaarinen pari,  
joka risteyttämällä huippuyksilö voidaan  
rekonstruoida**

Tutkittu- jen homots. linjojen lkm	Kasvin kromosomiluku (2n)		
	14 (ohra)	20 (maissi)	56 (vehnä)
10	0,30	0,04	$1,7 \cdot 10^{-7}$
20	0,79	0,17	$7 \cdot 10^{-7}$
30	0,975	0,35	$1,6 \cdot 10^{-6}$
40	0,9989	0,54	$2,9 \cdot 10^{-6}$
50	0,9999	0,70	$4,6 \cdot 10^{-6}$
100	1	0,99	$1,8 \cdot 10^{-5}$
200	1	1	$7,4 \cdot 10^{-5}$
500	1	1	0,00047

\*Oletetaan, että heterotsygotiaa esiintyy huippuyksilön  
kaikissa kromosomeissa



# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

11.

## ”Käänteishybridit”

- Jos crossing-overin estävä muuntogeeni jää mukaan homotsygoottisiin linjoihin, niin niistä rekonstruoitu lajike ei ole geneettisesti täysin identtinen kopio huippuyksilöstä
  - ...ja se täytyisi hyväksyttää gm-lajikkeena.
- Muuntogeeni voidaan uusimmissa menetelmissä leikata kasvista pois jälkeen päin
- ...mutta tässä tapauksessa poisto onnistuisi helposti (risteyttämällä) myös klassillisia muuntelumenetelmiä käytettäessä, tekemällä vain perusasia kahteen kertaan:
  - Suoritetaan sama geenimuunnos riippumattomasti uudelleen
    - ...jolloin geeni kiinnittyy eri kohtaan
  - Homotsygoottisia jälkeläislinjoja tuotetaan sitten huippuyksilön kummastakin gm-linjasta
  - ...ja valitaan niistä käytettäväksi *muuntogeenittömiä* komplementaarisia linjapareja (ks. vaiheet 1-5 jäljempänä).

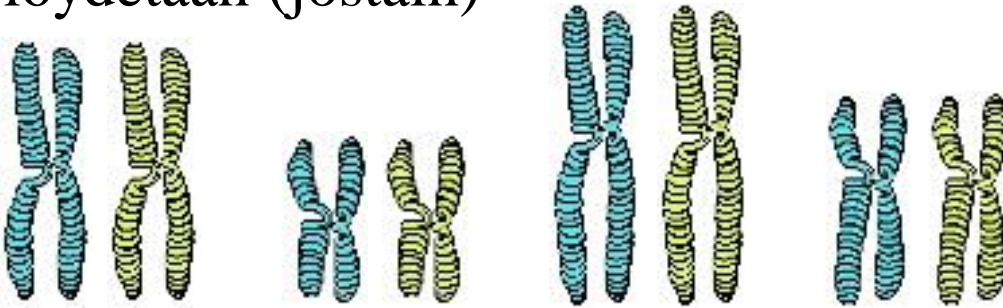


# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

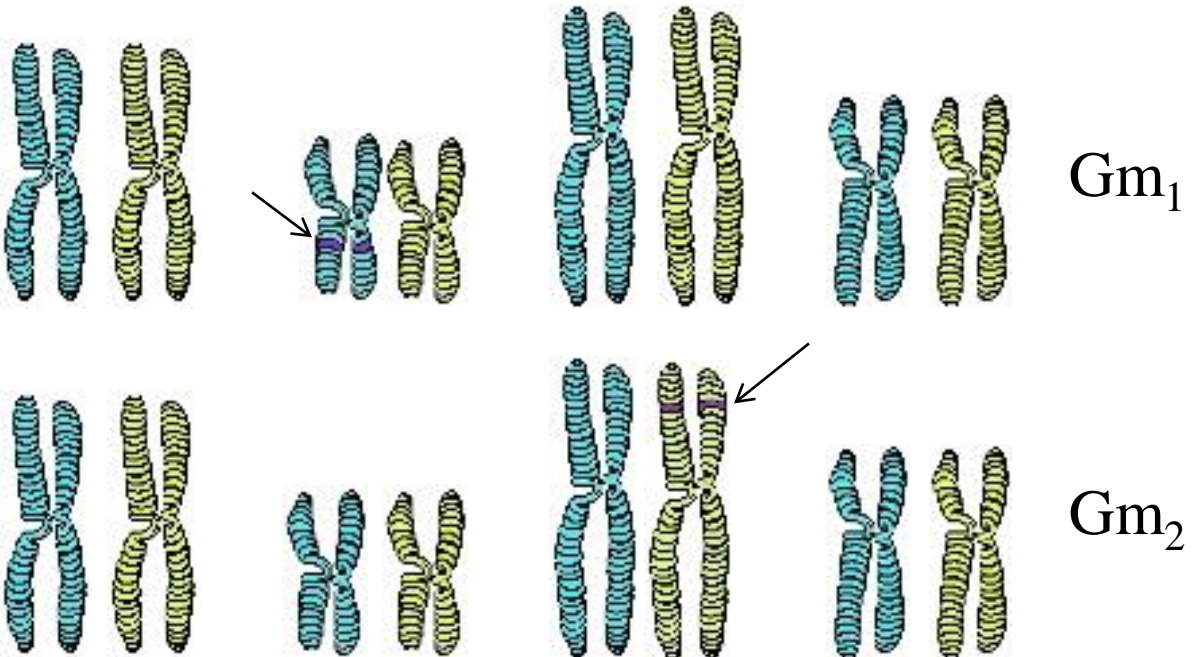
12.

## "Käänteishybridit"

Vaihe 1. Heterotsygoottinen huippuyksilö löydetään (jostain)



Vaihe 2. Siitä tehdään kaksi eri gm-linjaa lisäämällä geeni "Ei Crossing-Overia" ■



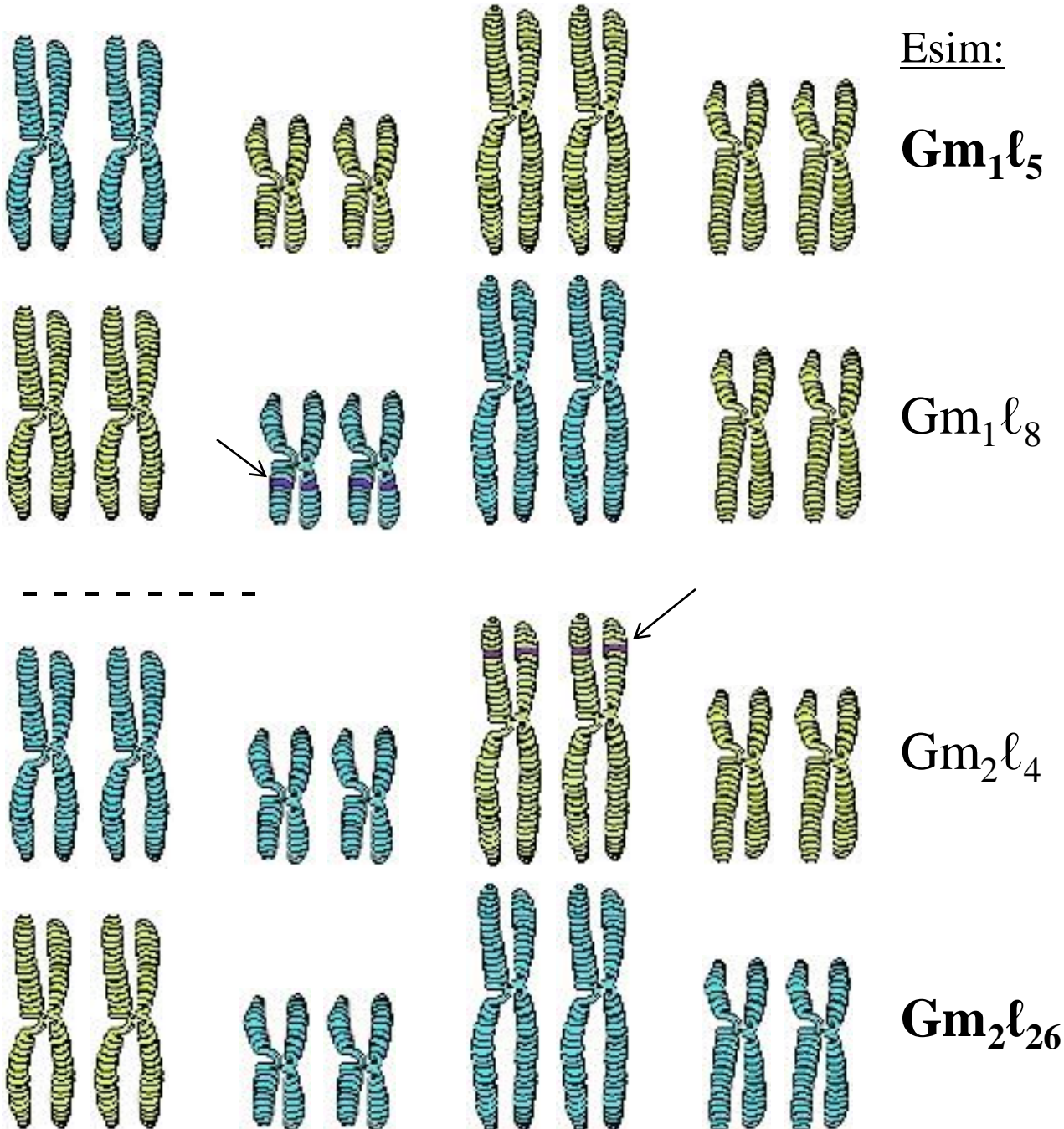


# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

13.

## "Käänteishybridit"

Vaihe 3. Kummastakin gm-linjasta tuotetaan homotsygoottisia jälkeläislinjoja (Huom! Puolet niistä on ilman muuntogeeniä)





# Kuinka voitaisiin viljellä huippuyksilöä lajikkeena?

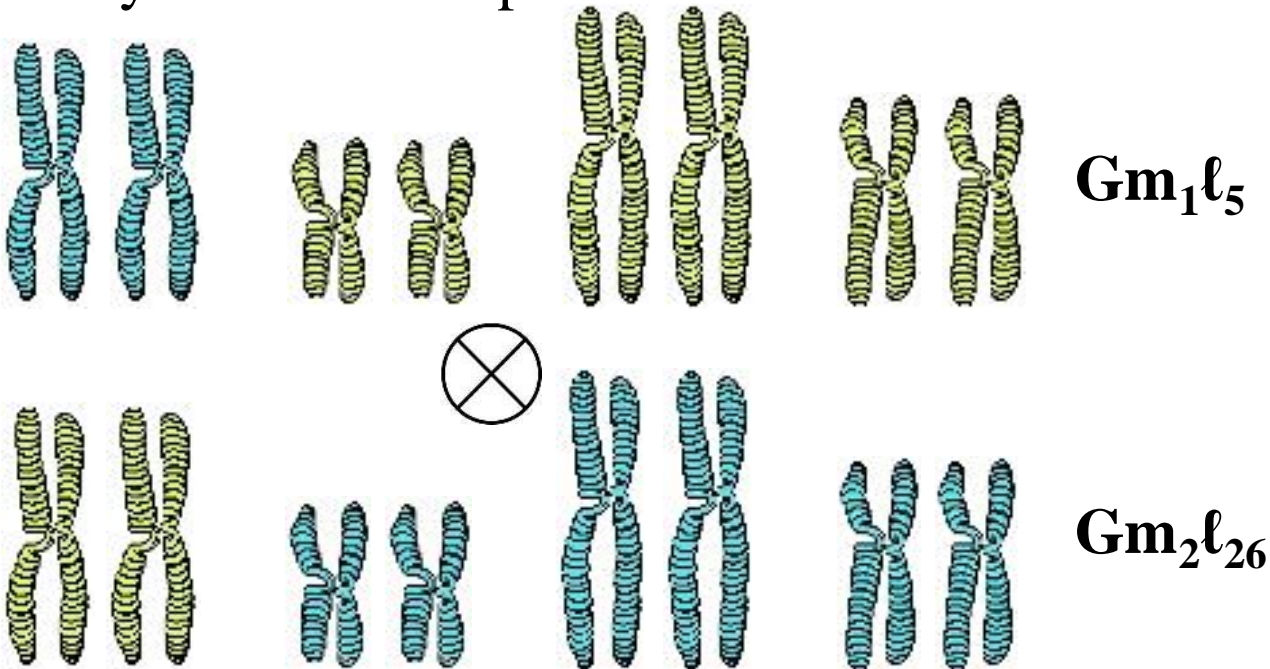
14.

## ”Käänteishybridit”

Vaihe 4. Valitaan *muuntogeenitön* komplementaarinen linjapari

– toinen linjan Gm<sub>1</sub>, toinen linjan Gm<sub>2</sub> homotsygoottisista jälkeläislinjoista.

Vaihe 5. **Huippulajikkeen kylvösiemen** tuotetaan lisäämällä näitä valittuja linjoja ja risteyttämällä ne lopuksi keskenään.



Huom! Sopivista pareista otetaan käyttöön elinvoimaisin (sillä sisäsiitosdepressio heikentää usein homotsygoottisten yksilöiden elinkykyisyyttä ristisiitteisillä kasvilajeilla).



# Hybridilajikkeen lisääminen suvuttomien siementen (apomiksian) avulla

1.

- Perinteisesti hybridilajikkeen kylvösiemen joudutaan tuottamaan risteyttämällä lajikkeen (homotsygoottiset) vanhemmaislinjat massamitassa aina uudelleen
- Luonnon heinäkasveilla tavataan kuitenkin usein apomiksiaa: suvutonta siementen muodostumista
- Jos siemen syntyy emokasvin solukosta ilman meioosia, sen genotyyppi voi olla sama kuin emokasvilla
- ...joten apomiktisista siemenistä hybridilajiketta
  - tai mitä tahansa heterotsygoottista yksilöä
- ...voitaisiin lisätä viljelyyn muuttumattomana.
- Viljelijä voisi tällöin lisätä hybridilajiketta vuodesta toiseen oman pellon siemenestä
  - ...mistä voisi olla apua köyhien alueiden pienviljelijöille.
- Toimivaa apomiksiaa ollaan kehittämässä viljoille varsinkin geenimuuntelun avulla.





# Hybridilajikkeen lisääminen suvuttomien siementen (apomiksian) avulla

2.

- 1. On myönnetty patentti menetelmälle, jonka avulla vaihtoehtoisesti apomiktisen hybridilinjan apomiksia voidaan ”stabiloida” (Carman 2009)
  - ...siinä mielessä, että myös toisinaan syntyvistä suvullisista siemenistä kasvaa apomiktisia yksilöitä
    - ...jotka kylläkin ovat geneettisesti erilaisia (eivät enää vastaa hybridilajikkeen laatua)
  - ...joten kasvilinja säilyy kyllä apomiktisena (joskaan lajikevaatimukset eivät enää täyty)
  - Viimeisenä vaiheena menetelmässä kasviin viedään geeni, joka estää meioosin.
- 2. Australia ja Filippiinit ovat yrittäneet yhdessä kehittää apomiktista hybridiriisiä (Bennett ym. 2008, Bennett ja Zhao 2008).
  - Ongelma on monimutkaisempi kuin ensin uskottiin
  - Uusien ratkaisujen uskotaan löytyvän hyödyntämällä hiivan meioositutkimuksia
- 3. Maissiin piti tuoda apomiksiaa *Tripsacumista*
  - ...saatiinkin tietoa genetiikasta (Leblanc ym 2009)