

Teemu Lindqvist ja Julia Tolsa

Lituruohon geenimutaatioiden analysointi juuressa ja niiden vaikutus jälsisolukkoon

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

15.04.2015

<p>Tekijät Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Teemu Lindqvist, Julia Tolsa Lituruohon geenimutaatioiden analysointi juuressa ja niiden vaikutus jälsisolukkoon</p> <p>72 sivua + 2 liitettä 15.4.2015</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Bioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Bioanalytiikan koulutusohjelma</p>
<p>Suuntautumisvaihtoehto</p>	<p>Bioanalytiikka</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Lehtori Hannele Pihlaja Vastuullinen tutkija Ari Pekka Mähönen Kasvibiologi Tiina Blomster</p>
<p>Opinnäytetyömme tarkoitus oli analysoida lituruohomutanttilinjoja käänteisen genetiikan avulla. Kasviliinjojen analysoiminen perustuu T-DNA-insertion avulla tehtävään mutaatioon, joka estää geenin toiminnan kasvin genomissa. Lituruohon juuren fenotyypistä tehdään johtopäätöksiä vertaamalla muutoksia villi tyypin kasviliinjoin ja päättelemällä paksuus-kasvun muutosten merkitystä jälleen toiminnan säätelyssä.</p> <p>Tutkittavat mutanttilinjat valittiin mikroarray-tutkimuksissa saatujen tulosten perusteella. Analysoimme 47 kandidaattigeenin sisältävää linjaa, joista meidän piti ensin selvittää viiden genotyyppi PCR-menetelmän avulla. Näiden lisäksi käsittelimme yhdeksää <i>crf</i>-mutanttilinjaa ja kahta GUS-promoottorilinjaa.</p> <p>T-DNA-insertion sisältämät siemenlinjat tilattiin kantakeskuksesta ja niitä kasvatettiin kaksi viikkoa kasvatusaljoilla. Homotsygoottien kasviliinjojen juuria analysoitiin histologisten poikkileikkeiden avulla, mittaamalla juurten paksuus 0,5 cm hypokotyylialueen alapuolelta. Poikkileikkeitä vertailtiin villi tyypin kontrolliin (Columbia) mahdollisten jälsisolukkoon vaikuttavien fenotyyppien löytämiseksi lituruohon juuressa.</p> <p>Keskeisinä tuloksina löysimme yhteensä 8 tilastollisesti merkittävää linjaa, joissa voisi esiintyä mahdollinen fenotyyppi paksuuskasvun suhteen. Näiden lisäksi olemme tarkastelleet muutamaa muuta fenotyypin suhteen kiinnostavaa linjaa. Suurin ero Columbian ja mutanttilinjan (<i>L1</i>) välillä oli -166,6 μm, joka vastasi 70,1 % villi tyypin halkaisijasta. Analyysi toteutettiin kuitenkin vain kerran ja pienellä otoksella. Tästä huolimatta tulosten avulla pystytään karsimaan potentiaalisten mutanttilinjojen määrää, joissa geneilla olisi vaikutusta jälleen aktiivisuuden säätelyssä.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>lituruoho, T-DNA-insertio, sytokiniini, jälsi, fenotyypitys, <i>CRF</i>, GUS-ekspressio</p>

Authors Title	Teemu Lindqvist, Julia Tolsa Cambium Mutant Analysis of the Arabidopsis Thaliana Root
Number of Pages Date	72 pages + 2 appendices 15 April 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Ari Pekka Mähönen, Research Group Leader Tiina Blomster, Plant Biologist
<p>The purpose of this study was to analyze the root of <i>Arabidopsis thaliana</i> mutant lines using reverse genetic analysis. With reverse genetics we can study the effects of a single missing gene by observing its effect on the plant phenotype. The studied mutant lines were made using agrobacteria mediated T-DNA insertion techniques.</p> <p>We analyzed mutant lines searching for genes that would affect cambium development and activity. The mutant lines for our study were chosen based on results from an earlier microarray study. In our study we had 47 candidate genes, 5 of which needed to be genotyped before analysis. We also had 9 <i>crf</i>-mutant lines available for analysis, and 2 GUS-promoter lines for <i>CRF</i>-genes.</p> <p>We planted seeds acquired from stock centers and grew them for two weeks. We analyzed the plants by conducting histological crosscuts and measuring the thickness of the roots at 0,5 centimeters below the hypocotyl. These figures were then compared with our wild type control (Columbia) in order to find a possible phenotype that could indicate a change in cambium development and activity in the Arabidopsis root.</p> <p>Results based on the comparison of root diameter to the Columbia control showed that 8 out of 56 candidate mutant lines were statistically significant concerning a possible phenotype. In addition, we found a number of other interesting phenotypes, which we have examined more closely. The largest average difference between Columbia and a candidate mutant line (<i>L1</i>) was -166,6 μm (a root diameter of 70,1% of the Columbia root). However this study was performed with only one biological repeat and a small sample collection. In conclusion, this study will help narrow down the search for cambium mutant genes, and serve as a stepping stone for further research into the most promising mutant lines.</p>	
Keywords	Arabidopsis thaliana, T-DNA insertion, cytokinin, cambium, phenotyping, <i>CRF</i> , GUS-expression

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Aiheen esittely	2
2.1	Paksuuskasvuun vaikuttavat säätelytekijät	2
2.2	Opinnäytetyön tausta	4
3	Opinnäytetyön tavoitteet	5
4	Tarkoitus	6
5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7
5.1	Kaksisirkkaisten kasvien rakenne	8
5.2	Juuren kasvu ja anatomia	9
6	Geenitekniikka kasveilla	11
6.1	T-DNA-insertio ja geeninsiirto	12
6.2	Periytymisen peruslainalaisuudet	13
6.3	Geenien ilmentyminen ja sen tutkiminen	15
7	Aineisto ja aineiston käsittely	16
8	Toteutus ja menetelmät	17
8.1	Siementen esikäsittely	18
8.2	Germinaatio	19
8.3	Juurten fiksaatio ja poikkileikkeiden valmistus	20
8.4	Ilmenemisen tutkiminen GUS-värjäyksen avulla	23
8.5	Genotyypitys	24
8.5.1	Antibioottisegregaatio	25
8.5.2	Linjojen genotyypitys PCR:n avulla	26
9	Tulokset	28
9.1	<i>Crf</i> -linjojen tulokset	29
9.2	GUS-ekspressio	32
9.3	K-kokoelman tulokset	38
9.3.1	Antibioottisegregaation tulokset	39
9.3.2	Elektroforeesierottelun tulokset	39
9.3.3	Poikkileikkeet	44

9.4	L-linjojen tulokset	46
9.5	M-linjojen tulokset	50
10	Johtopäätökset	56
11	Opinnäytetyön luotettavuus	60
12	Eettisyys	63
13	Pohdinta	64
	Lähteet	70
	Liitteet	
	Liite 1. Analysoitavien linjojen mittaustulokset	
	Liite 2. Käytettyjen DNA-pitoisuuksien arvot	

1 Johdanto

Opinnäytetyön aihe oli tutkia lituruohon (*Arabidopsis thaliana*) juuren avulla kasvien paksuuskasvuun vaikuttavan jälsisolukon kehitystä. Lituruoho on monin puolin hyödyllinen tutkimuskohde kasvien molekyylogeneettistä tutkimusta varten. Sillä on viisi kromosomia ja pieni genomi, johon kuuluu viimeisimmän julkaisun (2009) mukaan 27 416 proteiineja koodaavaa geeniä. Se on yksinkertainen kasvi, jonka pienen koon ansiosta sen kasvattaminen on nopeaa ja elinkierto lyhyt. (The Arabidopsis Information Resource 2014.) Mielenkiintoisten geenien tutkimisessa käytettiin hyväksi käänteistä genetiikkaa (reverse genetics) eli tutkittiin tahallisesti tuotettuja geenimutaatiovirheitä kyseisissä geneissä ja tarkkailtiin kasvin fenotyypissä tapahtuvia muutoksia (Helariutta 2002).

Opinnäytetyö toteutettiin Ari Pekka Mähösen tutkimusryhmässä Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa. Tutkimusryhmä tekee laajaa tutkimusta lituruohon jälsisolukon molekyylibiologiasta. Meidän aiheemme oli osa Tiina Blomsterin tutkimustyötä, joka käsittelee lituruohon juuren paksuuskasvua, sekä juuren jälsisolukon geenien ilmentymistä.

Jälsi aikaansaa kasvien juuren sekä varren paksuuntumisen, kun puolestaan primaarinen apikaalimeristeemi kasvattaa pääasiassa kasvin pituutta kärkikasvupaikoissa. Juuressa erilaistuneet jälsisolut muodostavat yhtenäisen solukerroksen, jotka alkavat jakautumaan sekundaarisen paksuuskasvun aikana muodostaen puuta ja nilaa. Tätä kutsutaan yleisesti paksuuskasvuksi. (Pyykkö 1979: 158-159.)

Lituruohoa voidaan käyttää hyväksi puiden kasvuun liittyvän tutkimuksen suorittamisessa, sillä näiden sekundaarikasvu toimii pitkälti samalla periaatteella. Verrattuna täysikokoiseen puuhun, lituruoho itää täysikasvuiseksi kasviksi ja tuottaa seuraavan sukupolven siemenet noin kuudessa viikossa. Puiden sekundaarikasvun tutkimisessa lituruoho toimiikin otollisena mallikasvina. (Matsumoto-Kitano – Kusumoto ym. 2008.) Puiden tuottaman biomassan lisääminen on tärkeä osa puuteollisuutta ja edelleen kasvatetaan uusiutuvien raaka-aineiden määrää, mitä voidaan hyödyntää fossiilisten polttoaineiden sijaan energian lähteenä (Blomster – Mähönen 2013).

2 Aiheen esittely

Kyky sopeutua muuttuviin elinolosuhteisiin korostuu erityisesti kasveilla, sillä ne eivät voi siirtyä uuteen kasvuympäristöön. Ympäristössä tapahtuvat muutokset laukaisevat kasvin soluissa erilaisia vastereaktioita, joiden seurauksena muodostuu tarkoin signa-loituja proteiineja. Tätä kautta kasvi pystyy muuttamaan ominaisuuksiaan ja säätele-mään kasvuaan niin, että se kykenee selviytymään uudessa ympäristössä. Tämä mah-dollistaa myös kasvin kyvyn uudistua vaurioiden ilmentyessä. (Palva 2001: 43-46; Jouannet – Brackmann – Greb 2014.)

Toistaiseksi kasvun säätelystä vastaavaan jälsisolukkoon vaikuttavien molekyylisten muutosten tapahtumaketju on yksi suurimmista haasteista kasvitutkimukselle, sillä mo-nia kasvilajeja on vaikea tutkia. Vasta viime vuosien aikana on saatu vastauksia eri kasvusolukoiden kasvuun ja kehittymiseen liittyviin ilmiöihin sekä järjestelmien väliseen dynamiikkaan sekundaarikasvussa käyttäen hyväksi esimerkiksi lituruohoa. (Jouannet – Brackmann – Greb 2015.) Erilaisten molekyylisten säätelytekijöiden lisäksi kasvien kasvu ja solukoiden kehittyminen on voimakkaasti riippuvainen ympäristötekijöistä, kuten ravintoaineiden ja valon saatavuudesta, kuivuudesta, lämpötilasta ja mekaanisis-ta stressitekijöistä (Miyashima – Sebastian – Lee – Helariutta 2013). Jälleen kasvun säätelämiseen pystytään vaikuttamaan ja tietoa pystytään hyödyntämään muuttuvan ympäristön tarpeita vastaavaksi, kun kyseiset geenit on pystytty paikallistamaan ja nii-den toiminta kasvilla on kartoitettu (Palva 2001: 43-46).

2.1 Paksuuskasvuun vaikuttavat säätelytekijät

Jälleen aktiivisuuteen ja kasvun säätelyyn vaikuttavat monenlaiset tekijät, kuten kasvi-hormonit ja transkriptiotekijät. Näiden välityksellä kasvisolut viestivät keskenään ja ky-kenevät toimimaan yhtenäisenä kokonaisuutena peptidien ja vastaanottavien resepto-rien välityksellä. Lukuisissa aikaisemmissa tutkimuksissa on havainnoitu erilaisia kas-vihormoneja, jotka säätelevät jälleen aktiivisuutta. Näitä ovat muun muassa sytokiniini, auksiini, gibberelliini ja jasmonaatti. (Miyashima – Sebastian – Lee – Helariutta 2013.)

Transkriptiotekijät säätelevät geenien ilmenemistä monimutkaisten järjestelmien tulok-sena. Suurelta osin näiden prosessien tarkkaa toimintaa eukaryooteilla ei kuitenkaan vielä tunneta. (Suominen – Pärssinen ym. 2010: 60-61.) Lituruohon lisääntynyt geneet-

tinen tutkimus on mahdollistanut lukuisten jäljen toimintaan vaikuttavien transkriptiotekijöiden osittaisen tunnistamisen (Miyashima – Sebastian – Lee – Helariutta 2013). Tutkimukset ovat myös korostaneet monissa yhteyksissä monimutkaisten säätelytekijöiden keskinäistä vuorovaikutusta jäljen kehitymisessä. Esimerkiksi auksiinin ja sytokiiniin keskinäisellä suhteella ja vuorovaikutuksella on tärkeä merkitys esijällen muodostumisessa lituruohon juuressa. Lisäksi monet transkriptiotekijät ovat herkkiä kasvihormonieritykselle ja sitä kautta hormoni on yhteydessä geenin aktivoitumiseen ja jällessä tapahtuviin muutoksiin. (Jouannet – Brackmann – Greb 2015.)

Johtosolukon kehittymiseen johtavien vaikutustapojen lisäksi sytokiiniini vaikuttaa muihin muihinkin kasvin kasvuun ja kehitykseen liittyviin prosesseihin. Pääasiassa se kuitenkin edistää solujen jakaantumista ja erilaistumista. (Mähönen 2005.) Tämän lisäksi sytokiiniinilla on oleellinen rooli jäljen aktiivisuuden säätelijänä sekundaarikasvun aikana. Lukuisten tutkimusten seurauksena on pystytty aikaansaamaan lituruohossa sytokiiniin muodostumista rajoittava mutaatio neljässä sitä koodaavassa isopentenyyli-transferaasi (*ipt*) geenissä. Sytokiniinirajoitetulla *ipt1;3;5;7* lituruohomutantilla tehdyissä tutkimuksissa kasvien fenotyyppi paljasti mutanttien juurista puuttuvan sekundaarisen jälsisolukon, mikä ilmeni kasvin kyvyttömättömyytenä kasvaa sekundaarista paksuuskasvu. Tutkimuksessa osoitettiin myös, että *ipt1;3;5;7* mutanttilinjan kasvien paksuuskasvu voidaan aktivoida siirtämällä ne sytokiiniinillä varustettuun kasvualustaan. (Matsumoto-Kitano – Kusumoto ym. 2008.) Auksiinilla on tärkeä rooli esijällen erilaistumisessa erilaisiksi solukoiksi auksiinivälitteisen transkriptiotekijän säätelijänä. Toistaiseksi kehityksellisiä muutoksia esijällen ja sekundaarisen jäljen siirtymävaiheessa ei kuitenkaan tunneta vielä kovin hyvin. (Miyashima – Sebastian – Lee – Helariutta 2013.) Lisäksi *Populus* -haavalla tehtyjen tutkimusten perusteella auksiinilla voisi olla oleellinen rooli ksyleemin eli puusolukon muodostumisessa. (Zhang – Elo – Helariutta 2011).

Sytokiniinilla ja auksiinilla on erilaisten transkriptiotekijöiden lisäksi oleellinen osa jäljen aktiivisuuden säätelyssä. Transkriptiotekijöistä muun muassa CRF:t (CYTOKININ RESPONSE FACTORS) ovat tärkeä osa sytokiiniin signalointia kaikissa maa- ja versokasveissa. *CRF*-geenejä on tunnistettu toistaiseksi lituruohossa 12 kappaletta. (Zwack – Shi – Robinson ym. 2012.) *CRF*-transkriptiotekijät ovat osa sytokiiniin säätelyjärjestelmää. *CRF*-geenien ilmentymistä on tutkittu lituruohossa, haavassa ja tomaatissa, ja on osoitettu, että geenit ilmenevät pääosin kasvien johtosolukossa. Tutkimuksissa on myös osoitettu, että *crf*-mutanttilinjat aiheuttavat lehtien johtosolukossa poikkeavia ra-

kenteellisiä muutoksia, joka antaa viitettä *CRF*-geenien osallistumisesta johtosolukon muodostumisessa. (Zwack – Shi – Robinson ym. 2012.)

Kasvien johtosolukon kehityksessä kasvihormoni gibberelliinin osuutta on tutkittu paljon muun muassa haavan ja muiden koppisiemenisten kasvien avulla. Tutkimuksien perusteella kyseisellä hormonilla saattaa olla erityistä osuutta jäljen jakautumisessa, kun kasvi kärsii erityisestä mekaanisesta stressistä. (Miyashima – Sebastian – Lee – Helariutta 2013.) Jasmonaatin vaikutusta jälsisolukkoon on tutkittu lituruohon avulla ja pyydytty osoittamaan hormonin signalointia edistävien geenien yhteys jäljen aktiivisuuteen. Kyseisellä hormonaalisella reitillä on yleisesti oletettu olevan vaikutus kasvin mekaanisen häiriön tai vamman korjaamisessa. (Sehr – Agusti – Lehner ym. 2010.)

2.2 Opinnäytetyön tausta

Tutkimukset, jotka edistävät lituruohon kaikkien geenien toiminnan kartoittamista, edistävät geenitutkimusta monella eri tavalla ja vievät tiedettä jo sinänsä eteenpäin (Helariutta 2002). Lituruoholla on yhtäläisyyksiä monien eukaryoottien sekä bakteerien geenien kanssa, mikä mahdollistaa lituruohotutkimuksen soveltamisen joltain osin myös esimerkiksi muiden kasvien ja eläinten geenitutkimukseen. Lituruohon proteiineja koodaaviksi geeneiksi tunnistetuista geeneistä noin 48–60 prosentilla on samankaltaisuutta banaani-karpäsen *Drosophila* -sukuun ja ihmisen genomiin verrattuna. (The Arabidopsis Genome Initiative 2000: 798-799.) Suurimmasta osasta lituruohon proteiineista löytyy vastine eläimistä, mutta sillä on myös pelkästään kasveille ominaisia proteiinirakenteita, kuten soluseinän muodostuminen ja fotosynteesinsäätely (Lesk 2005: 96).

Kokonaisuuden, johon opinnäytetyömme kuuluu, tarkoitus on ensisijaisesti lisätä metsäpuiden geneettistä tutkimusta. Lituruohon sekundaarisen kasvun aikaansaama puuosan muodostuminen tarkoittaa, että lituruoho soveltuu myös puun kasvun tutkimiseen. (Nieminen - Kauppinen - Helariutta 2004). Tätä teoriaa tukee myös tutkimus, jossa on tutkittu lituruohon ja puiden primaarisen ja sekundaarisen kasvun säätelytekijöitä. Tutkimuksessa löydettiin useita yhdistäviä säätelytekijöitä, jotka saavat jälsisolukon erilaistumaan puuosaksi sekä lituruoholla että lehtipuilla. (Zhang – Elo – Helariutta 2011.) Saatuja tuloksia voidaan soveltaa esimerkiksi Suomen tärkeimpiin talouspuihin kuuluvien kuusen ja koivun geenien analyysissä (Suomen luontaisia puulajeja. 2011). Mikäli tutkittavat, lituruohon juuren paksuuteen vaikuttavat geenit löytyvät myös kyseisistä

puista, tuloksia voidaan suoraan hyödyntää esimerkiksi koivun geneettisessä tutkimuksessa (Palva 2001: 50-51).

Paksu puun varsi on arvokasta raaka-ainesta metsäteollisuutta ajatellen (Palva 2001: 45, 51). Vuonna 2012 Suomen metsäteollisuus tuotti melkein 18 % Suomen teollisuuden tuotannon arvosta, mikä on kolmanneksi suurin kotimainen tuotannon lähde (Tilastokeskus 2013). Biomassan lisääminen on tärkeää metsätalouden kannalta ja geenitekniikka tarjoaa mahdollisuuksia tehokkaaseen puiden jalostukseen, jotta voidaan valmistaa kestäväää ja hyvälaatuista raaka-ainetta erilaisiin teollisuuden käyttökohteisiin (Palva 2001: 51).

3 Opinnäytetyön tavoitteet

Tässä opinnäytetyössä keskitytään kartoittamaan lituruohon juuren jällessä ilmeneviä geenejä, joilla on mahdollisesti yhteys kasvin paksuuskasvun säätelyssä. Tavoitteena on oppia ymmärtämään sellaisten geenien toimintaa ja merkitystä, joilla on havaittu olevan yhteys lituruohon jälsisoluksoon, tai jotka toimivat juuressa aktiivisessa roolissa jäljen muodostumiselle sytokiniinisignaloinnin välityksellä. Lisäksi tavoitteenamme on selvittää erityisesti kasvihormoni sytokiniinin signalointiin liitettyjen *CRF*-geenien ilmenemistä jällessä.

Työn edetessä halutaan selvittää, millaisia muutoksia mutaatiot aiheuttavat kasvissa, ja ennen kaikkea sen fenotyypissä, mitä pystytään arvioimaan visuaalisesti. Työssä ollaan erityisen kiinnostuneita jällessä tapahtuneista muutoksista, jotka poikkeavat huomattavasti samoissa olosuhteissa käsitellyistä villi tyypin kasveista. Mielenkiintoisissa poikkeamissa voidaan saada selville, millaisia toimintoja tutkittavilla geeneillä on lituruohon perimässä. Fenotyypityksen lisäksi *crf*-mutanttilinjoissa pyritään selvittämään, missä osassa kasvin jälttä kyseiset geenit ilmenevät.

Opinnäytetyön aihe on rajattu tiettyjen geenikokoelmien tutkimiseksi juuren jälsisolukossa. Esille tulleet tutkimusongelmat tiivistyvät seuraavaan kahteen kysymykseen, jotka ohjaavat opinnäytetyön kulkua:

- Onko mikroarray-kokeiden perusteella valituiden geenien joukossa geenejä, joilla on merkittävä rooli paksuuskasvun säätelyssä juuressa?

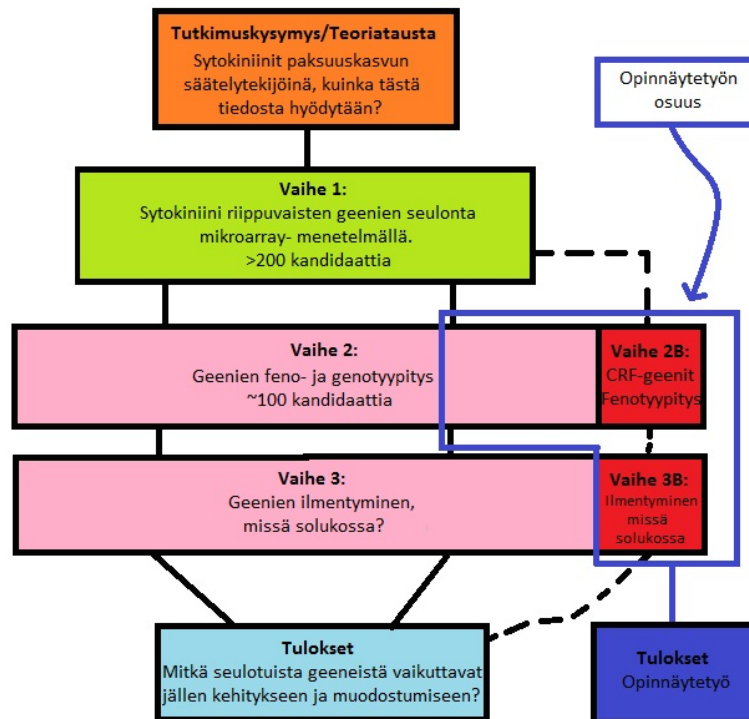
- Onko CRF-transkriptiotekijöillä huomattavaa roolia paksuuskasvun kehityksen suhteen ja ilmenevätkö *CRF*-geenit juuren jälsisolukossa?

4 Tarkoitus

Opinnäytetyö liittyy osana laajaa projektia, jossa pyritään selvittämään kasvihormoni sytokiniinin vaikutusta lituruohon juuren jälsisoluihin. Vertaamalla lituruohon *ipt1;3;5;7* -mutanttilinjan geenien ilmentymistä villi tyyppin kasviin mikroarray-kokeessa, on pystytty identifioimaan ne geenit, joihin sytokiniinien puutos vaikuttaa. Samalla periaatteella on voitu myös aktivoida *ipt1;3;5;7* -mutanttilinjan paksuuskasvu siirtämällä kasvit sytokiniinia sisältävään kasvualustaan, ja tutkia geenien ilmenemistä verrattuna *ipt1;3;5;7* -mutanttiin. Vertailun avulla on valittu jatkotutkimuksia varten lupaavia mutanttilinjoja, joissa tutkittavien geenien toiminta oletettavasti puuttuu. Koska sytokiniinit ovat avainasemassa jällen säätelyssä, on myös kiinnostavaa tutkia esimerkiksi sytokiini-signaalointiin kuuluvia CRF-transkriptiotekijöitä. (Blomster 2015.)

Opinnäytetyössä analysoitiin kantakeskuksesta tilattuja lituruohon mutanttilinjoja. Kyseiset mutanttilinjat oli valittu aiemman mikroarray-kokeen saamien tuloksien perusteella, jossa kriteereinä oli heikentynyt geenien ilmentyminen *ipt1;3;5;7* -mutantissa verrattuna villi tyyppin kasviin ja sytokiniiniaktivoituun *ipt1;3;5;7* -mutanttiin, sekä heikompi geenien ilmentyminen nuoressa villi tyyppin kasvissa verrattuna aikuiseen villi tyyppin kasviin, jossa jälsi luonnostaan on aktiivisempi.

Meidän osuuteemme kuului analysoida juurten poikkileikkeitä ja suorittaa fenotyypitystä lituruohomutanteissa, joissa tutkittavien kandidaattigeenien toiminta on estetty T-DNA-insertion (transfer-DNA) avulla. Lisäksi pystymme tutkimaan *crf*-linjoissa geenin ilmentymistä juuren solukoissa. (Kuvio 1)



Kuvio 1. Opinnäytetyön liittyminen tutkimusryhmän projektiin.

Opinnäytetyö toteutettiin Metropolian ja Helsingin yliopiston välisen sopimuksen alaisena, eikä erillistä tutkimuslupaa tarvittu. Kaikki opinnäytetyössä esiintyvät kuvat ovat joko itse otettuja tai tehtyjä, ellei toisin mainita.

5 *Arabidopsis thaliana*

Lituruoho, eli *Arabidopsis thaliana*, (kuvio 2) on pieni, yksivuotinen, kukkiva kasvi. Lituruoholla ei ole maataloustieteellistä merkitystä, mutta se on saavuttanut tärkeän roolin genetiikan ja molekyylibiologian tutkimustyössä. Tämän takia lituruoho tunnetaan kasvimaailman banaani-kärpäsenä. Lituruohon soveltuvuus molekyylibiologian tutkimuksessa perustuu sen lyhyeen elinkaareen ja pieneen genomiin.

Lituruohon sukupolvenvaihdos kestää keskimäärin vain 6 viikkoa idusta siemeneen. Sen elinkaari mahdollistaa lukuisten sukupolvien tutkimisen lyhyessä ajassa. Lituruoho kykenee lisääntymään tehokkaasti itsepölytyksen avulla ja lisäksi se tuottaa suuren määrän siemeniä kasvia kohden, joka mahdollistaa tehokkaan jälkipolvien tutkimisen.

Lituruohon genomi on jaettu viiteen kromosomiin ja tunnettuja geenejä on tällä hetkellä 27 416. Lituruohon genomi tunnetaan hyvin, kaikki viisi kromosomia on sekvensoitu ja niistä löytyy geneettiset kartat. (The Arabidopsis Information Resource 2014.) Lituruoho soveltuu hyvin tutkimuskäyttöön. Siitä on tarjolla paljon erilaisia mutanttilinjoja maailmanlaajuisen tutkimusyhteistyön ansiosta. Lisäksi mutanttien tekeminen on helppoa ja kasvin pienestä fyysisestä koosta johtuen, lukuisia yksilöitä voidaan tutkia samanaikaisesti pienessä tilassa. (Watson – Gilman – Witkowski – Zoller 1998: 290.)



Kuvio 2. *Arabidopsis thaliana* eli lituruoho kasvamassa kasvihuoneella.

5.1 Kaksisirkkaisten kasvien rakenne

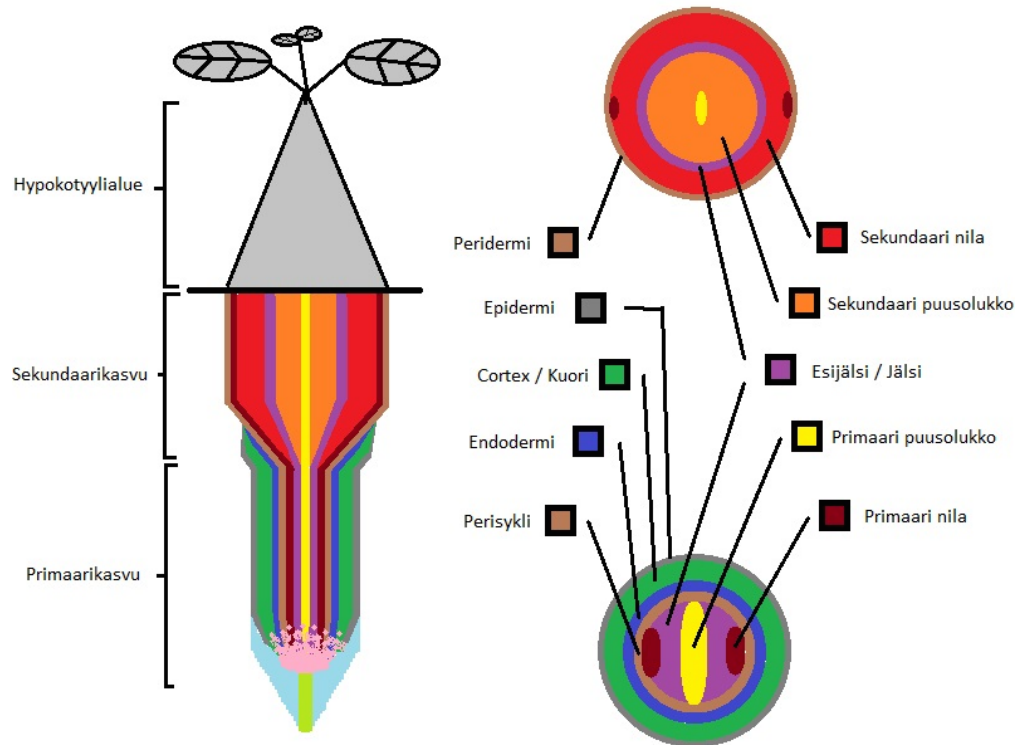
Lituruoho on kaksisirkkainen, putkilokasvien alakuntaan kuuluva kasvi, jonka kasvaviin anatomisiin rakenteisiin luokitellaan kuuluvan juuri, varsi ja lehdet. Juuren tärkeimpiin tehtäviin kuuluu pitää kasvi kiinnittyneenä kasvualustaansa, sekä johdattaa maasta saatuja ravintoaineita ja vettä varsta pitkin kulkevan johtosolukon kautta kasvin käytettäväksi. (Pyykkö 1979: 149, 163.) Kasvien energiantuotanto tapahtuu yhteyttämisen eli fotosynteesin avulla kloroplastien rakenteissa. Kloroplastit ovat suuria kalvomaisia soluelimiä kasvisoluissa, joita löytyy kaikista kasvin vihreistä rakenteista. Erityisen aktiivisesti kloroplastit toimivat kuitenkin lehdissä. (Solunetti 2006.)

Puun varren rakenne koostuu ytimestä ja sen ympäröivästä johtojännekehästä, joka on kaksisirkkaisilla kasveilla järjestäytynyt poikkileikkauksessa renkaan muotoiseksi. Johtojänneisiin kuuluu jällen, ksyleemin eli puun sekä nilan muodostama kokonaisuus. Johtosoluverkosto kulkee juuresta varren kautta kasvin kaikkiin osiin. (Kärkkäinen 2003: 17-20.) Ksyleemin tehtävä on kuljettaa juuren kautta saatuja ravintoaineita ja vettä kasvin käyttöön yhteyttämistä varten. Nilaa pitkin juureen kulkeutuu puolestaan energiaa fotosynteesissä muodostuvien lopputuotteiden muodossa. (Blomster – Mähönen 2013.) Jällen tehtävä on rakentaa ja lisätä puusolukkoa sisäänpäin ydintä kohti sekä nilaa ulospäin kaarnan suuntaan. Puilla solujen jakautumista tapahtuu huomattavasti enemmän puun puolelle, mikä voidaan erottaa visuaalisesti poikkileikkauksessa puun vuosirenkaina. (Pyykkö 1979: 160-169; Kärkkäinen 2003: 17-20, 91-94.)

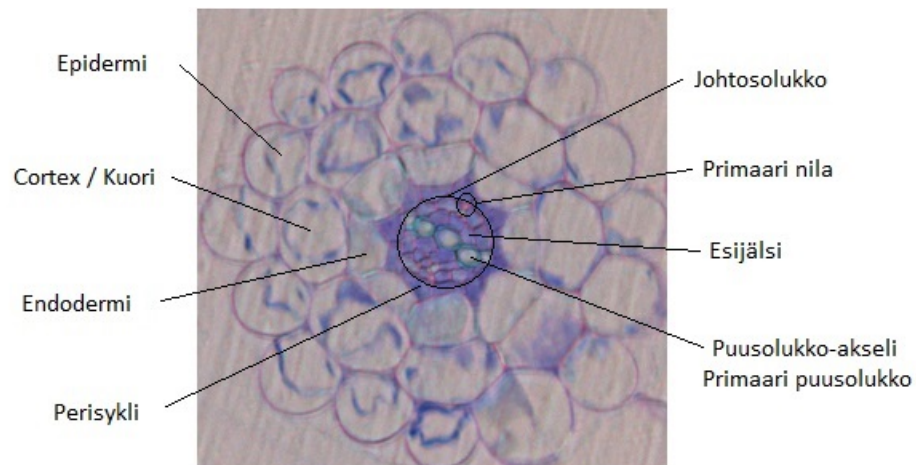
5.2 Juuren kasvu ja anatomia

Lituruohon kasvu perustuu kahteen päävaiheeseen: primaariseen ja sekundaariseen kasvuun. Primaarisen kasvun tarkoitus on kasvattaa pituutta, kun taas sekundaarisen kasvun tarkoitus on kasvattaa leveyttä. Meristeemi on jakautumiskykyinen kasvusolukko, joka sisältää erilaistumattomia kantasoluja sekä niiden tytärsoluja. Juuren kasvaessa pituutta, apikaalimeristeemi tuottaa primaarin juuren solukot jakautumalla tytärsoluihin, jotka tämän jälkeen erilaistuvat ja kasvattavat kokoaan muodostaen valmiita soluja. Juuren kasvaessa paksuutta, sekundaarimeristeemi eli jälsisolukko, tuottaa sekundaarin juuren solukot. (Nieminen – Kauppinen – Helariutta 2004.)

Primaarin juuren johtosolukkoon kuuluvat esijälsi, primaari nila ja primaari puusolukko. Johtosolukon (juuren ytimen) ympärille muodostuu kuorikerros, joka koostuu perisyklisestä, endodermistä, kuoresta sekä epidermistä. Juuren kasvukärkeä suojaa juurihuntu, joka koostuu columella- ja lateraalista juurihunnusta. (Dolan – Janmaat ym. 1993.) (Kuviot 3 ja 4)



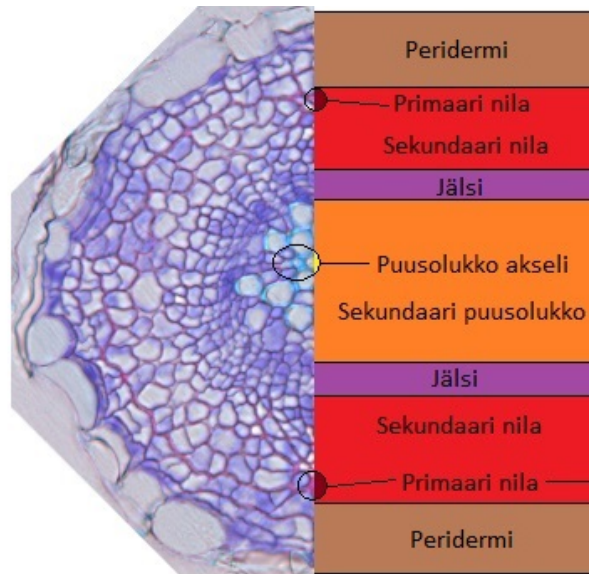
Kuvio 3. Lituruohon juuren anatomia ja kasvu. Yllä olevasta kuvasta nähdään lituruohon juuren anatominen rakenne pituussuunnassa, sekä kaksi poikkileikkausta eri kasvuvaiheista. Juuri on yhdistetty kasvin varteen ja lehdistöön hypokotyylialueen välityksellä. Kuva on hahmoteltu kahden artikkelin pohjalta. (Mukaiillen Dolan – Janmaat ym. 1993; Nieminen – Kauppinen – Helariutta 2004.)



Kuvio 4. Primaarin juuren solukerrokset tarkemmin merkittynä.

Primaarin pituuskasvun jälkeen juuri alkaa kasvaa sekundaarista paksuuskasvua. Jäl-
sisolukko muodostaa tällöin kasvin sisäosaan sekundaarisen ksyleemin ja jälsisolukos-
ta ulospäin sekundaarisen nilan. Juuren kasvaessa paksuutta primaarin juuren aiempi

pintakerros (epidermi, cortex ja endodermi) halkeaa ja korvautuu peridermillä ja osittain korkkijällellä perisyklin erilaistuessa. (Dolan – Janmaat ym. 1993.) (Kuviot 3 ja 5)



Kuvio 5. Sekundaarisen juuren poikkileike.

6 Geenitekniikka kasveilla

Yhdistelmä-DNA-tekniikka mahdollistaa kasvien genetiikan nopean ja helpon tutkimisen. Geneistä pystytään tutkimaan lyhyitä jaksoja kerrallaan ja kasveista on mahdollista suorittaa nopeaa valintaa siirtogeenin ilmenemisen suhteen. Itsepölytys mahdollistaa kasvien nopean kasvattamisen ja ne tuottavat paljon siemeniä kerrallaan. (Watson – Gilman – Witkowski – Zoller 1998: 273-274.)

Käänteinen genetiikka on osoittautunut hyvin tärkeäksi tutkimusmenetelmäksi geneettisen tutkimuksen saralla. Tietyn geenin vaikutuksia kasvissa voidaan tutkia inaktivoimalla geeni. Kyseiset knock-out -mutaatiot mahdollistavat geenin puutoksen aiheuttamien vaikutusten tarkkailemista kasvin rakenteen tai toiminnan avulla. Menetelmä on erittäin hyödyllinen muihin geenien toimintaa tutkiviin menetelmiin verrattuna, kuten mikroarray-tekniikkaan verrattuna. (Krysan – Young – Sussman 1999.) Knock-out mutanttien perusteella tehtävät johtopäätökset ovat kuitenkin harkinnanvaraisia, sillä puuttuvan geenin toiminta voi kompensoitua vaihtoehdoisen geenin toimesta monimutkaisten toi-

mintaperiaatteiden aktivoituessa. Tässä tapauksessa T-DNA-insertion avulla hiljennetyt geenin toimintaa on hankala arvioida. (Launis – Räikkä 1997: 25.)

6.1 T-DNA-insertio ja geeninsiirto

Tietyillä bakteereilla on kyky siirtää geneettistä materiaalia vieraaseen soluun plasmidi-
en avulla. Plasmidit ovat DNA-renkaita, joista bakteeri voi siirtää T-DNA:n solukalvon
läpi toiseen soluun. Tämän jälkeen T-DNA voi liittyä osaksi kohteen genomia. Tavallisin
plasmidi, jota käytetään tutkimustyössä, on agrobakteerista luontaisesti löytyvä ti-
plasmidi, eli aitosyöpä-nimistä kasvitautia aiheuttava plasmidi (Krysan – Sussman –
Young 1999.) Ti-plasmidin alkuperäiset, aitosyöpää aiheuttavat geenit on korvattu käyt-
tötarkoitusta vastaavalla T-DNA:lla. Bakteerin plasmidi on täysin erillään bakteerin
muusta genomista, mistä johtuen plasmidi on helppo eristää. Plasmidiin voidaan lisätä
T-DNA-osia, jotka saadaan tätä kautta siirrettyä tutkittavaan soluun. (Duodecim. 2010.)

Geeninsiirrossa luodaan T-DNA-vektori, joka sisältää tutkittavan geenin lisäksi erilaisia
selektiomarkkereita, joiden avulla pystytään esimerkiksi erottelemaan insertiota kanta-
vat bakteerikannat. Rakennettu vektori siirretään *Escherichia coli* -bakteerin plasmidiin,
jossa se saadaan bakteerin jakautuessa monistumaan. (Watson – Gilman – Witkowski
– Zoller 1998: 278-281.) T-DNA-siirroksia hyödynnetään erityisesti lituruohon molekyyli-
ligenetiikan tutkimuksissa. Lyhyet intronit ja geenien väliset ei-koodaavat alueet ovat
tyypillisiä lituruoholle, minkä takia lyhyet T-DNA-siirrokset usein onnistuvat estämään
tutkittavan geenin toiminnan. (Krysan – Sussman – Young 1999.)

Tavallisin menetelmä siirtää T-DNA lituruohon on agrobakteerivälitteinen floral dip -
menetelmä. Menetelmässä lituruohon kukat kastetaan liuokseen, joka sisältää agro-
bakteeria, detergenttiä ja sakkaroosia. Lituruohon kukat voidaan tämän jälkeen peittää
muovilla yli yön kosteuden lisäämiseksi, tai kastaa monta kertaa peräkkäin jolloin saa-
vutetaan hieman tehokkaampi geeninsiirto. Yleisesti ottaen muutama prosentti tuote-
tuista siemenistä kantavat siirtogeeniä. Menetelmän hyviä puolia on sen helppokäyttöi-
syy ja nopeus. (Clough – Bent 1998.)

Agrobakteerivälitteisen floral dip -menetelmän seurauksena siirrettävät T-DNA-insertiot
voivat siirtyä mihin tahansa kohtaan kasvin genomia. Yksittäisen geenin sisällä insertio
voi sijaita lisäksi esimerkiksi promoottori-alueella tai koodaavalla alueella. Tästä johtu-
en insertio voi saada aikaan erilaisia geenin ilmentymiä. (Krysan – Sussman – Young

1999.) Insertion kiinnittymiskohta kasvin genomissa saadaan selville istuttamalla lukuisia geenisiirrettyjä siemenlinjoja ja tarkastelemalla niiden genomia soveltuvin PCR-tekniikoiden avulla. T-DNA:n tarkkaa sijaintia tutkitaan valmistamalla T-DNA flanking sequence ja etsimällä sen avulla vastaava sekvenssi lituruohon genomista esimerkiksi BLAST-ohjelmistolla. (O'Malley – Ecker 2010.)

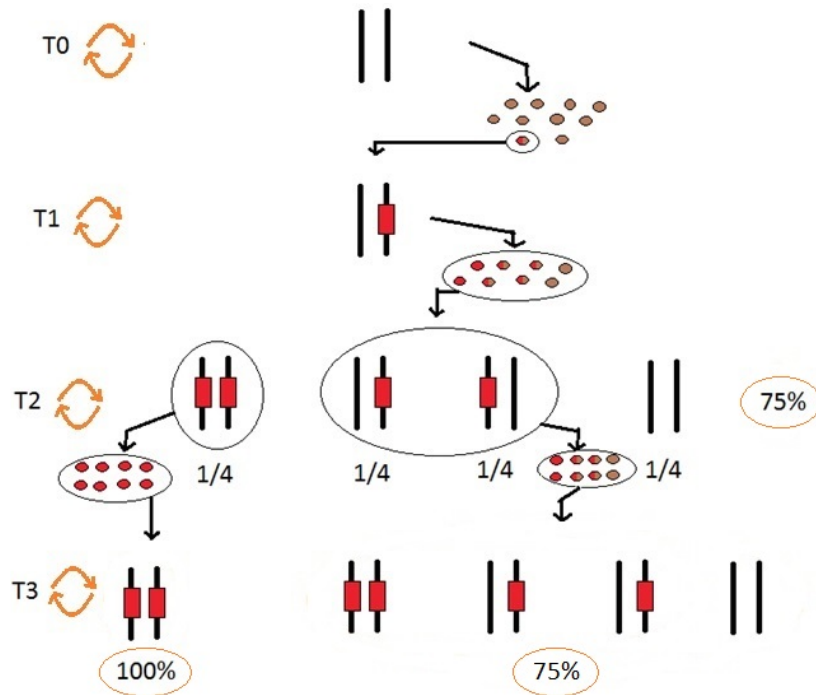
Geenisiirron yhteydessä T-DNA-vektoriin siirretään aina myös selektiivinen antibiootti-merkkigeeni, joka antaa kasville resistenssin, kun sitä kasvatetaan antibioottimaljalla. Yleinen selektioperiaate on resistenssi esimerkiksi ampicilliinin ja muiden antibioottien suhteen. Selektiivisen merkkigeenin avulla kasvien joukosta pystytään valitsemaan nopeasti ja kustannustehokkaasti ne yksilöt, joissa T-DNA on siirtynyt osaksi kasvin genomia. Tässä tapauksessa vain yksilöt, johon on tehty onnistunut geenisiirto, kykenevät kasvamaan antibiootikasvatusalustalla normaalisti. (Häggman 1998.)

6.2 Periytymisen peruslainalaisuudet

Kasvien spesifisessä, käänteisgeneettisessä tutkimuksessa käytetään tyypillisesti insertion suhteen homotsygootteja yksilöitä, jolloin molempien alleelin ilmentyminen kasvilla on estynyt. Tutkiessa kasvien fenotyyppiä, on tärkeä ymmärtää kuinka geenit periytyvät eri sukupolvissa ja missä suhteessa tutkittavien linjojen kasvit ovat insertion suhteen homotsygootteja. Yhden geenimutaation tutkimista varten T-DNA-insertio tehdään T0-sukupolven kasviin floral dip -menetelmän avulla. Itsepölytyksen avulla geenisiirron saanut kasvi tuottaa siemeniä, joista noin 0,5-3% sisältää insertion (Clough – Bent 1998.) Kyseisiä T1-sukupolven siemeniä kasvatetaan antibioottimaljalla, jolloin löydetään insertion suhteen heterotsygootit yksilöt. Antibioottiresistenssejä yksilöitä kasvatetaan ja näiden kasvien itsepölytyksen tuloksena saadaan kolmessa suhteessa erilaisia T2-sukupolven siemeniä. (O'Malley – Ecker 2010.)

Risteyttämissäännöt perustuvat Gregor Mendelin tekemiin havaintoihin kasvien risteytyksestä ja ominaisuuksien periytymisestä jälkeläisissä. Itsepölytyksen avulla lisääntyneen heterotsygootin T1-kasvin tuottamat T2-siemenet saavat insertion suhteen genotyyplitään erilaisia muotoja suhteessa 1:2:1. Näistä jälkeläisistä 75 %:lla (3/4) on T-DNA-insertio. Koska loput 25% (1/4) kasveista menehtyvät resistenssigeenin puuttuessa, eloon jäävistä T2-sukupolven yksilöistä 33 % on insertion suhteen homotsygootteja. (kuvio 6) (Tamarin 2002: 22-23.) Jotta tutkimuksia varten saadaan etsittyä kyseinen homotsygootti populaatio, kasvatetaan T3-sukupolven siemeniä antibioottimaljoilla ja

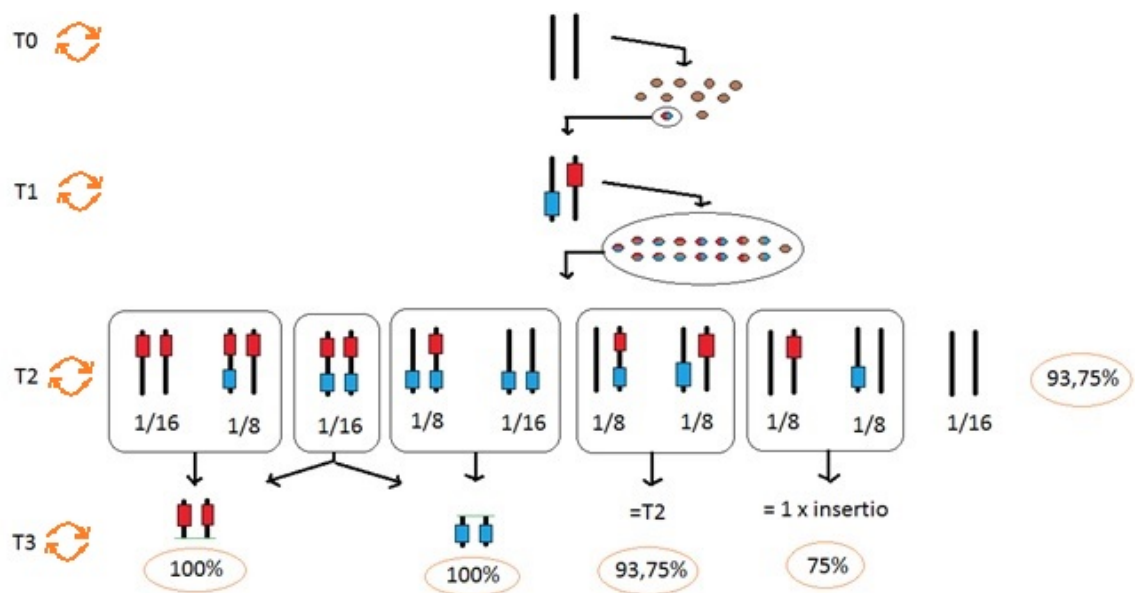
varmistetaan kasvin genotyyppi PCR-tekniikan avulla. Antibioottimaljalla kasvavan homotsygootin T2-kasvin siemenet sisältävät kaikki Mendelin periaatteeseen perustuen resistenssin. Kun homotsygootti T2-emokasvi on pystytty jäljittämään, sen siemeniä kasvatetaan siementuotantoa varten ja voidaan sitten käyttää tutkimuksissa. (Blomster 2015.)



Kuvio 6. Periytymiskaavio yhden T-DNA-insertion suhteen. Oranssilla ympyröidyt prosenttilukemat kertovat antibioottisegregaation avulla saatavien resistenssien kasvien määrän.

Tässä työssä käytetyistä siemenistä osa on T-DNA-insertion suhteen yhden insertion linjoja, mutta mukana on myös siemenlinjoja, joissa on kaksi tai kolme insertiota yhtä linjaa kohden (SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. 2013). Monen insertion linjoissa periytymislait ovat hieman monimutkaisempia. Usein kyseisissä linjoissa on kiinnostuttu vain yhden insertiokohdan (eli geenin) aiheuttamien ominaisuuksien tutkimisesta, mistä johtuen genotyypin ja fenotyypin välisten yhteyksien tutkiminen on paljon haastavampaa. (Thorneycroft – Sherson – Smith 2001.) Lisäksi usean insertion linjoissa genotyyppiin perustuvien päätelmien tekeminen on hankalaa antibioottisegregaation perusteella. Tästä johtuen kasvilinjojen genotyyppitys PCR:n avulla on välttämätöntä. (Blomster 2015.)

Kuviossa 7 on havainnollistettu kahden inserktion sisältävien linjojen periytymistä. Inserktioiden suhteen oletetaan, että ne sijaitsevat eri geeneissä ja mahdollisesti eri kromosomeissa, eivätkä ole tätä kautta kytkeytyneitä toisiinsa. (O'Malley – Ecker 2010.) Heterotsygotin T1-kasvin siemenistä 93,75% (15/16) sisältävät inserktion Mendelin periytymissääntöön perustuen. Siemenistä, joissa on inserktio, tilastollisesti 26,7% (4/15) on tutkittavan inserktion suhteen homotsygotteja. Näistä kuitenkin vain 6,25 % (1/15) on pelkän tutkittavan inserktion suhteen homotsygotteja linjoja T2-sukupolvessa. (Tamarin 2002: 22-23.)



Kuvio 7. Periytymiskaavio kahden T-DNA inserktion suhteen. Punaisella on kuvattu tutkittavaa insertiota. Oranssilla ympyröidyt prosenttilukemat kertovat antibioottisegregaation avulla saatavien resistenssien kasvien määrän.

6.3 Geenien ilmentyminen ja sen tutkiminen

T-DNA-siirrossa siirrettävien geenien ilmentymistä solukossa voidaan tutkia merkkigeenien avulla. Merkkigeeni on yleensä bakteerista tai muusta eliöstä siirretty geeni, joka ei ilmene luonnostaan lituruohossa. Merkkigeeni lisätään T-DNA-vektorin tutkittavan geenin promoottorialueen alaisuuteen, jolloin promoottorin aktivaatio siirtogeenisessä kasvissa johtaa entsyymiproteiinien muodostumiseen ja sitä kautta merkkigeenin ilmentymiseen. Tuotettu merkkigeeni on tämän jälkeen helposti havaittavissa siellä kohtaa kasvia, missä geeni ilmenee. (Häggman 1998.) Kyseistä metodia voidaan käyttää T-DNA-inserktion sisältävien kasvien selektiossa tai geenien ilmenemisen tutkimisessä (Watson – Gilman – Witkowski – Zoller 1998: 281-282).

GUS-reportterigeeni on *E. coli* bakteerista eristetty geeni, joka tuottaa β -glukuronidaasientsyymiä. β -glukuronidaasi säilyy hyvin kudoksessa, eikä sillä ole todettu olevan haittavaikutuksia kasville. Tuotettua β -glukuronidaasia voidaan havaita lisäämällä substraattia, jonka β -glukuronidaasi muuttaa väriyhdisteeksi. Tavallisimpia käytössä olevia substraatteja ovat X-Gluc, MUG ja ReC. (Jefferson – Kavanagh ym. 1987.)

7 Aineisto ja aineiston käsittely

Opinnäytetyössä käsitellään ja tutkitaan viiden eri kokoelman linjoja. Koska opinnäytetyön tulokset sisältävät toistaiseksi julkaisemattomia tutkimustuloksia, käytämme tutkituista insertiolinjoista koodinimiä *crf*-linjat, K-linjat, L-linjat ja M-linjat. Yksittäisten mutanttikokoelmien eri linjoja käsitellään juoksevasti niiden paksuuden mukaan.

Analysoitavien kasvien siemenet on tilattu kansainvälisistä kantakeskuksista (Arabidopsis Biological Resource Center ja NASC – The European Arabidopsis Stock Centre). Kantakeskukset välittävät vaivattomasti tutkimuskäyttöön valmiita, T-DNA-geenisierroksen sisältäviä siemenlinjoja. Tutkimuslaboratoriot ympäri maailmaa sekvensoivat ja ylläpitävät julkisesti saatavilla olevia T-DNA-mutanttikokoelmia. (O'Malley – Ecker 2010.) Opinnäytetyössä käsiteltävät siemenlinjat olivat saapuneet Salk, SAIL ja GABI-keskuksista. Siemenet tilattiin eri kantakeskuksista, koska tutkimusta varten haettiin ensisijaisesti linjoja, joissa insertio sijaitsi geeniä koodaavassa eksonissa. Tiukan aikataulun takia haettiin myös ensisijaisesti homotsygootteja linjoja.

Tutkituista linjoista Salk ja SAIL -siemenet oli valmiiksi seulottu ja varmistettu homotsygootteiksi linjoiksi tutkimuslaboratoriossa. GABI-keskuksesta saaduista siemenistä tutkittiin viittä eri insertiokokoelmaa (K1-K5), jotka edustavat viittä tutkittavaa geeniä. Kustakin kokoelmasta analysoitiin kahdeksan siemenlinjaa. Kyseiset siemenlinjat olivat eri T2-sukupolven yksilöistä peräisin olevia T3-siemeniä. Siementen genotyyppiä ei ollut varmistettu tutkimuslaboratoriossa, joten linjoissa oli mukana sekä homotsygootteja ja heterotsygootteja yksilöitä. Tarkoituksena oli antibioottisegregaation ja PCR:n avulla löytää kokoelmaa edustava homotsygootti linja tarkempaa analyysiä varten. Suurin osa geeneistä löydettiin mikroarraykokeilla *ipt1;3;5;7* -mutanttilinjan avulla, joissa geenien

ilmentyminen todettiin olevan yhteydessä sytokiniini riippuvaisten kasvuvaiheiden kanssa.

Kantakeskuksista saatujen siementen lisäksi käytössä oli myös *CRF*-geeniperheen mutanttilinjoja (*crf* A-K), sekä *crf* GUS-promoottorimerkkigeeni -linjoja (proCRFE:CRFE-GUS ja proCRFG-GUS). Kyseiset linjat vastaanotettiin osana amerikkalaisen ryhmän tutkimustyötä. Mutanttilinjoista tehtiin fenotyypitys juurten poikkileikkeistä, kun taas GUS-linjoista tutkittiin geenien ilmentymistä juuressa.

Genetiikan tutkimuksissa analysoitavia kohteita verrataan aina villi tyyppiin, eli yleisimmin luonnosta löydettävän mallikohteen feno- ja genotyyppiin (Tamarin 2002: 23-24). Tällä hetkellä on kerätty yli 750 villi ekotyyppiä tutkimustyön avuksi ja näistä yksi merkittävimmistä on Columbia (Col). Columbia sopeutuu erityisen hyvin kasvihuoneilmastoon, ja sitä käytettiin ensimmäisen lituruohon ekotyypin sekvensointiin vuonna 2000. Tämän takia lituruohon tunnettu sekvenssi vastaa parhaiten Columbiata ja se soveltuu erinomaisesti T-DNA-insertioiden paikantamiseen, mutanttilinjojen tutkimiseen ja muihin työvaiheisiin jotka vaativat tarkkaa DNA-sekvenssiä, kuten esimerkiksi alukkeiden suunnittelu PCR-reaktiota varten. (The Arabidopsis Information Resource 2014.)

8 Toteutus ja menetelmät

Työssä analysoitiin kahta eri kohdetta. Ensimmäinen tutkimuksen alla oleva kohde oli *crf*-mutanttilinjat, joiden juuria fenotyypitettiin histologisilla poikkileikkeillä. Lisäksi geenien ilmentymistä paikannettiin GUS-promoottorimerkkigeenien avulla. Toinen tutkittava kohde oli kantakeskuksesta tilatut T-DNA-insertiolinjat, joista tehtiin fenotyypitys histologisilla poikkileikkeillä juurista, sekä genotyypitys PCR-menetelmällä. Koska kantakeskuksesta tilatuissa siemenissä T-DNA-insertioon oli lisätty myös antibioottiresistenssi, osa mutanttilinjoista varmistettiin homotsygooteiksi linjoiksi kasvattamalla niitä antibioottialustalla. Yleiskuva tutkittavien linjojen eri työvaiheista on nähtävillä alla olevasta taulukosta (taulukko 1).

Taulukko 1. Tutkittavien linjojen työvaiheet.

	<i>crf</i> -linjat	GUS-linjat	K-linjat	L-linjat	M-linjat
Siementen sterilointi I	X	X			
Siementen sterilointi II	X	X	X	X	X
Kasvattaminen antibioottimaljoilla			X		
PCR			X		
Kasvattaminen 0,5 MS-kasvatusmaljoilla	X	X	X	X	X
Poikkileikkeiden teko	X	X	X	X	X
Värjäys ja nilavälin mittaus	X		X	X	X
GUS-ekspression tutkiminen		X			
Siementuotanto	X	X	X	X	X

8.1 Siementen esikäsittely

Kaikki tilatut siemenet steriloidtiin ennen siirtoa kasvatusalustalle. Sterilisaatiolla poistettiin mahdolliset tutkimusta haittaavat mikrobistot siementen pinnalta, kuten homeet ja hiivat. Työssä käytettiin kahta eri sterilisaatiomenetelmää.

Ensimmäisessä menetelmässä siemenet käsiteltiin mikrosentrifuugiputkissa Klorin-desifiointiliuoksessa. Liuos poistettiin pipetoimalla kolmen minuutin inkubaation jälkeen. Seuraavaksi siemenet kastettiin 70% etanoliliuokseen yhdeksi minuutiksi. Tämän jälkeen siemenet pestiin kolme kertaa steriilillä vedellä. Pesun jälkeen siemenet siirrettiin 0,1% agarosiliuokseen. Linjoista *crf*-mutanttilinjat ja GUS-linjat steriloidtiin ensimmäisen menetelmän mukaisesti.

Toisessa menetelmässä siemenet steriloidtiin kloorikaasun avulla. Siemenet siirrettiin eksikaattoriin avatuissa putkissa. Siementen lisäksi eksikaattoriin siirrettiin myös 50ml Klorin liuosta dekantterilasissa. Viimeiseksi Klorin liuokseen kaadettiin 1,5 ml 37% suolahappoa. Tämän jälkeen eksikaattori suljettiin nopeasti, ja siemenet steriloiduivat eksikaattorissa noin neljän tunnin ajan muodostuvan kloorikaasun vaikutuksesta. Sterilisaation jälkeen siemenet siirrettiin 0,1% agarosiliuokseen. K-, L- ja M-mutanttilinjat sekä osa *crf*- ja GUS-linjoista steriloidtiin toisen menetelmän mukaisesti.

8.2 Germinaatio

Agaroosiin siirretyt siemenet säilytettiin kaksi päivää valolta suojassa jääkaappilämpötilassa. Kylmyyden ja pimeyden tehtävä oli saada siemenet itämään yhdenaikaisesti kylvön jälkeen. Kasvit kasvatettiin 0,5-kertaisella Growth Medium (GM) –kasvualustalla, joka valmistettiin ja kaadettiin kasvumaljalle etukäteen.

Kasvualusta koostui laboratoriossa valmiiksi valmistetusta, autoklavoimalla steriloidusta, agar pohjaisesta geelistä. Geeli sisälsi 0,8% agaria, 1% sakkaroosia, 0,5-kertaista vitamiinointua Murashige & Skoog (MS) ravinneliuosta ja pH puskuria (MES buffer) vesiliuoksessa. Geeli lämmitettiin mikrossa sulaksi, ja valettiin kasvumaljalle steriilisti laminaarissa, 50ml geeliä maljaa kohden. Kasvumaljojen annettiin jäähtyä, jonka jälkeen maljoille istutettiin siemenet, tai maljat siirrettiin kylmään odottamaan istutusta. Kaikille tutkittaville linjoille tehtiin aina oma erä kasvatusmaljoja, jotta linjan sisällä ei olisi mitään poikkeavaa tekijää kasvatusalustojen suhteen.

Siemenet siirrettiin steriilisti pipetinkärjen avulla agaroosista kasvualustalle. Siemenet istutettiin tasaisin välimatkoin samalle tasolle, jotta juuren pituudet voitiin tarkasti mitata yhden viikon ikäisistä kasveista. Jokaisesta mutanttilinjasta siirrettiin kymmenen siementä maljalle. Tutkittavien juurinäytteiden lisäksi siemeniä istutettiin myös siementuotantoa varten, jolloin yhdelle maljalle yhdistettiin 4-8 mutanttilinjaa tilan säästämiseksi. Kun siemenet oli istutettu maljoille, kannet teipattiin kiinni teipillä ja maljat siirrettiin satunnaisessa järjestyksessä kasvatuskaappeihin. Kasvatuskaapit oli asetettu 16 tunnin valosykliin ja 23 asteen lämpötilaan.

Kasvien kasvaessa kasvatuskaapeissa, siementen itävyydestä ja mahdollisista kontaminaatioista tehtiin muistiinpanoja. Kasveja siirrettiin satunnaisesti kasvatuskaapin sisällä paikasta toiseen kasvun aikana, jolla poistettiin kasvupaikan mahdollisesti aiheuttamaa vääristymää kasvussa. Yhden viikon ikäisille kasveille merkittiin kasvumaljan pohjaan pallo juuren kärjen sijainnin mukaan, jonka avulla pystyttiin mittaamaan juurten pituudet yhden viikon ikäisinä. Merkinnällä pystyttiin myös arvioimaan kasvin itävyyttä, ja poistamaan juurinäytteistä ne yksilöt jotka olivat esimerkiksi itäneet vasta toisella kasvuvuikolla ja täten väärensivät linjan juuren paksuuslukemia.

Juurinäytteet kerättiin kahden viikon iässä. GUS-linjoista kerättiin myös yhden viikon ikäisistä kasveista juurinäytteet, joilla vertailtiin geenin ilmentymisen muuttumista kas-

vien ikääntyessä. Ensimmäisen erän *crf*-linjoista osaa kasvatettiin myös yli kaksi viikkoa, koska linjat olivat itäneet huonosti eikä niistä saatu kahden viikon iässä edustavia juurinäytteitä. Koska haluttiin varmistua, etteivät ensimmäisen erän hitaasti ja huonosti itäneet linjat olleet sterilisaation aikana vaurioituneet, *crf*-linjoista kasvatettiin myös toinen erä, käyttäen siementen steriloinnissa kaasumenetelmää.

K-linjojen ensimmäisessä erässä tutkittiin antibioottisegregaatiota ja kerättiin genotyyppitystä varten DNA-näytteitä, jolloin kasvin iällä ei ollut merkitystä tulosten kannalta. Tämän takia DNA-näytteet kerättiin sitä mukaan kun linjat analysoitiin PCR-monistuksella. K-linjojen toisesta erästä varsinaiset juurinäytteet kerättiin fenotyyppitystä varten kahden viikon ikäisistä kasveista. Oheisessa taulukossa 2 on esitetty työn toteutukseen liittyvä aikataulu linjojen käsittelystä.

Taulukko 2. Yhteenveto tutkittujen linjojen istutus aikataulusta.

Linja	Maljojen määrä / Linjojen määrä	Istutuspäivä	Juuren pituuden merkitseminen	Näytteiden keruu ja kuvaus
<i>crf</i> (ensimmäinen erä)	24 / 12	9.1.15	16.1.15	16.1.15
GUS	10 / 5	9.1.15	16.1.15	16.1.15 / 22.1.15
K (genotyyppitys)	14 / 41	12.1.15	-	20.1.15 - 26.1.15
L	22 / 22	15.1.15	22.1.15	29.1.15
<i>crf</i> (toinen erä)	7 / 7	19.1.15	26.1.15	2.2.15
M	22 / 22	19.1.15	26.1.15	2.2.15
K (homotsygootit linjat)	9 / 9	30.1.15	6.1.15	13.2.15

8.3 Juurten fiksaatio ja poikkileikkeiden valmistus

Kahden viikon ikäisiä kasveja alettiin valmistella fiksoimalla juuret poikkileikkeitä varten. Juuret leikattiin yksi kerrallaan kasvatusalustalta. Juurista poistettiin sivujuuret ja juuri leikattiin ylhäältä poikki hypokotyylialueen alapäästä ja alhaalta poikki kolme senttimetriä juuren ylärajasta. Kolme senttimetriä pitkät juurenpalat siirrettiin tämän jälkeen kuoppalevyille. Jokaiseen kuoppaan oli lisätty kaksi millilitraa fiksaatioliuosta ennen juurten siirtoa. Fiksaatioliuosta säilytettiin jääkaapissa ja se oli valmiiksi valmistettu

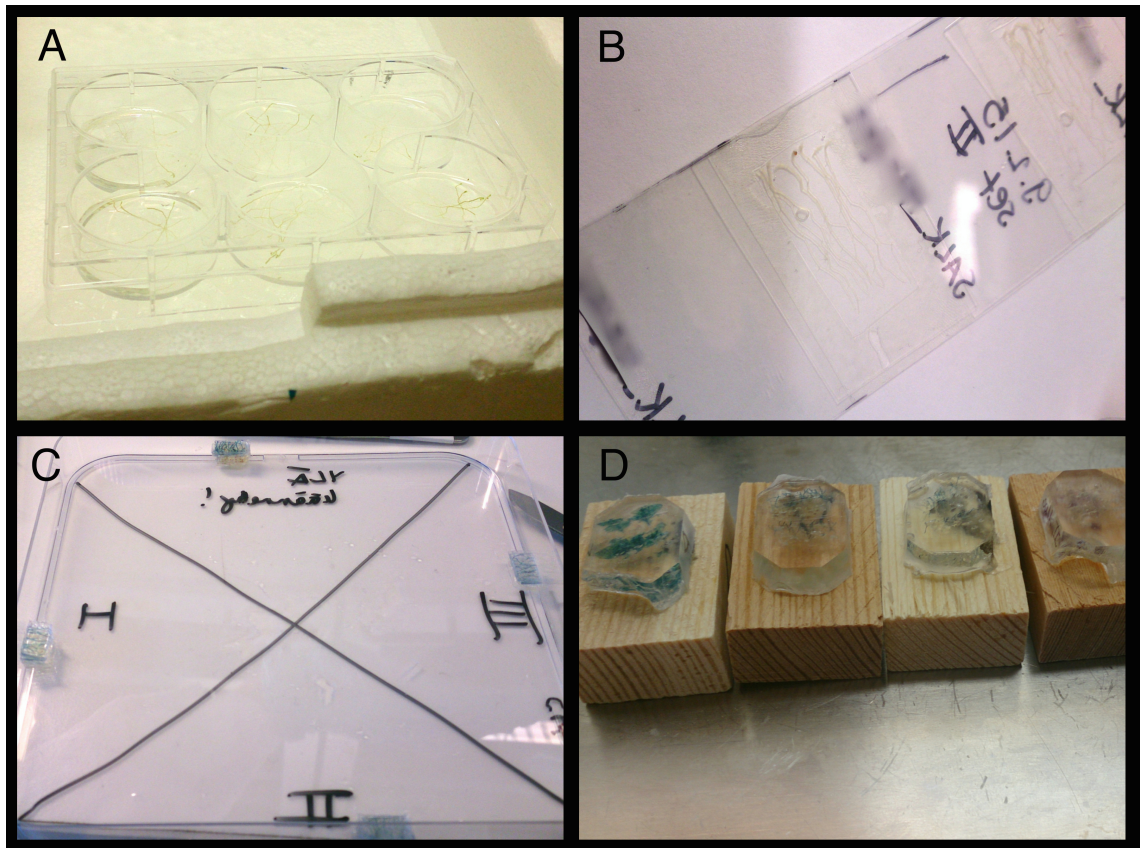
500ml erässä. Fiksaatioliuos sisälsi 1% glutaraldehydiä, 4% formaldehydiä ja 0,05 M natriumfosfaattipuskuria (pH 7,4). (Kuvio 8 A)

Fiksaation jälkeen näytteistä poistettiin vesi nousevalla etanoli-sarjalla. Näytteet olivat puoli tuntia jokaisessa alkoholiliuoksessa. Sarja aloitettiin 10% alkoholilla, välissä oli 30%, 50%, 70% ja 96% alkoholiliuos, ja sarja lopetettiin kahteen 100% etanolin sarjaan. Etanoli-sarjan jälkeen näytteitä inkuboitiin historesiinissä, jotta kudoksissa oleva etanoli saatiin korvattua resiinillä juurten kovettumista ja leikkausta varten. Historesiini valmistettiin Leican pakkauskitin avulla sekoittamalla 50 ml resiiniliuosta ja aktivaatiojauhetta, jolloin saatiin valmistettua solution A -liuos. Ensimmäinen yön yli kestävä inkubaatio tehtiin 1:1 100% etanoli- ja solution A liuoksessa. Toinen yön yli kestävä inkubaatio tehtiin pelkässä solution A liuoksessa.

Inkuboidut näytteet siirrettiin tämän jälkeen kammioihin, joihin lisättiin solution A:ta ja kovetusainetta (historesin hardener). Juuret siirrettiin kammioihin niin, että jokainen mutanttilinja oli omassa kammiossaan, ja juuret olivat vierekkäin rivissä hypokotyylialue vasemmassa reunassa. Kammioiden päälle asetettiin muovilevy ja näytteitä inkuboitiin kammioissa yön yli. Anaerobisessa ympäristössä solution A ja kovetusaine polymerisoitui kovaksi muoviksi. (Kuvio 8 B)

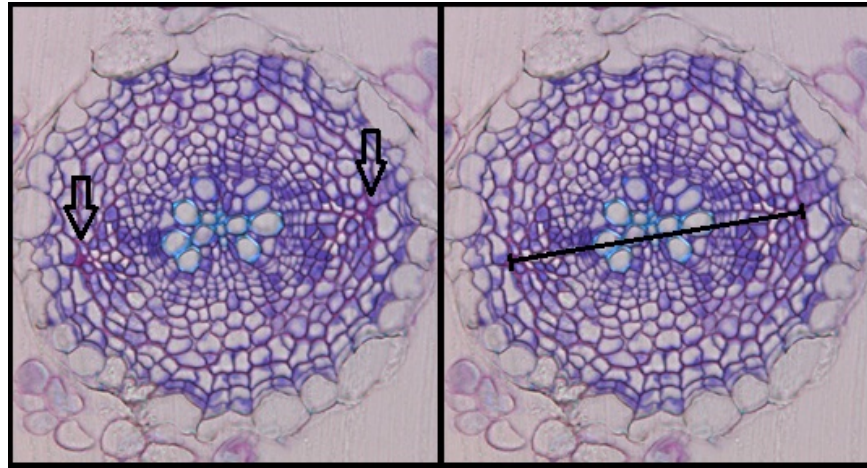
Kovettuneessa muovissa olevat näytteet poistettiin kammioista ja muovipala leikattiin poikki kahdesta kohdasta; puoli senttimetriä ja yksi senttimetri hypokotyylialueen alapuolelta. Leikatut palat pinottiin leikkauspinta kasvatusmaljan reunusta vasten. Eri mutanttilinjojen tiedot kirjattiin ylös. Eri mutanttilinjat pinottiin päällekkäin ja liimattiin yhteen solution A ja hardener -liuoksen avulla, jolloin eri näytteet pystyttiin erottamaan poikkileikkeistä korkeussuunnassa. Valmiit pinot jätettiin yön yli kovettumaan. (Kuvio 8 C)

Näytepinot siirrettiin muovimuottiin poikkileikkeiden leikkausta varten. Pinot kiinnitettiin leikkauspinta alaspäin muotin pohjalle solution A ja hardener -liuoksella. Kiinnitetyt pinot upotettiin tämän jälkeen solution A ja hardener -liukseen ja muotti peitettiin muovilla kovetusta varten. Seuraavana päivänä kovettunut muovipala poistettiin muotista, ja liimattiin kiinni puupalaan mikrotomileikkausta varten. (Kuvio 8 D)



Kuvio 8. Juurten poikkileikkeiden yksittäiset työvaiheet: A) Leikatut juuret fiksaatioliuoksessa. B) Juuret kammioissa kovettumassa muoviksi. C) Poikkileikkeiden pinoaminen maljan reunaa vasten. D) Mikrotomilla leikattavia juuriblokkeja.

Poikkileikkeet leikattiin rotaatiomikrotomilla 5 μm :n paksuisiksi leikkeiksi ja siirrettiin objektilasille. Muovipalat kiinnitettiin lasille lämpölevyllä. Ennen mikroskopointia näytteet värjättiin ruthenium red- ja toluidine blue -värjäyksillä. Objektilasit kastettiin ensin ruthenium red -väriin viideksi sekunniksi, ja sen jälkeen toluidine blue -väriin viideksi sekunniksi. Ruthenium red värjäs poikkileikkeiden soluseinämiä ja primaarin nilan punaiseksi, kun taas toluidine blue värjäs poikkileikkeiden sytoplasman ja puusolukon siniseksi. Poikkileikkeet kuvattiin mikroskoopilla ja kuvista mitattiin juurten nilaväli (primaarista nilasta primaariin nilaan) juurten paksuusanalyysiä varten (kuvio 9).



Kuvio 9. Kuvassa on villin tyypin Columbia kontrolli 20x suurennoksella ja ruthenium red ja toluidine blue -värjäyksillä. Vasemmassa kuvassa nuolet osoittavat primaarin nilan sijainnin poikkileikkeessä (punaiset pallot), ja oikeassa kuvassa merkittynä mitattu nilaväli (musta viiva).

8.4 Ilmenemisen tutkiminen GUS-värjäyksen avulla

Käytössä oli *crf*-mutanttilinjojen lisäksi myös viisi GUS-promoottorimerkkigeeni linjaa (GUS-linja) *CRF*-geeneistä, mutta itämisongelmien vuoksi työssä käsiteltiin vain kahta GUS-linjaa. GUS-linjojen siemenet esikäsiteltiin saman protokollan mukaisesti, kuin muutkin *crf*-mutanttilinjojen siemenet. Kasveja kasvatettiin kahdella kasvatusmaljalla kymmenen siementä maljaa kohden. Kasvit kerättiin yhdeltä kasvatusmaljalta yhden viikon ikäisinä, ja toiselta maljalta kahden viikon ikäisinä juuri- ja lehtinäytteitä varten.

Kasvit fiksoitiin kokonaisina 30 minuuttia 90% asetoniin jäällä. Kasvit fiksoitiin kuoppalevyillä. Fiksaation jälkeen kasvit pestiin kahteen kertaan 0,05 M natriumfosfaattiliuoksella. Yhden viikon ikäisiä kasveja inkuboitiin tämän jälkeen 0,5 mM ja 1,5 mM vahvuisissa GUS-värjäysliuoksessa ja kahden viikon ikäisiä kasveja inkuboitiin 1,5 mM vahvuisessa GUS-värjäysliuoksessa. Substraatin imeytymisen helpottamiseksi kudokseen, kuoppalevyt siirrettiin puoleksi tunniksi vakuumiin, ennen kuin kasveja inkubointiin pimeässä lämpökaapissa, 37 asteessa. Yhden viikon ikäisiä kasveja inkuboitiin neljä tuntia, ja kahden viikon ikäisiä kasveja viisi tuntia.

Värjäyksen jälkeen näytteet pestiin kuoppalevyillä kahteen kertaan 0,05 M natriumfosfaatti liuoksella ja siirrettiin sitten fiksaatioliuokseen. Tämän jälkeen kasveja käsiteltiin samalla kaavalla kuin muitakin näytteitä poikkileikkeitä varten. Tavallisten poikkileikkeiden lisäksi valmistettiin myös juurikärkinäytteitä yhden ja kahden viikon ikäisistä kas-

veista. Tällöin keräsimme näytteeksi koko juuren kärjestä hypokotyyliin, leikaten juurta puolen senttimetrin välein. Tämän lisäksi valmistimme kasveista myös lehtinäytteitä lehtien poikkileikkeitä varten. Lehdet leikattiin keskeltä poikki ja pinottiin saman kaavan mukaisesti juurinäytteiden kanssa mikrotomileikkausta varten.

Mikrotomilla poikkileikkeet leikattiin 10µm paksuina näytteinä objektilasille. Koska GUS-näytteet oli värjätty jo ennen fiksaatiota, näytteitä ei värjätty ennen mikroskooppikuvausta. Kuvien ja GUS-värjäyksen perusteella analysoimme näytteistä geenien ilmene- mistä juuren eri kasvuvaiheissa ja lehtien johtosolukossa.

8.5 Genotyyppitys

K-mutanttilinjojen fenotyyppitys edellytti ensin linjojen genotyyppityksen antibioottisegregaation ja PCR:n avulla, sillä tiedossa ei ollut mitkä linjoista olivat homotsygootteja. K-mutanttilinjat olivat peräisin T3-sukupolven kokoelmista K1-K5, joista selvitettiin opinäytetyötä varten kahdeksan eri kasvin mutanttilinjat. Kantakeskuksesta saadun tiedon mukaan insertiot sijaitsivat geenin eksonissa. Genotyyppityksen tukena käytettiin kanta-keskuksessa tehtyä antibioottisegregaatiota T3-sukupolven kokoelmista. (Taulukko 3)

Taulukko 3. K-mutanttikokoelmien antibioottisegregaatio. Segregaation lukumäärät vasemmalta oikealle: Istutetut siemenet, itäneet kasvit ja antibioottiresistentit yksilöt.

Mutanttilinja	Kokoelman segregaatio	Antibioottiresistentit kasvit	Päätelmä
K1	100:97:97	100%	Useampi insertio
K2	100:96:65	67%	Yksi insertio
K3	100:93:83	89%	Useampi insertio
K4	100:94:73	78%	Yksi insertio
K5	50:42:39	93%	Useampi insertio

Kantakeskuksen antibioottisegregaation perusteella kaksi linjoista oli yhden insertion mutanttilinjoja (K2 ja K4) ja muut sisälsivät useamman insertion tutkittavan geenin lisäksi. Useamman insertion takia genotyyppitystä ei voitu suorittaa vain antibioottisegregaation avulla, koska emme pystyneet varmistamaan kumpi insertio mutanttilinjassa oli homotsygootti.

Genotyypitys aloitettiin valitsemalla kaikista kokoelmista kahdeksan mutanttilinjaa antibioottisegregaatiota varten. Näistä kahdeksasta ehdokkaasta valittiin antibioottisegregaation avulla lupaavimmat ehdokkaat PCR-monistusta varten.

8.5.1 Antibioottisegregaatio

Antibioottisegregaation avulla valittiin parhaimmat ehdokkaat PCR-monistusta varten yhden insertion K-linjoista. Antibioottisegregaatiota varten kasvit kasvatettiin antibioottilmaljalla. Maljat tehtiin lisäämällä sulfadiatsiini-antibioottia GM-kasvumaljoihin ennen geelin valamista kasvumaljoille. Sulfadiatsiinin konsentraatio maljoilla oli 5,25 µl/ml. Jokaisella maljalla kasvatettiin kolme linjaa ja noin 30 siementä jokaista tutkittavaa linjaa kohden. Suuremman otoksen kasvattaminen helpotti segregaation tulkitsemista. Kontrollina toimi villi tyyppi (Columbia) negatiivinen kontrolli.

Antibioottisegregaation tulokset luettiin yhden viikon ikäisistä kasveista, jolloin laskettiin siementen kokonaislukumäärä, itäneiden kasvien lukumäärä ja antibioottiresistenttien kasvien määrä. Hyvän yleiskuvan herkkien ja resistenttien yksilöiden välillä näkyi jo paljain silmin (kuvio 10), mutta lopulliset antibioottiresistenttien kasvien lukumäärät laskettiin mikroskoopin alla jolloin pystyttiin erottamaan myöhään itäneet kasvit antibiootti herkistä kasveista.

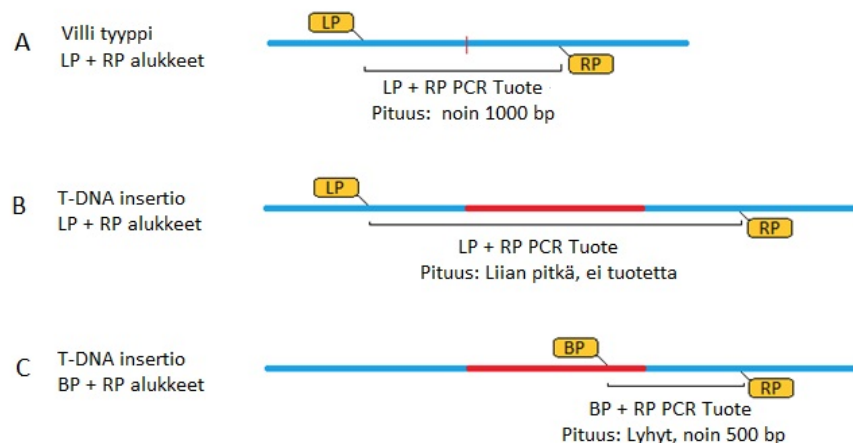


Kuvio 10. Esimerkki antibiootille herkkin kasvien (vasemmalla) ja antibioottiresistenttien kasvien (oikealla) ulkonäköeroista.

Useamman insertion linjat K1, K3 ja K5 eivät olleet antibioottisegregaation avulla genotyyppitettävissä. Linjoista K2 ja K4 valittiin antibioottisegregaation avulla linjoja PCR genotyyppitykseen.

8.5.2 Linjojen genotyyppitys PCR:n avulla

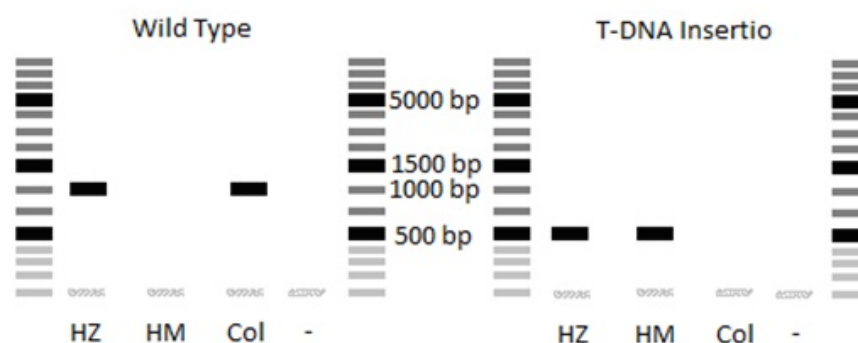
Genotyypiltään epäselvät kasvilinjat genotyyppitettiin PCR-menetelmän avulla histologisen fenotyyppityksen yhteydessä. Alukkeet PCR-monistusta varten suunniteltiin kantakeskuksen sovelluksella niin, että alukkeita oli kolme kappaletta kasvilinjaa kohden. Kaksi alukkeista oli spesifisiä villi tyypin genomille ja kolmas aluke oli spesifinen tutkitavan T-DNA-insertion suhteen. Kantakeskuksen sovellus on ohjelmoitu tuottamaan villi tyypin alukkeet ennen T-DNA-insertiokohtaa (Left Primer) sekä sen jälkeen (Right Primer). Villi tyypin genomissa LP ja RP -alukkeet tuottavat noin 1000:n emäsparin pituisen PCR-tuotteen (kuvio 11 A). Mikäli genomissa alukkeiden väliin on sitoutunut T-DNA-insertio, se aiheuttaa liian pitkän monistettavan tuotteen alukkeiden väliin ja PCR-tuotetta ei saada (kuvio 11 B). Tällöin T-DNA:lle spesifinen aluke toimii monistettavan alueen toisena reunana, jolloin lopputuloksena on homotsygootille kasville odotettua lyhempi tuote. Mutanttilinjoissa LP ja RP -alukkeet eivät pysty muodostamaan PCR-tuotetta, mutta RP ja BP -alukkeet muodostavat noin 500:n emäsparin kokoisen PCR-tuotteen (kuvio 11 C). Heterotsygootti linja puolestaan muodostaa sekä villi tyypille ominaista monistustuotetta, että lyhyempää T-DNA-insertiolle tyypillistä tuotetta.



Kuvio 11. Yleisnäkymä PCR-monistuksen ajon toimintaperiaatteesta.

Käytännössä joka linjasta ajettiin kaksi PCR-monistusta, joista yksi tuotti villi tyypin PCR-tuotteen ja toinen T-DNA-insertiolle spesifisen tuotteen. Tuotteita vertailtiin kes-

kenään jolloin linjasta pystyi päättämään genotyypin. Villi tyypin monistustuotteet asettuivat elektroforeesigeelissä 1000:n emäsparin korkeudelle ja T-DNA-insertion monistustuotteiden koko oli 500 emäsparia. Mutanttilinja, joka tuotti sekä villi tyypin että T-DNA-insertiolle spesifisen tuotteen oli heterotsygootti. Mutanttilinja, joka tuotti vain T-DNA-insertiolle spesifisen tuotteen, oli homotsygootti. Villi tyypin kontrolli tuotti vain villi tyypin tuotteen, kun taas negatiivinen (tyhjä) vesikontrolli ei tuottanut lainkaan tuotteita kummassakaan PCR-monistuksessa. (Kuvio 12)



Kuvio 12. Esimerkki kahden mutanttilinjan (HZ = heterotsygootti, HM = homotsygootti), villin tyypin kontrollin (Columbia) ja tyhjän negatiivisen kontrollin PCR-tuloksista.

PCR-genotyypitys suoritettiin laboratorion ohjeen mukaisesti. Genotyypityksen protokollaan kuului kolme työvaihetta. Ensimmäinen työvaihe oli DNA:n eristys, jossa eristettiin DNA:ta kasvien lehdistä. Toisessa työvaiheessa valmistettiin PCR-sekoitukset ja DNA monistettiin ja kolmannessa työvaiheessa PCR-tuote eroteltiin elektroforeesissa. Mutanttilinjat valittiin PCR-genotyypitykseen antibioottisegregaation tulosten avulla, eli genotyypitykseen päätyivät ensisijaisesti mutanttilinjat, jotka osoittivat antibioottiresistenssiä kaikissa linjan kasveissa.

DNA eristettiin kasvien lehdistä. Yhdestä kasvista poistettiin yksi sirkkalehti DNA-näytettä varten, ja jokaista mutanttilinjaa kohden tutkittiin kolme tai viisi kasvia. Lehdet siirrettiin 1,5 ml:n mikrosentrifuugiputkiin ja putkeen lisättiin 350 µl DNA:n eristykseen käytettävää puskuriliuosta (DNA Extraction Buffer). Puskuriliuos sisälsi 200mM Tris-Cl:a, 250mM NaCl:a, 25mM EDTA:ta, 0,5 % SDS:ää ja steriloitua MQ-vettä. Näytteet siirrettiin 95 asteiselle blokille viideksitoista minuutiksi. Näytteet sentrifugoitiin ja putkeen lisättiin 350 µl DNA Extraction Buffer -liuosta, jonka jälkeen näytteitä sentrifugoiitiin viisi minuuttia. Tämän jälkeen näytteestä siirrettiin 600 µl supernatanttia uuteen mikrosentrifuugiputkeen. Uuteen putkeen lisättiin 600 µl isopropanolia ja näytteitä sent-

rifugoitiin viisi minuuttia. Lopuksi supernatantti kaadettiin pois, mikrosentrifuugiputkien annettiin kuivua yli puoli tuntia ja putkeen lisättiin 50 µl steriiliä vettä.

Monistus tehtiin 20 µl kaivotilavuudella. Jokaiselle mutanttilinjalle tehtiin kaksi omaa PCR sekoitusta (PCR mastermix), yksi villi tyyppin alukeparille ja toinen T-DNA-insertiolle spesifiselle alukeparille. PCR-sekoitukset tehtiin saman pohjan mukaisesti, ja ainesosien määrät kerrottiin mutanttilinjan tarvittavien kaivojen määrän mukaisesti. Yhteen kaivoon (20 µl kokonaismäärä) laitettiin 2 µl 10x puskuria, 0,5 µl 10mM nukleotidejä (dNTP), 0,2 µl 5U/µl polymeraasi entsyymiä (Dream Taq Pol), 0,5 µl alukkeita (villi tyyppin sekoituksessa 0,5 µl 10 µM LP ja 0,5 µl 10 µM RP sekä T-DNA-insertiolle spesifisessä sekoituksessa 0,5 µl 10 µM BP ja 0,5 µl 10 µM RP), mutanttilinjasta riippuen 1-5 µl DNA-näytettä (template) ja näytemäärästä riippuen 11,3-15,3 µl steriiliä vettä. PCR-tuotteet monistettiin yleisesti käytetyn ohjelman mukaisesti ja monistuskierroksia oli 37-40 mutanttilinjasta riippuen.

PCR-tuotteet eroteltiin geelissä. Elektroforeesi tehtiin käyttämällä 1% agarosia ja geelin valmistuksessa käytettiin TAE-puskuriliuosta. Väriaineena käytettiin etidiumbromidia, jota lisättiin yksi tippaa 50 ml agarosigeeliä kohden. Tuotteita eroteltiin asetuksilla 120 V ja 400 mA 10-16 minuutin ajan riippuen mutanttilinjasta. Tulokset kuvattiin UV-valon avulla elektroforeesin jälkeen.

9 Tulokset

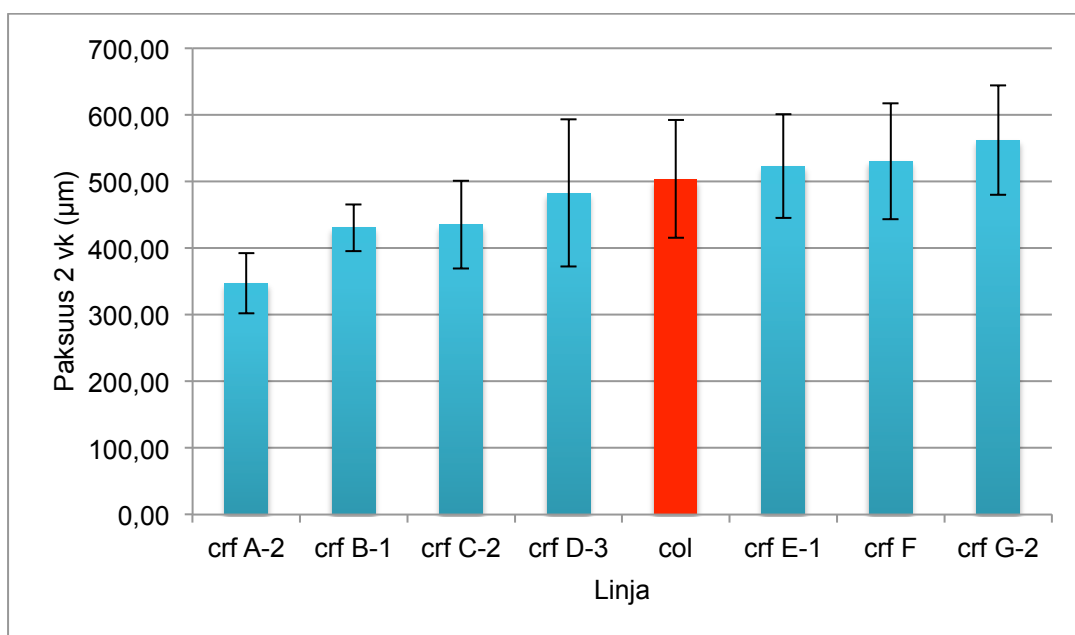
Työssä analysoitiin juurten poikkileikkkeitä DNA-insertion suhteen homotsygooteista yksilöistä T3-sukupolvien kasveista. Kaikista yksittäisistä juurista mitattiin ImageJ-kuvankäsittelyohjelman avulla niiden paksuudet kahden viikon iässä ja pituudet yhden viikon iässä. Juurista laskettiin linjakohtaiset keskiarvot ja keskihajonnat. Yksittäisten juurten paksuudet ja pituudet, sekä lasketut keskiarvot ja keskihajonnat ovat löydettävissä liitteestä 1.

Linjoja käsiteltiin tuloksissa niiden pituuden ja paksuuden perusteella, vertailemalla näitä kahta tekijää ja niiden välistä korrelaatiota. Pituus oli tärkeässä roolissa tulosten tarkastelun yhteydessä, sillä juuren pituus on yleinen kasvin kasvusta kertova mittari. Pituuskasvun perusteella pystytään tekemään johtopäätöksiä, ja arvioimaan johtuvatko

paksuuskasvussa havaittavat muutokset yleisestä kasvun hidastumisesta vai spesifisestä paksuuskasvuun vaikuttavasta fenotyypistä.

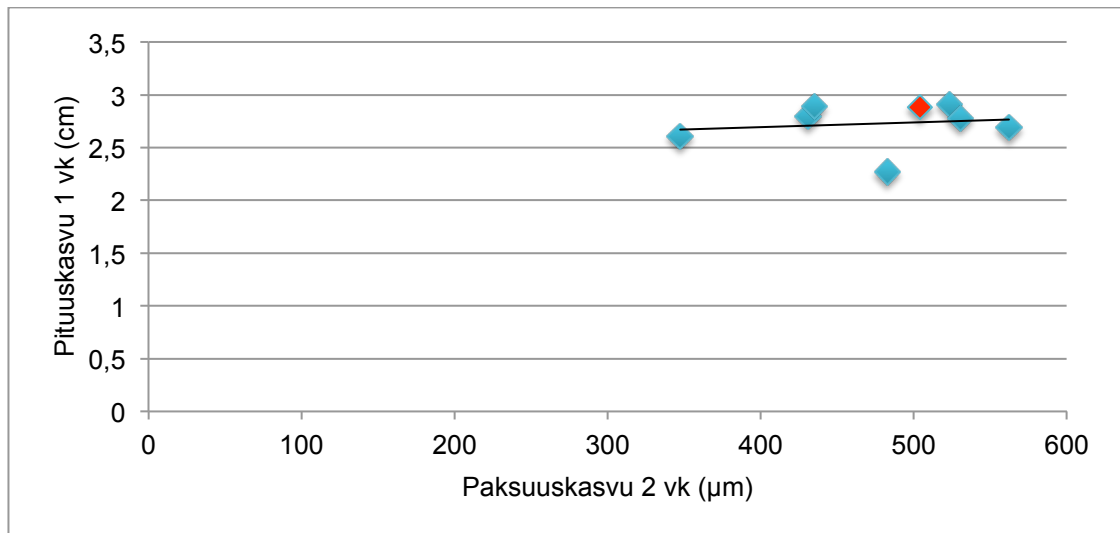
9.1 *Crf*-linjojen tulokset

Tarkempaan analyysiin valittiin *crf*-linjoista kaksi ohuinta ja paksuin linja. Juurten poikileikkeiden perusteella ohuin linja oli *crf* A-2 ($k_a=347,41 \mu\text{m}$). Keskimäärin kyseiset juuret olivat $156,56 \mu\text{m}$ ohuempia villi tyyppiin verrattuna ja kyseisen linjan juurten paksuuksien vaihteluväli oli vain $45,36 \mu\text{m}$. Linjan *crf* B-1 keskimääräiset juurten paksuudet asettuivat keskinäisessä vertailussa toiseksi ohuimmiksi ($k_a=430,70 \mu\text{m}$). Mutanttilinjan *crf* B-1 kasvien paksuuksien vaihteluväli oli myös riittävän pieni, $35,17 \mu\text{m}$. Paksuimman linjan, *crf* G-2 juuret olivat keskimäärin $562,13 \mu\text{m}$, mutta paksuudet vaihtelivat välillä $81,98 \mu\text{m}$. (Kuvio 13)



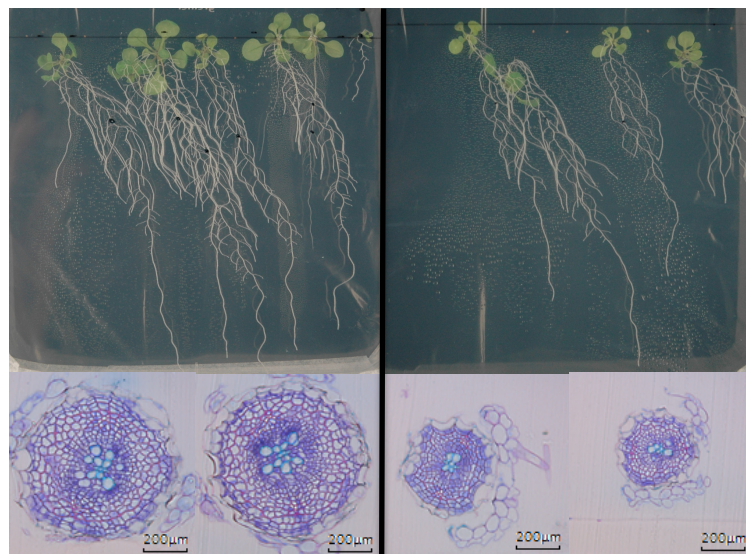
Kuvio 13. Kahden viikon ikäisten *crf*-linjojen juurten keskimääräiset paksuudet. Punaisella on esitetty villin tyyppin linja.

Tulosten perusteella yhden viikon ikäisten kasvien juurten pituudella ja kaksi viikkoa kasvaneiden kasvien juurten paksuuden välillä ei ole korrelaatiota ($r=0,2$) eli itäneiden kasvien pituudesta tai itämisnopeudesta ei voida tehdä johtopäätöksiä yksittäisen kasvin lopullisen paksuuskasvun suhteen. (Kuvio 14)



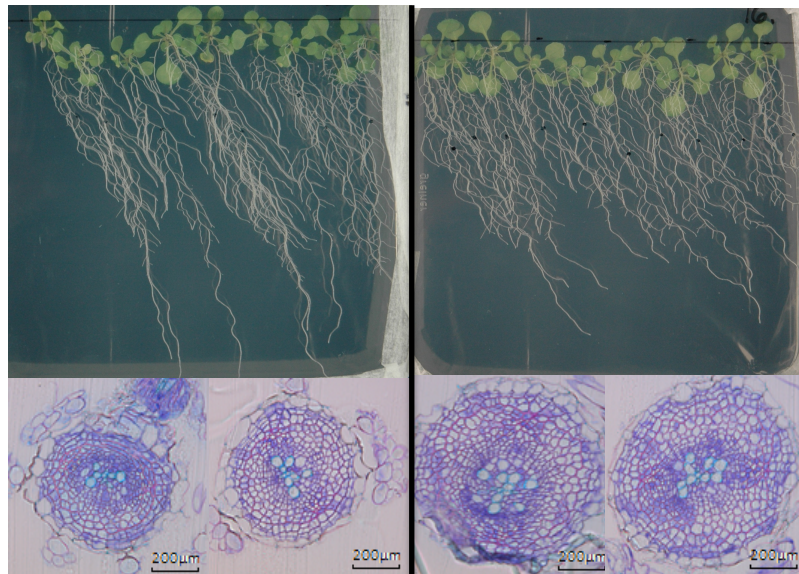
Kuvio 14. Yhden viikon ikäisten kasvien juurten pituuksien ja kahden viikon ikäisten kasvien juurten paksuuskasvun välinen yhteys linjakohtaisesti. Punaisella on merkitty villi tyyppin linja.

Linjassa *crf* A-2 maljalla kasvaneiden kasvien itävyys oli huono. Vain 4/10 kasvia oli itänyt villi tyyppin pituutta vastaavaan kokoon. Ohuimman *crf* A-2 linjan juurten keskimääräinen paksuus oli huomattavasti ohuempi villi tyyppiin verrattuna, vaikka kaikki maljalla itäneistä kasveista olivat itäneet samaan aikaan villi tyyppin kanssa. Yhden viikon ikäisinä *crf* A-2 linjan juurten keskimääräinen pituus oli 2,61 cm ja villi tyyppin juurten 2,88 cm. Ohuimman linjan kasvien lehdet olivat pieniä ja juurista ei lähtenyt yhtä paljon sivujuuria. (Kuvio 15)



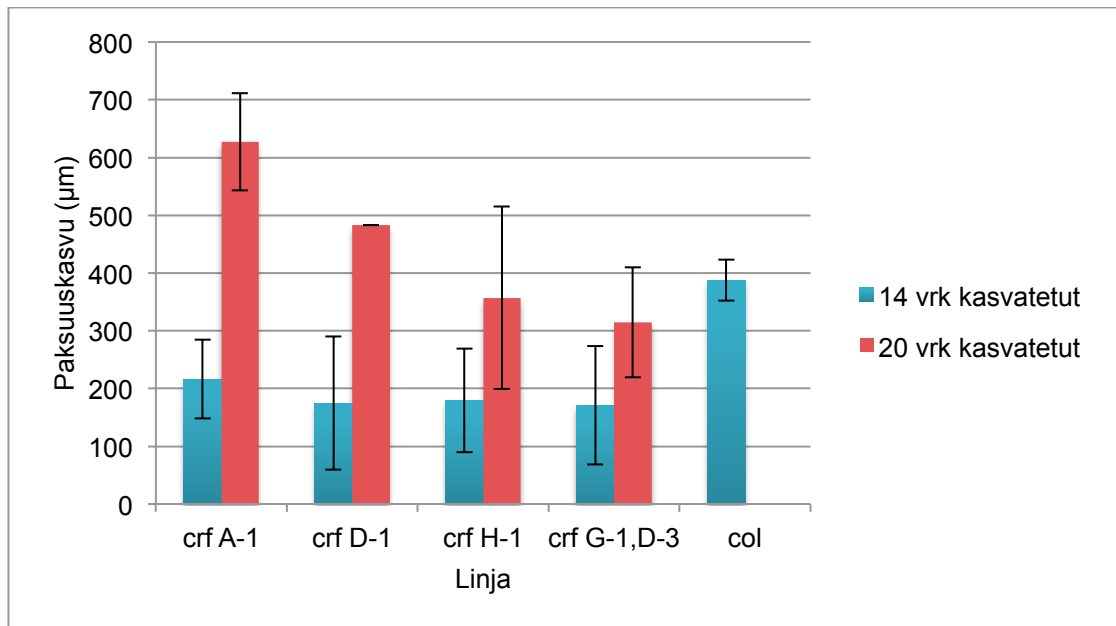
Kuvio 15. Vasemmalla villi tyypin kasvit ja edustavat yksittäiset poikkileikkeet. Oikealla *crf* A-2-linja kasvamassa kasvatusmaljalla ja kahden juuren poikkileikkeet. Yhden viikon ikäisten juurten pituudet on merkitty mustina pisteinä maljalle. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Toiseksi ohuimman linjan *crf* B-1 kasvit olivat itäneet hyvin ja juurten pituudet olivat kahden viikon iässä yhtä pitkiä kuin Columbian keskimääräiset juuret. Yhden viikon ikäisinä linjan juuret olivat keskimäärin vain 0,08 cm lyhempiä kuin villi tyypin juuret. Tästä huolimatta *crf* B-1 linjan kasvit ovat ohuempia. Paksujuurisimmassa linjassa *crf* G-2 juuret olivat jääneet huomattavasti villi tyypin linjan kasveja lyhyemmiksi kahden viikon ikäisinä. Yhden viikon iässä juurten pituudet olivat kuitenkin keskimäärin 2,69 cm verrattuna Columbian 2,88 cm. Juurten pituuskasvu oli siis hidastunut. Pääjuurien lyhyden lisäksi myös kasvien sivujuuret olivat lyhyempiä kuin villi tyyppillä. (Kuvio 16)



Kuvio 16. Vasemmalla toiseksi ohuimman linjan kasvit *crf* B-1 kasvit ja kaksi edustavaa poikkileikkettä. Oikealla paksuimman linjan *crf* G-2 kasvit ja kaksi poikkileikkettä. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa villi tyypin kanssa ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Osa saaduista *crf*-linjoista iti todella huonosti. Näistä linjoista tehtiin omaa vertailua normaalin kahden viikon ikäisten ja 20 vrk ikäisten kasvien välillä. (Kuvio 17) Tulokset olivat samansuuntaiset 14 vrk ja 20 vrk kasvatettujen linjojen suhteen, vaikka niitä kasvatettiin eri aikaan, siemenet itivät eri kasvatuskaapeissa ja ne steriloitiin toisistaan riippumattomissa erissä. Huonon itävyyden takia tuloksia ei kuitenkaan tarkasteltu sen tarkemmin.



Kuvio 17. Huonosti itäneiden linjojen paksuuksien vertailua. Sinisellä kahden viikon ikäisten kasvien juurten paksuudet ja punaisella pidempään kasvatettujen linjojen paksuudet 20 vrk ikäisinä.

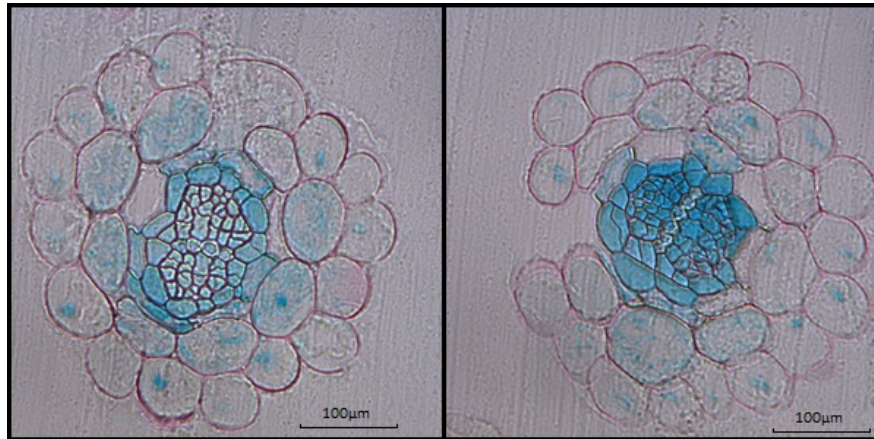
9.2 GUS-ekspressio

GUS-ekspressiolla tutkittiin *CRF E* ja *CRF G* geenien ilmentymistä juuressa sekä lehdessä proCRFE:CRFE-GUS ja proCRFG-GUS linjojen avulla. GUS-linjoista kerättiin juuri- ja lehtinäytteet sekä yhden että kahden viikon ikäisistä kasveista, ja tämän avulla vertailtiin geenien ilmentymisen eroja nuoremmista ja vanhemmissa kasveissa. Tämän lisäksi myös osasta näytteitä leikattiin koko juuren pituudelta poikkileikkeitä, jonka avulla saatiin selville eroja geenien ilmentymisessä koko juuren pituudelta.

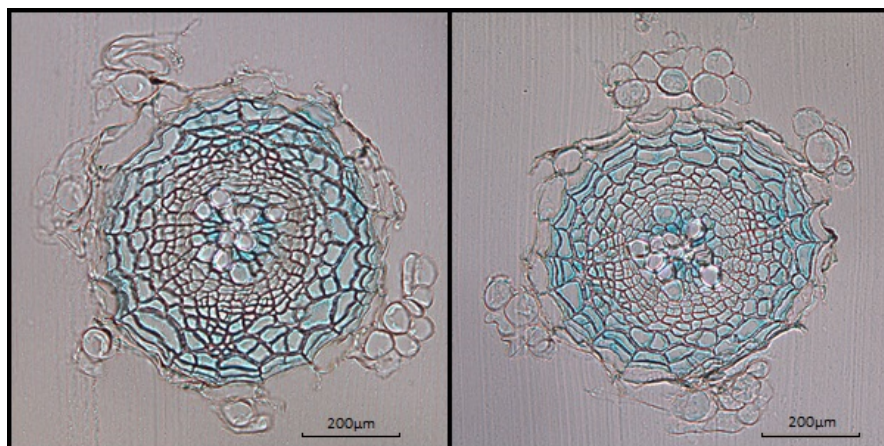
Sekä yhden viikon, että kahden viikon GUS-linjojen näytteitä tutkittiin 0,5 cm hypokotyylialueen alapuolelta. Yhden ja kahden viikon näytteet olivat molemmat aloittaneet sekundaarikasvun, vaikka yhden viikon näytteistä näky vielä selvästi primaarin kasvuvaiheen kuorikerrokset johtosolukon ulkopuolella (kuvio 18). Kahden viikon näytteet olivat huomattavasti pidemmällä sekundaarikasvun osalta ja olivat jo menettäneet suurimman osan primaarin kasvuvaiheen kuorikerroksista, lisäksi puusolukko oli jo hyvin erilaistunut ja osa puusolukosta on jo kuollutta solukkoa (kuvio 19).

GUS-ekspressio linjojen välillä oli hyvin samanlainen. Yhden viikon näytteissä johtosolukko oli kauttaaltaan heikosti tai hieman voimakkaammin värjäytynyt, lisäksi kuori-

kerroksissa oli havaittavissa satunnaista ilmenemistä (kuvio 18). Kahden viikon näytteissä GUS-ekspressio oli heikompi, mutta painottunut nilan ja puusolukon puolelle. Jälsisolukossa GUS-ekspressiota ei ollut havaittavissa (kuvio 19). Osassa kahden viikon näytteistä oli havaittavissa hieman vahvempi GUS-ekspressio primaarin nilan ympärillä.



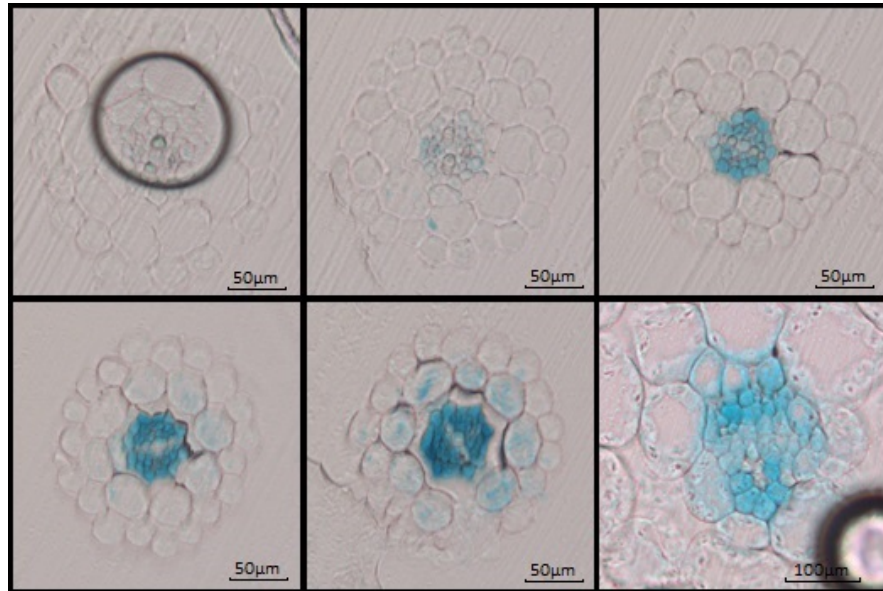
Kuvio 18. Vasemalla 1 viikon ikäinen proCRFE:CRFE-GUS ja oikealla 1 viikon ikäinen proCRFG-GUS. Leikattu 0,5 hypokotyylin alta. Suurennos 40x objektiivilla.



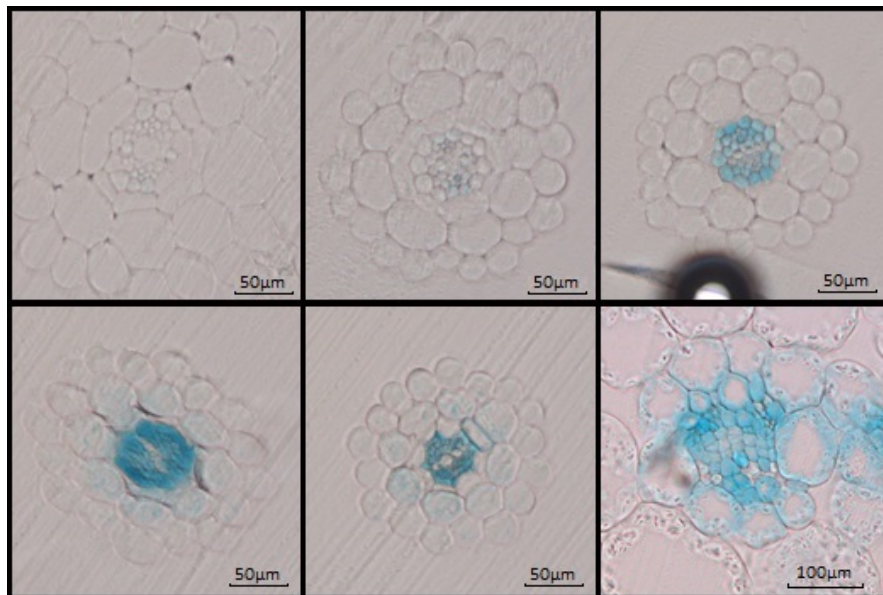
Kuvio 19. Vasemalla 2 viikon ikäinen proCRFE:CRFE-GUS ja oikealla 2 viikon ikäinen proCRFG-GUS. Leikattu 0,5cm hypokotyylin alta. Suurennos 20x objektiivilla.

Koko juuren pituudelta otetut juurinäytteet kerättiin puolen senttimetrien väleillä juuren kärjestä hypokotyylialueeseen. Yhden viikon näytteissä GUS-ekspressio oli heikosti havaittavissa noin puoli senttimetriä juurenkärjistä (kuviot 20 ja 21). GUS-ekspressio jatkoi voimistumista johtosolukossa primaarin kasvuvaiheen aikana, ja oli voimakkain noin 1,5-2,0 senttimetriä juuren kärjestä, jolloin sekundaarikasvu oli käynnistynyt. Vaikka GUS-ekspressio oli johtosolukossa hyvin tasainen, oli primaarin nilan ympäristössä

havaittavissa, varsinkin perisyklin puolella, hieman vahvempi ilmentyminen, joka näkyi myös juuren kärjen yläpuolella, ennen kun johtosolukon ilmentyminen oli selkeästi havaittavissa. Yhden viikon lehtinäytteiden johtosolukossa oli myös vahva GUS-ekspressoio havaittavissa. GUS-ekspressoio painottui nilan ja puusolukon puolelle, ja näkyi vain haa- leana raitana jälsisolukossa.



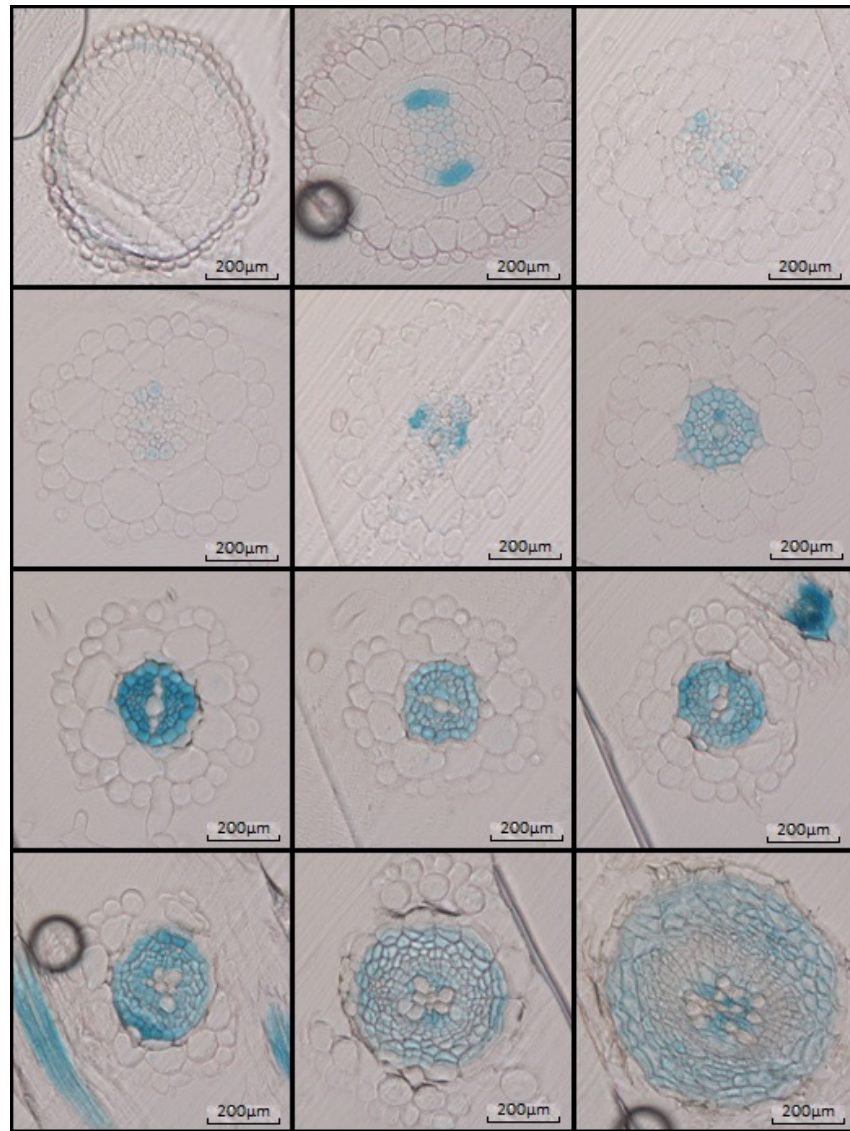
Kuvio 20. Yhden viikon ikäinen proCRFE:CRFE-GUS juuren poikkileikkeet juuren kärjestä ylös- päin, sekä 1 viikon lehden johtosolukko. Yläriivi vasemmalta oikealle: Juuren kärki, juu- ren kärki +0,5cm ja juuren kärki +1cm. Alarivi vasemmalta oikealle: Juuren kärki +1,5cm, Juuren kärki +2cm ja lehden johtosolukko. Suurennos 40x objektiivilla kuvassa 6.



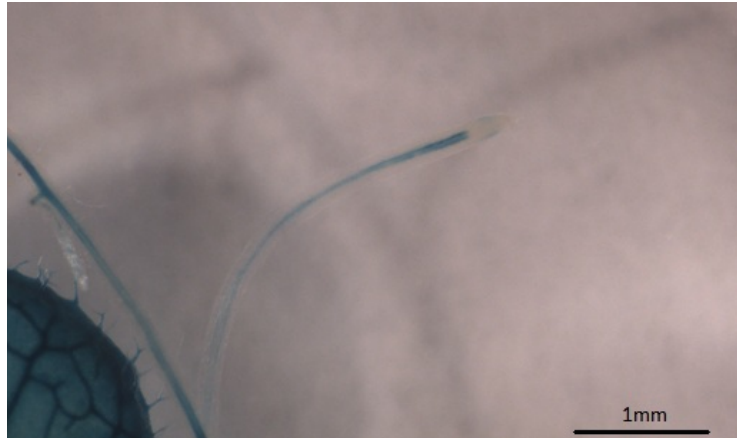
Kuvio 21. Yhden viikon ikäinen proCRFG-GUS juuren poikkileikkeet juurenkärjestä ylöspäin, sekä 1 viikon lehden johtosolukko. Yläriivi vasemmalta oikealle: Juurenkärki, juurenkärki +0,5cm ja juurenkärki +1cm. Alarivi vasemmalta oikealle: Juurenkärki +1,5cm, Juurenkärki +2cm ja lehden johtosolukko. Suurennos 40x objektiivilla kuvissa 1-5 ja 20x objektiivilla kuvassa 6.

Koko juuren pituudelta kerätyt kahden viikon näytteet leikattiin puolen senttimetrin välein juuren kärjestä hypokotyylialueeseen. Kahden viikon näytteissä oli selvästi näkyvissä GUS-ekspression spesifinen ilmentyminen primaarin nilan ulkopuolella olevissa perisyklin soluissa (kuviot 22 ja 24). Kuten yhden viikon näytteissä, GUS-ekspressio voimistui johtosolukossa primaarin kasvuvaiheen aikana ja oli voimakkain sekundaarikasvun käynnistyessä. Sekundaarikasvun jatkuessa GUS-ekspressio haalistui, ja ei ollut enää havaittavissa jälsisolukossa lähellä hypokotyylialuetta. Kahden viikon näytteissä oli havaittavissa pieniä eroja *CRF E:n* ja *CRF G:n* välillä. *Crf G-GUS* linjassa oli havaittavissa vahvempi GUS-ekspressio juurikärjen johtosolukossa, kun taas *crf E-GUS* linjassa geenin ilmentyminen oli rajattu miltei kokonaan neljään perisyklin soluun.

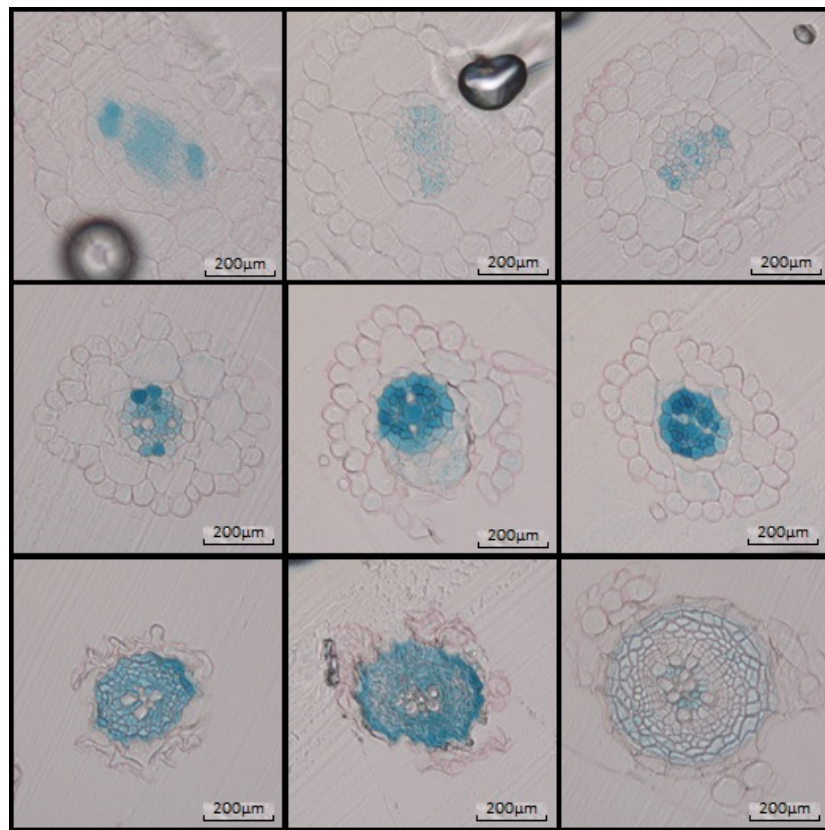
Perisyklien GUS-ekspressio on myös nähtävissä kuoppalevyissä otetuista juuren kärkiosan sivuttaiskuvista (kuviot 23 ja 25). Sivuttaiskuvista näkyi myös haalea juurihunnan värjäys, joka näkyi haaleana ilmenemisenä proCRFE:CRFE-GUS näytteen juurenkärjen poikkileike kuvassa. Kuten aiemmissa kuvissa, GUS-ekspressiossa oli havaittavissa hieman vahvempi värjäys primaarin nilan ulkopuolella/alueella sekundaarikasvun aikana.



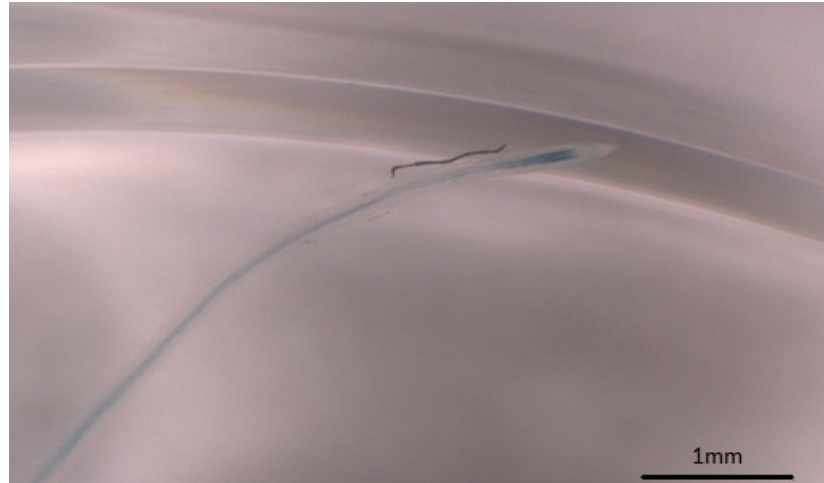
Kuvio 22. proCRFE:CRFE-GUS kahden viikon juurenpoikkileikkeet. 20x suurennoksella objektiivissa. Kuvassa ylhäältä alas ja vasemmalta oikealle: Juurenkärki, juurenkärki, juurenkärki +0,5cm, juurenkärki +1cm, juurenkärki +2cm, juurenkärki +3cm, juurenkärki +4cm, juurenkärki +5cm, juurenkärki +7cm, juurenkärki +9cm, juurenkärki +10,5cm ja juurenkärki +11,5cm.



Kuvio 23. proCRFE:CRFE-GUS kahden viikon juurenkärki kuvattuna kuoppalevyllä 1x suurenos asetuksella.

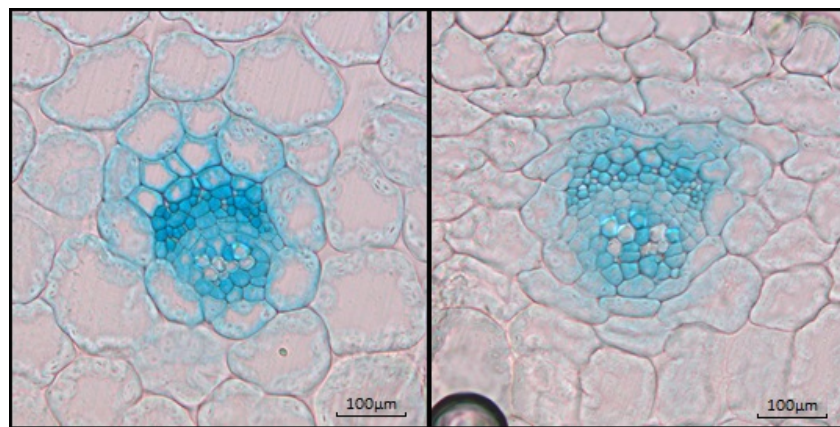


Kuvio 24. proCRFG-GUS kahden viikon juurenkärkileikkeet. 20x suurennos objektiivissa. Kuvassa ylhäältä alas ja vasemmalta oikealle: Juurenkärki, juurenkärki, juurenkärki +0,5cm, juurenkärki +1cm, juurenkärki +1,5cm, juurenkärki +2cm, juurenkärki +4,5cm, juurenkärki +5cm ja juurenkärki +6cm



Kuvio 25. proCRFG-GUS kahden viikon juurenkäri kuvattuna kuoppalevyllä. 1x suurennos asetuksella.

Kahden viikon lehtinäytteissä oli havaittavissa vahva GUS-ekspressio lehden johdosolukossa. GUS-ekspressio oli vahvin nilassa ja puusolukossa, ja näkyi haaleana sateenkaaren muotoisena raitana nilan ja puusolukon välissä olevassa jälsisolukossa. (Kuvio 26)



Kuvio 26. Kahden viikon lehtipoikkileikkeet. Vasemalla proCRFE:CRFE-GUS ja oikealla proCRFG-GUS. 20x suurennos objektiivissa.

9.3 K-kokoelman tulokset

K-kokoelmassa tulosten käsittely perustui monivaiheiseen analysointiin. Linjat segregoitiiin antibioottiresistenssin avulla. Homotsygootit linjat valittiin PCR:n ja elektrofooresigeelierottelun perusteella, jonka jälkeen tarkasteltiin tutkitun T-DNA-insertion suhteen homotsygoottien yksilöiden juurten poikkileikkeitä.

9.3.1 Antibioottisegregaation tulokset

Antibioottisegregaation tulokset yhden insertion mutanttikokoelmille K2 ja K4 tuottivat kolme homotsygoottia linjaa K2 mutanttikokoelmasta (K2.1, K2.4 ja K2.8) ja kolme homotsygoottia linjaa K4 mutanttikokoelmasta (K4.4, K4.5 ja K4.12). (Taulukko 4) Useamman insertion mutanttikokoelmista (K1, K3 ja K5) ei pystytty antibioottisegregaation perusteella luotettavasti tunnistamaan tutkittavan geenin suhteen homotsygootteja linjoja. Villi tyypin Columbia-kontrollin kaikki itäneet yksilöt olivat herkkiä antibiootille.

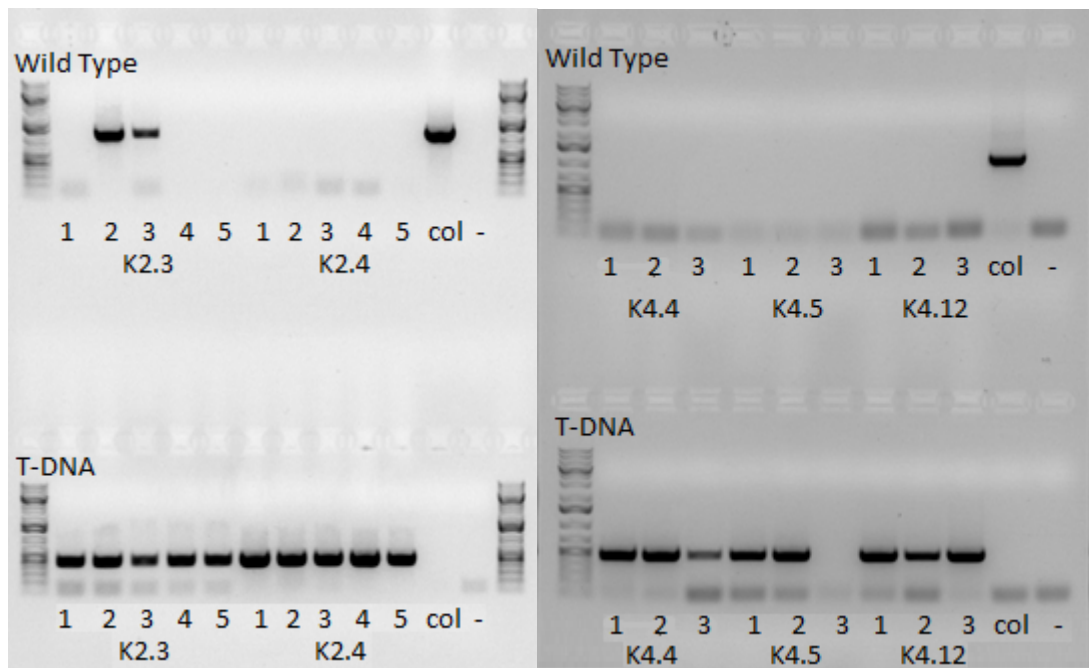
Taulukko 4. K2 ja K4 mutanttikokoelman antibioottisegregaatiotulokset kahden viikon iässä. Segregaation lasketut lukumäärät vasemmalta oikealle: Istutetut siemenet, Itäneet kasvit ja antibioottiresistentit kasvit.

Linja	Segregaatio	Genotyyppi	Linja	Segregaatio	Genotyyppi
K2.1	30: 24:24	Homotsygootti	K4.1	30:14:12	Heterotsygootti
K2.2	30:30:14	Heterotsygootti	K4.2	27:12:8	Heterotsygootti
K2.3	30:29:21	Heterotsygootti	K4.4	31: 5:5	Homotsygootti
K2.4	30: 30:30	Homotsygootti	K4.5	30: 19:19	Homotsygootti
K2.5	30:29:15	Heterotsygootti	K4.7	31:13:9	Heterotsygootti
K2.8	30: 29:29	Homotsygootti	K4.8	30:11:6	Heterotsygootti
K2.9	30:25:20	Heterotsygootti	K4.9	31:26:18	Heterotsygootti
K2.12	30:25:5	Outo heterotsygootti	K4.12	31: 23:23	Homotsygootti

9.3.2 Elektroforeesierottelun tulokset

PCR-tulosten perusteella K2.3 ja K2.4 linjoissa kaikki genotyyppitykseen valitut kasvit sisälsivät T-DNA-insertion (kuvio 27 vasen alarivi). PCR-reaktiossa monistuneet villi tyypin reaktiot tulivat kuitenkin näkyville elektroforeesigeelissä K2.3 linjan 2 ja 3 näytepaikoissa (kuvio 27, vasen yläarivi), ja tästä johtuen linja ei ollut täysin homotsygootti. Tulosten perusteella K2.4-linjan jokainen tarkkailtu yksilö sisälsi T-DNA-insertiolle spesifisen tuotteen. Koska villi tyypin tuotteet puuttuivat kaikkien näytteiden kohdalta, voitiin linja määritellä homotsygootiksi.

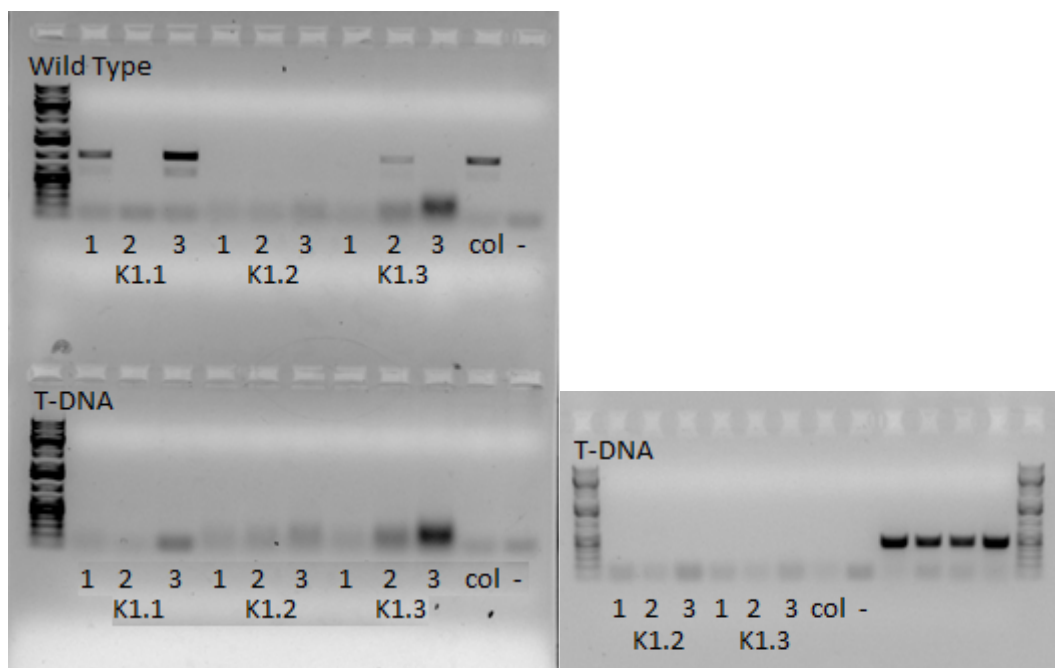
K4-kokoelman genotyypityksessä K4.4 ja K4.12 -linjoissa kaikki DNA-eristetyt kasvit ilmensivät T-DNA tuotteen ja niistä puuttui villi tyyppin reaktiotuote. Näin ollen linjat voitiin määrittää homotsygooteiksi linjoiksi. T-DNA monistustuote oli hävinnyt K4.5-linjan kolmannesta kaivosta. Vaikka linja ei ilmentänyt villi tyyppin tuotetta, linjaa ei luotettavasti voitu kuitenkaan yleistää varmuudella homotsygootiksi. (Kuvio 27 oikealla)



Kuvio 27. Yhden insertion linjat: vasemmalla K2-linjan elektroforeesituloste, oikealla K4-linja. Ylärivillä villi tyyppi, alarivillä T-DNA insertio.

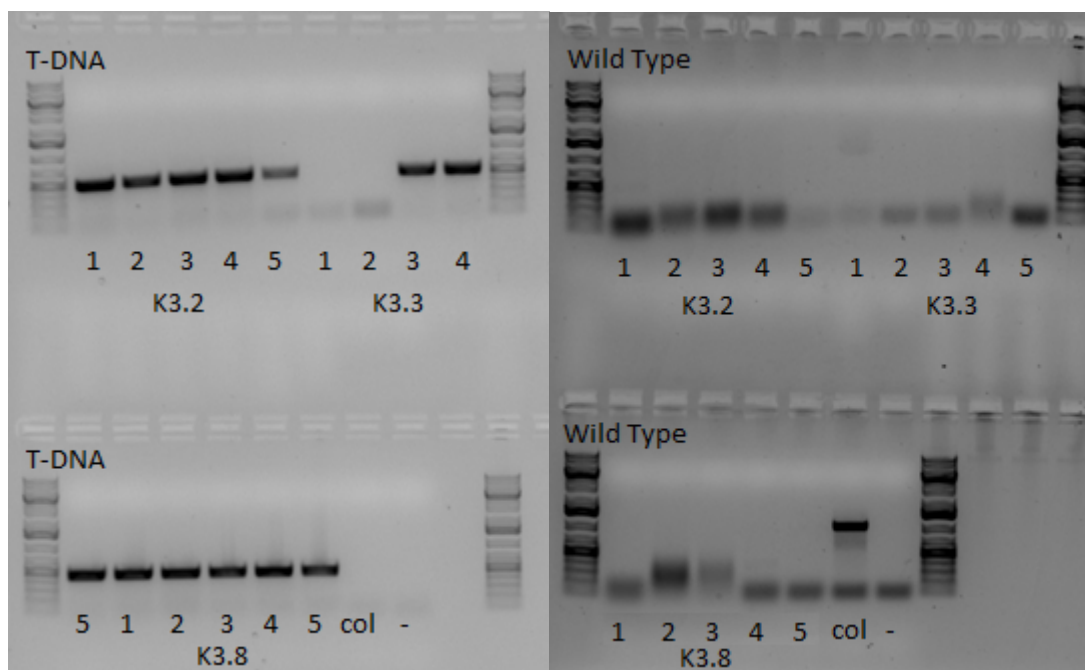
K1-kokoelman genotyypityksessä tehtiin kaksi elektroforeesigeeliä, sillä T-DNA monistustuotteet olivat kaikki hävinneet. Ensimmäisessä erottelussa (kuvio 28 vasemmalla) linjat K1.1 ja K1.3 ilmensivät villi tyyppin tuotetta vahvasti yhteensä kolmessa kaivossa, joten näiden linjojen voitiin päätellä varmuudella olevan heterotsygootteja. Linjassa K1.2 villi tyyppin reaktio ei kuitenkaan ollut tästä huolimatta näkyvissä. Linjan voitiin siis päätellä olevan homotsygootti, mikä kuitenkin varmistettiin toisella geelierottelulla optimoiden PCR-reaktio-olosuhteita. Toisessa erottelussa (kuvio 28 oikealla) templaatin määrä vähennettiin yhteen mikrolitraan. Tästä huolimatta K1.2 linjassa reaktiotuotteita ei saatu esille. Suuntaa antavien segregaatitulososten perusteella K1.2-linjaa voitiin pitää homotsygoottina. Tästä johtuen on mahdollista, että linja oli homotsygootti toisen insertion suhteen, mitä ei pystytty määrittämään käytettyjen alukkeiden avulla. Kyseistä

linjaa ei pystytty varmuudella määrittämään homotsygootiksi linjaksi tutkitun insertion suhteen.



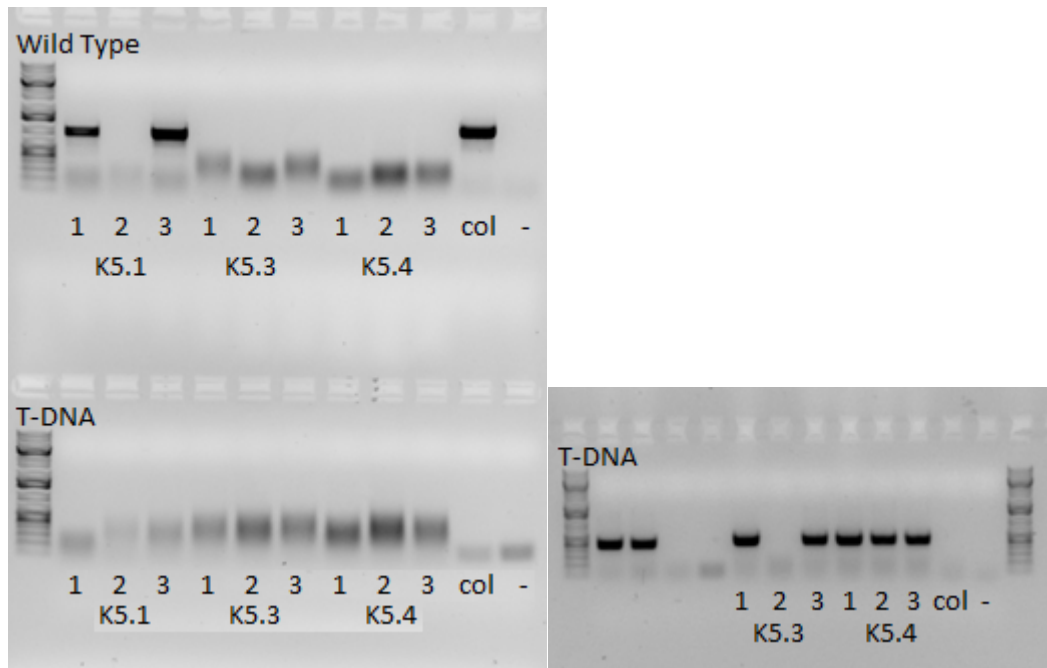
Kuvio 28. Useamman insertion linjan K1 elektroforeesitulosteet. Vasemmalla ensimmäinen yhdistetty erottelu, jossa ylärivissä on villi tyyppin tuotetta ja alarivissä T-DNA insertiotuotetta. Erotteluaika n. 16 minuuttia. Oikella uudelleen eroteltu T-DNA insertiotuotteen reaktio. Erotteluaika 12 minuuttia.

K3-linjojen villi tyyppin reaktiotuotteiden elektroforeesi erottelussa tuotteet näkyivät todella heikosti, vaikka Columbian monistustuote oli vahvasti esillä. K3.3 linjan ensimmäisessä kaivossa oli näkyvissä heikko villi tyyppin tuote, minkä perusteella K3.3 oli heterotsygootti linja (kuvio 29 vasemmalla). T-DNA-tuotteiden esille saamiseksi käytettiin 1 µl templaattia. T-DNA-spesifinen tuote tuli näkyviin kaikissa kasveissa, josta DNA eristettiin linjoissa K3.2 ja K3.8 (kuvio 29 oikealla). Täten molempien linjojen voitiin sanoa olevan insertion suhteen homotsygootteja linjoja.



Kuvio 29. Useamman insertion linja K3 elektroforeesitulosteet. Vasemalla eroteltu villi tyypin tuotetta ja oikealla T-DNA insertiotuotetta.

K5-linjojen genotyypityksessä villi tyypin reaktiotuotteet saatiin esille K5.1-linjassa, kahdessa kaivossa (kuvio 30 vasemmalla). Tästä johtuen linja oli varmistettu heterotsygootti. Linjat K5.3 ja K5.4 eivät ilmentäneet villi tyypin alukkeilla monistustuotteita, mutta ensimmäisessä erottelussa T-DNA-spesifisillä alukkeilla ei myöskään saatu tuotetta näkyville. Tästä johtuen K5.3 ja K5.4-linjat eroteltiin uudelleen muuttaen templaatin määräksi 1 μ l. Monistustuotteet saatiin näkyviin kaikissa muissa kasveissa, paitsi K5.3-linjan toisessa yksilössä. Tästä huolimatta saatiin varmistettua K5.4-linjan homo-tysootiksi, sillä linja ei ilmentänyt yhtään villi tyypin reaktiotuotetta ja kaikista löytyi T-DNA-insertiolla spesifinen reaktio (kuvio 30 oikealla).



Kuvio 30. Useamman insertin linja K5 elektroforeesitulosteet. Vasemmalla ensimmäinen yhdistetty erottelu, jossa ylärivissä on villi tyyppin tuotetta ja alarivissä T-DNA insertiotuotetta. Oikealla toinen T-DNA-insertiotuotteen ajo.

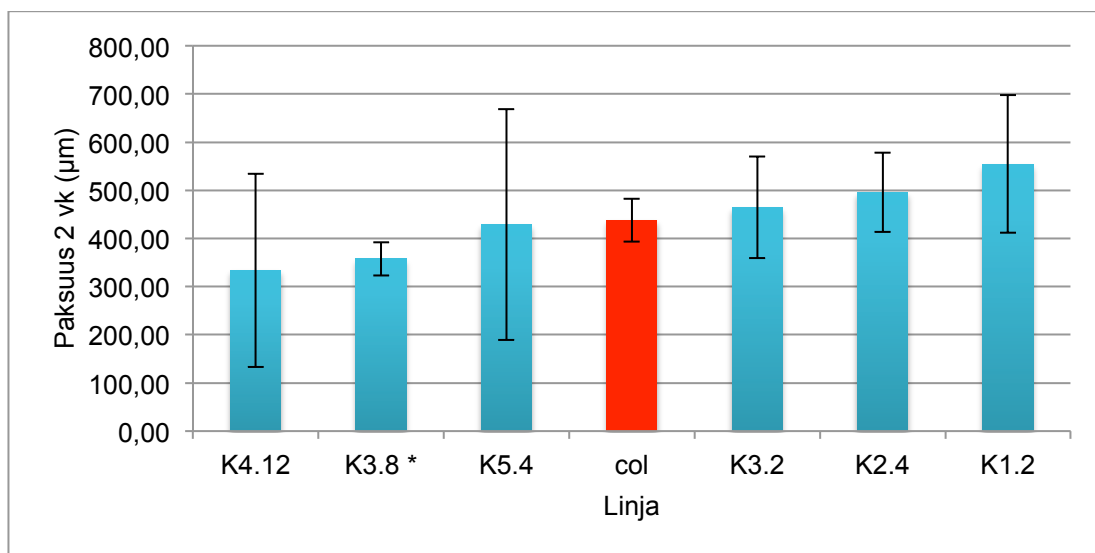
PCR:n avulla monistetun reaktiotuotteen ja elektroforeesierottelun perusteella saatiin varmistettua kustakin K-kokoelmasta homotsygootti linjat. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Yhteenveto PCR:n ja agarosielektroforeesin avulla saaduista genotyypityksistä linjakohtaisesti.

Linja	Genotyyppi	Linja	Genotyyppi
K2.3	Heterotsygootti	K1.3	Heterotsygootti
K2.4	Homotsygootti	K3.2	Homotsygootti
K4.4	Homotsygootti	K3.3	Heterotsygootti
K4.5	Homotsygootti ?	K3.8	Homotsygootti
K4.12	Homotsygootti	K5.1	Heterotsygootti
K1.1	Heterotsygootti	K5.3	Heterotsygootti
K1.2	Todennäköisesti homotsygootti	K5.4	Homotsygootti

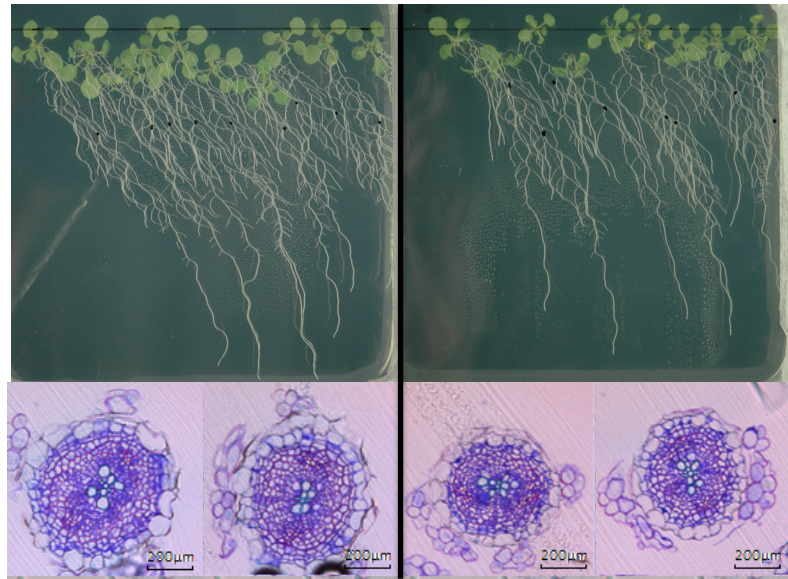
9.3.3 Poikkileikkeet

Tulosten perusteella K-kokoelman ohutkasvuisin linja oli K4.12 ($ka=334,06 \mu\text{m}$). Maljal-
la kasvoi neljä täysikasvuista kasvia ja kolme pientä kasvia, mistä johtuen paksuuskas-
vujenkin vaihteluväli oli luonnollisesti suuri ($200,86 \mu\text{m}$). Tästä johtuen tarkasteltiin toi-
seksi ohuinta K-linjaa, K3.8, jossa juurten paksuudet olivat keskimäärin $357,93 \mu\text{m}$.
Kasvien välinen vaihteluväli oli vain $34,72 \mu\text{m}$. Paksuimmat juuret kuuluivat linjaan
K1.2 ($ka=554,43 \mu\text{m}$). Koska kyseistä linjaa ei kuitenkaan genotyyppityksen perusteella
voitu yksiselitteisesti määrittää tutkitun DNA-insertion suhteen homotsygootiksi yksilök-
si (taulukko 5), valittiin tarkasteltavaksi keskiarvoltaan toiseksi paksujuurisin linja, K2.4
($ka=494,78 \mu\text{m}$). K2.4-linjan juurten paksuus erosi villi tyypistä $58,04 \mu\text{m}$. (Kuvio 31)



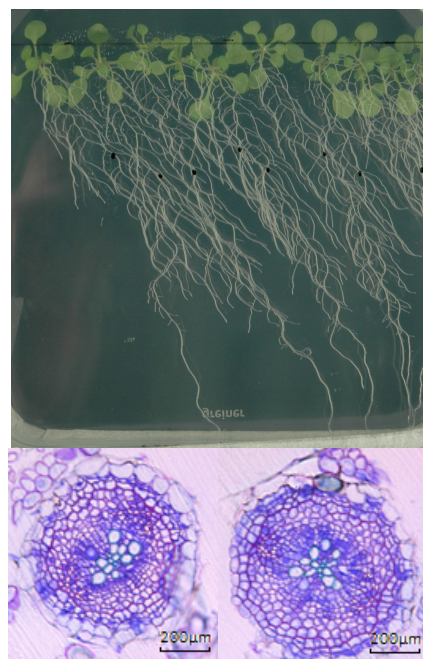
Kuvio 31. K-kokoelman kasvien paksuuskasvujen keskiarvot ja keskihajonnat. Punaisella on merkitty villi tyyppi ja tähdellä tilastollisesti merkittävät linjat.

Toiseksi ohutkasvuisimman linjan, K3.8 itäneiden kasvien juuret olivat kaikki kahden viikon ikäisinä lähes villi tyypin juurten pituisia. K3.8-linjan juuret poikkesivat yhden viikon ikäisinä Columbian juurten pituuksista keskimäärin vain $1,18 \text{ cm}$. Tästä huolimatta juurten paksuuksien keskiarvo poikkesi villi tyypin keskiarvosta $80,1 \mu\text{m}$. Paksuudessa havaittavien erojen lisäksi kasvien lehdet olivat mutanttilinjassa pienemmät Columbian verrattuna. (Kuvio 32)



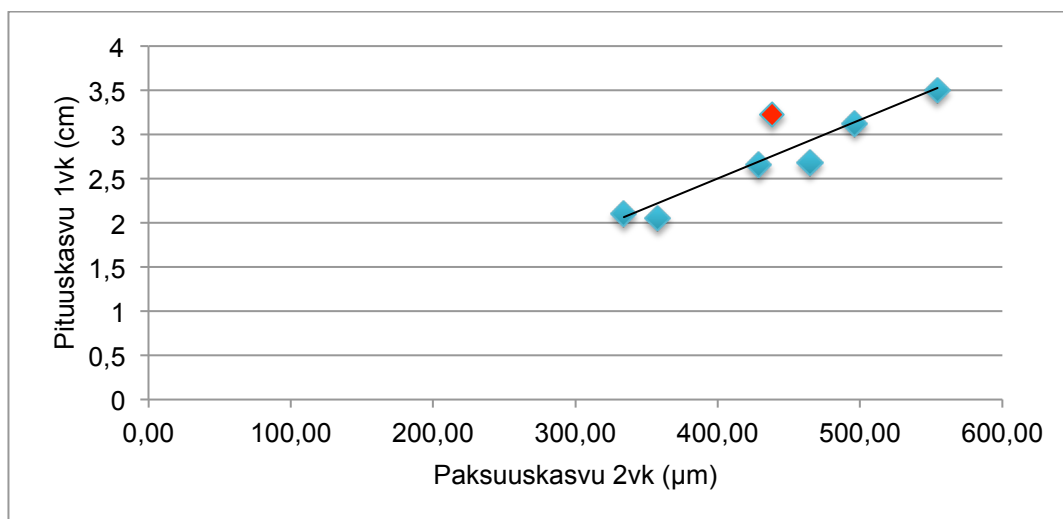
Kuvio 32. Vasemmalla villi tyyppin kasvit maljalla ja edustavat yksittäiset poikkileikkeet. Oikealla toiseksi ohuin linja K3.8 kasvamassa kasvatusmaljalla ja kahden juuren poikkileikkeet. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Yhdessä paksuimmista linjoista, K2.4, juurissa oli näkyvissä pidempiä sivujuuria villi tyyppin kasveihin verrattuna. Pääjuuret olivat kuitenkin suhteellisen saman pituisia sekä mutanttilinjassa, että Columbiassa. Yhden viikon ikäisenä K2.4-linjan juuret olivat keskimäärin vain 0,1 cm lyhyempiä kuin villi tyyppin linjassa. Yksittäisiä poikkileikkeitä vertaillessa K2.4-mutanttilinjassa juuret olivat kuitenkin suurempia. (Kuvio 33)



Kuvio 33. Toiseksi paksuimman linjan K2.4 kasvit ja juuret. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa villi tyyppiin nähden ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

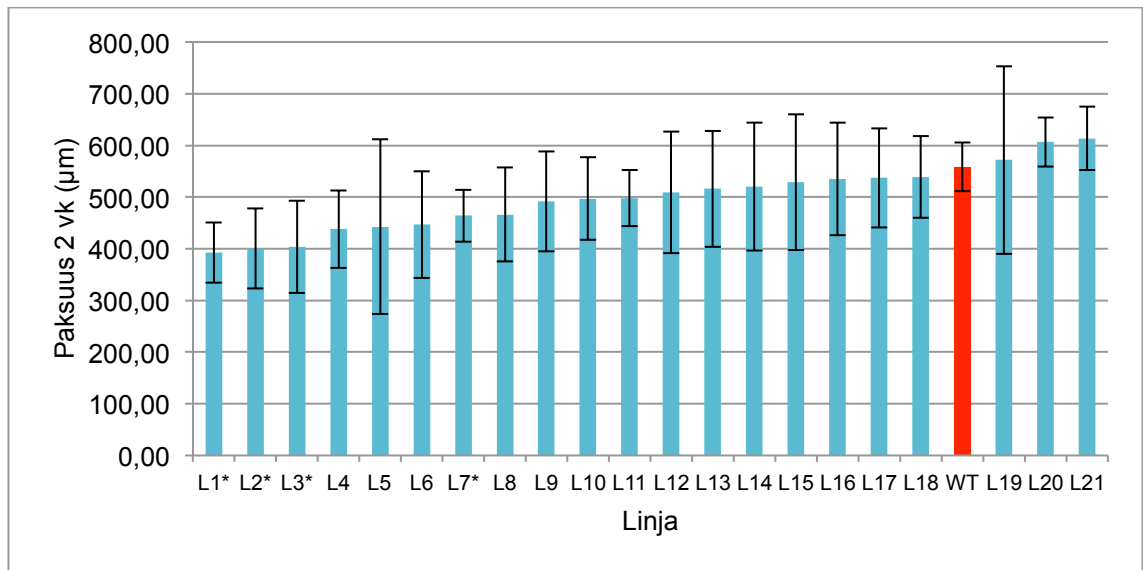
Kuvion 34 perusteella paksuimmiksi mitatut juuret olivat myös kasvaneet eniten pituutta yhden viikon ikäisinä. Vastaavasti lyhyimmät juuret yhden viikon iässä, olivat myös oletettavasti ohuempia kahden viikon kohdalla. Villi tyyppin juurten keskimääräinen pituuskasvu yhden viikon iässä erosi kuitenkin muiden linjojen juurien keskiarvoihin verrattuna. Yleisesti ottaen villi tyyppin kasvit olivat myös kasvaneet keskenään paljon tasaisemmin ja muissa linjoissa kasvien juurten pituuksissa esiintyi enemmän vaihtelua. Pearsonin korrelaatiokertoimen ($r=0,9$) perusteella pystyttiin sanomaan, että juurten pituuksien ja paksuuksien välillä oli voimakas korrelaatio.



Kuvio 34. K-kokoelman kahden viikon ikäisten kasvien juurten paksuudet ja yhden viikon ikäisten kasvien juurten pituuskasvun välinen yhteys. Punaisella on merkitty villi tyyppin linja.

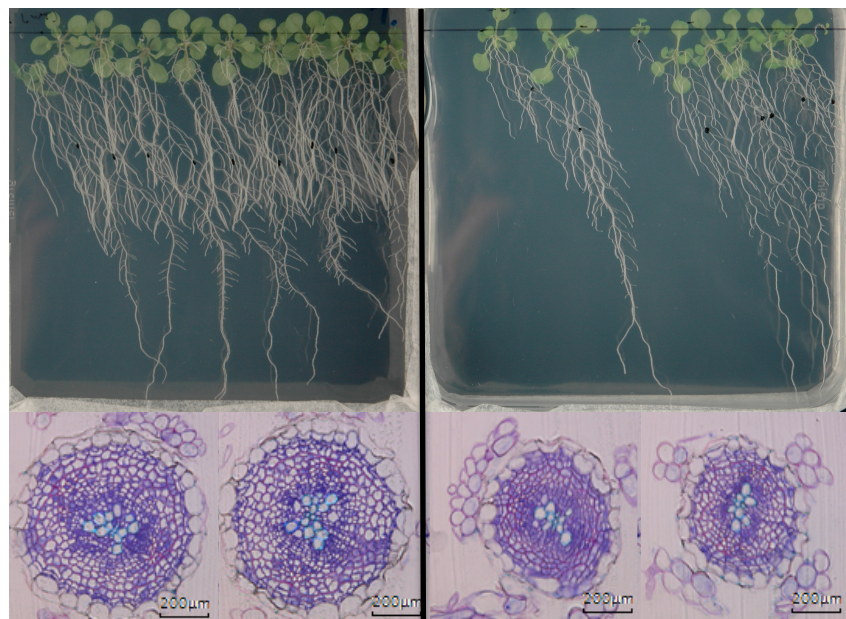
9.4 L-linjojen tulokset

L-linjan juurista otettiin tarkempaan tarkasteluun linjat L1, L2, L3 sekä L21, jotka edustivat ohuinta ja paksuinta ääripäätä. L1-linjassa juurten keskimääräinen paksuuskasvu oli 392,16 µm ja vaihteluväli 58,28 µm. Linjan L2 paksuus oli 400,37 µm ja L3-linjan keskimäärin 403,87 µm. Kolmen ohuimman linjan juurten paksuuskasvut erosivat toisistaan enintään vain 11,71 µm. Kokoelman paksujuurisimman, L21-linjan keskimääräinen paksuus oli 613,55 µm ja vaihteluväli 61,47 µm. (Kuvio 35)



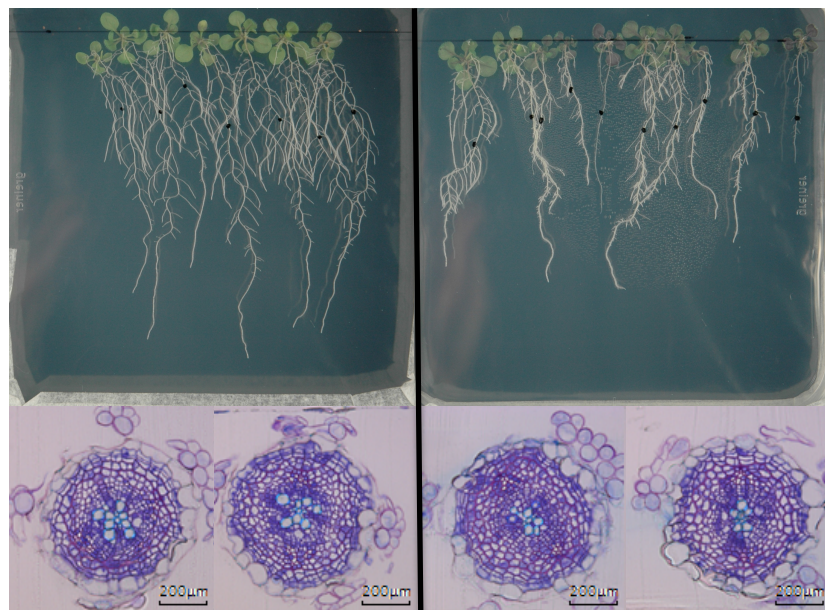
Kuvio 35. L-linjojen juurten keskimääräiset paksuudet 2 viikon iässä. Punaisella merkitty villi tyyppin linja ja tähdellä tilastollisesti merkittävät linjat.

L1-linjassa, kahta pienikasvuista kasvia lukuun ottamatta, lehdet olivat samaa kokoluokkaa villi tyyppin kanssa. Tästä huolimatta juuret eivät olleet kasvaneet villi tyyppin tapaan yhtä tiheään, eivätkä kasvien sivujuuret kasvaneet yhtä tiiviisti villi tyyppiin verrattuna. Juuret olivat keskimäärin 166,6 µm ohuempia villi tyyppiin nähden. Yhden viikon iässä juuret olivat olleet keskimäärin 1,25 cm lyhyempiä mutanttilinjassa. (Kuvio 36)



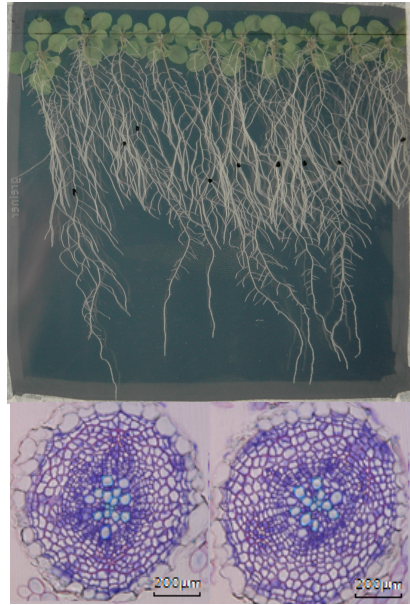
Kuvio 36. Vasemmalla villi tyyppin linjan kasvit ja juuret. Oikealla ohuin linja, L1 kasvamassa kasvatusmaljalla ja kahden juuren poikkileikkeet. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Linjojen L2 ja L3 juuret olivat selvästi kahden viikon iässä jääneet lyhyemmiksi kuin villi tyyppin kasvit keskimäärin. Yhden viikon iässä villi tyyppin juurten keskimääräinen pituus oli 3,55 cm, L2-linjan 2,45 cm ja L3-linjan 2,20 cm eli juuret olivat myös yhden viikon ikäisinä keskimäärin vähintään 1,1 cm lyhyempiä. Juurten pituuden lisäksi sivujuuret olivat villiin tyyppiin verrattuna poikkeavan näköisiä ja jääneet huomattavasti lyhyemmiksi, etenkin L3-linjassa. L3-linjan kasvit näyttävät pieniltä ja lehdet olivat paikoittain ruskean väriset. (Kuvio 37)



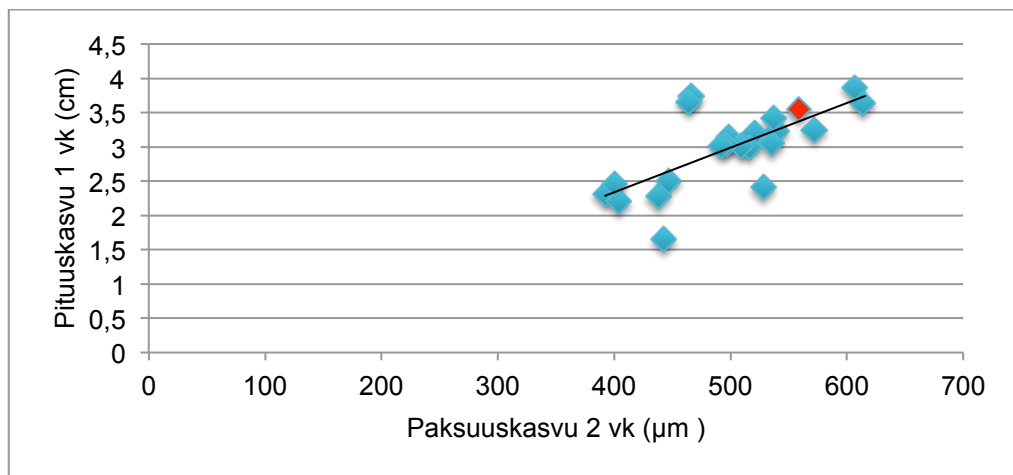
Kuvio 37. Kuvio Vasemmalla toiseksi ohuin linja L2 ja oikealla kolmanneksi ohuin L3 ja kahden juuren poikkileikkeet. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa villi tyyppiin nähden ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Fenotyyptään linjan L21 kasvit eivät suuresti eronneet villi tyyppistä. Juuret olivat kasvaneet hyvin ja yltivät lähes maljan pohjaan villi tyyppin tapaan. Yhden viikon iässä mutanttilinjan juuret olivat 0,09 cm pidempiä Columbiaan verrattuna. Myös sivujuuret ja niiden tiheä kasvu muistutti L21-linjassa Columbiaa. Tästä huolimatta linjan juurten paksuus erosi villin tyyppin keskimääräisestä paksuudesta 54,79 µm. (Kuvio 38) Toiseksi paksuita linjaa, L20, ei valittu L21-linjaan nähden samansuuntaisista paksuuskasvuista huolimatta tarkempaan tarkasteluun itämisongelmien vuoksi. Vain kaksi kasvia kymmenestä oli itänyt.



Kuvio 38. Paksuimman linjan, L21 kasvit kasvamassa kasvatusmaljalla ja kahden juuren poikkileikkeet. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa villi tyyppiin nähden ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

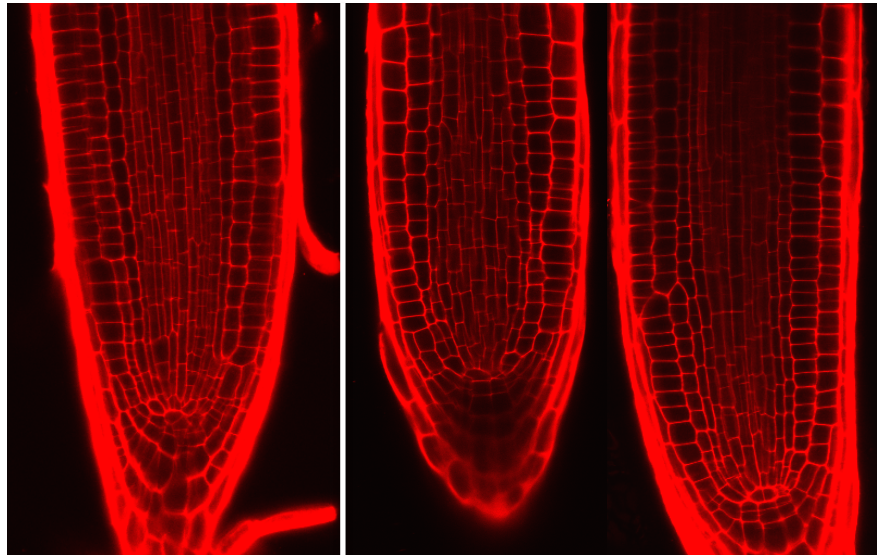
Kuviossa 39 on esitetty L-kokoelman kahden viikon ikäisten kasvien paksuuksien ja yhden viikon ikäisten kasvien pituuskasvun välinen vertailu. Kuvaajasta nähdään että, pituuksien ja paksuuksien välillä on korrelaatiota keskenään. Yhteyksien välinen korrelaatiokerroin oli $r=0,7$.



Kuvio 39. Kahden viikon paksuuskasvun ja yhden viikon pituuskasvun välinen korrelaatio L-linjoissa. Villi tyyppi on merkitty punaisella.

Juurten poikkileikkeiden lisäksi L-linjasta pystyttiin tarkkailemaan ohuimman L1-linjan juuria konfokaalimikroskoopin avulla. Linjasta katsottiin yhteensä viiden kasvin soluker-

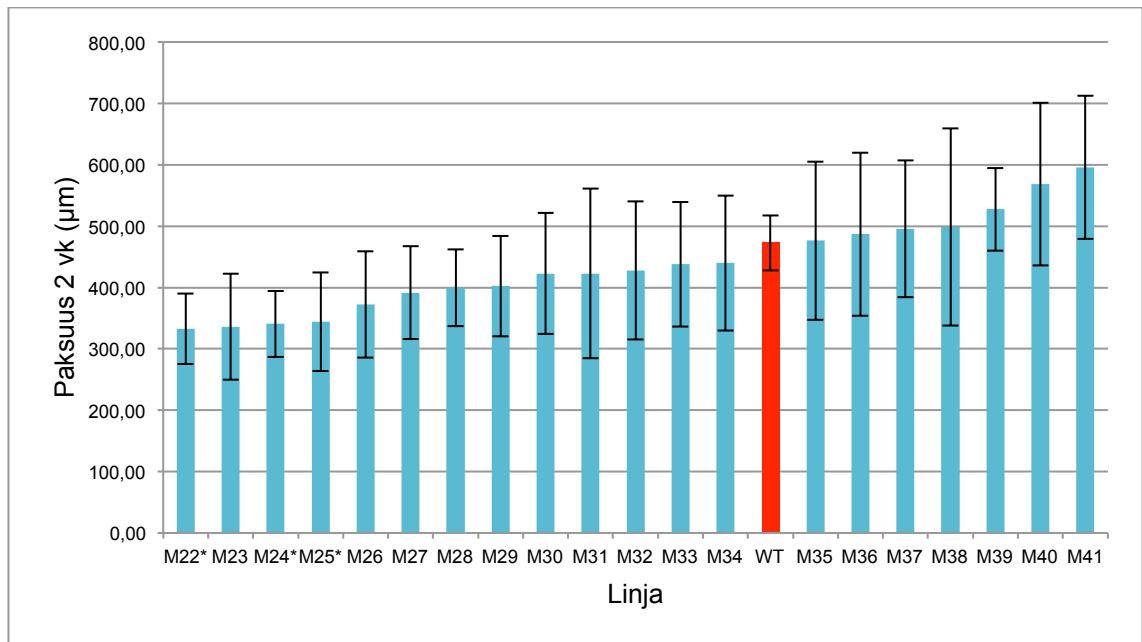
roksia ja ne näyttivät pääasiassa villi tyyppin mukaisilta. Kahdessa juuressa vertikaalisuunnassa otetun kuvan perusteella, juuren puuosa näyttäisi kuitenkin hieman ohenevan, mikä tukee linjan poikkileikkeiden perusteella saatuja paksuuskasvutuloksia. Löydökset ovat kuitenkin kytkeytyneitä vain yksittäisiin juuriin, ja kuvista voidaan pääasiassa nähdä, että geenimutaatio ei ole aiheuttanut radikaaleja rakenteellisia muutoksia juuren kärjessä kummassakaan tarkasteltavassa linjassa. (Kuvio 40 oikealla)



Kuvio 40. Konfokaalimikroskooppikuvia juurten kärjestä. Vasemmalla Columbia ja oikealla kaksi L1-linjan kasvia.

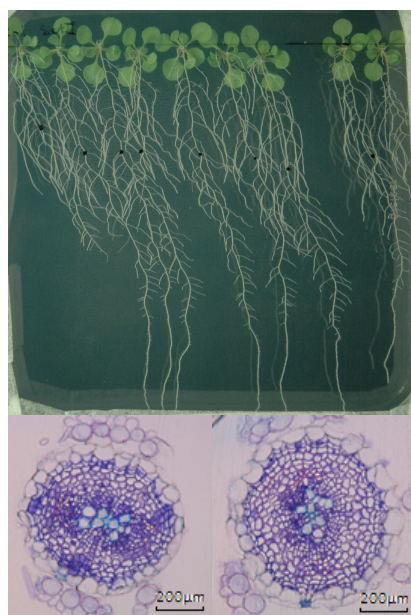
9.5 M-linjojen tulokset

M-linjoista valittiin tarkempaan tarkasteluun neljä ohuinta ja kaksi paksujuurisinta linjaa. Poikkileikkeiden perusteella juurten ohuin keskiarvo oli M22-linjalla ($k_a=332,69 \mu\text{m}$). Linjan M22 juurten paksuudet erosivat villi tyyppin paksuuksista keskimäärin $140,16 \mu\text{m}$. Seuraavaksi ohuimpien juurten arvot poikkesivat ohuimmasta enintään $11,61 \mu\text{m}$. M23-linjan juurten paksuus oli $336,08 \mu\text{m}$, M24-linjan $340,59 \mu\text{m}$ ja M25-linjan keskimäärin $344,30 \mu\text{m}$. Paksuimmat juuret olivat linjassa M41 ($k_a=595,76 \mu\text{m}$), vaikkakin paksuusmittauksissa oli vaihtelua yksittäisten juurten välillä $116,43 \mu\text{m}$. Linjan M41 juuret olivat keskimäärin $122,95 \mu\text{m}$ paksumpia kuin villi tyyppin juuret. Toiseksi paksuimman linjan M40 juuret olivat keskimäärin $568,08 \mu\text{m}$ ja mittaukset vaihtelivat yksilöiden välillä maksimissaan $132,57 \mu\text{m}$. (Kuvio 41)

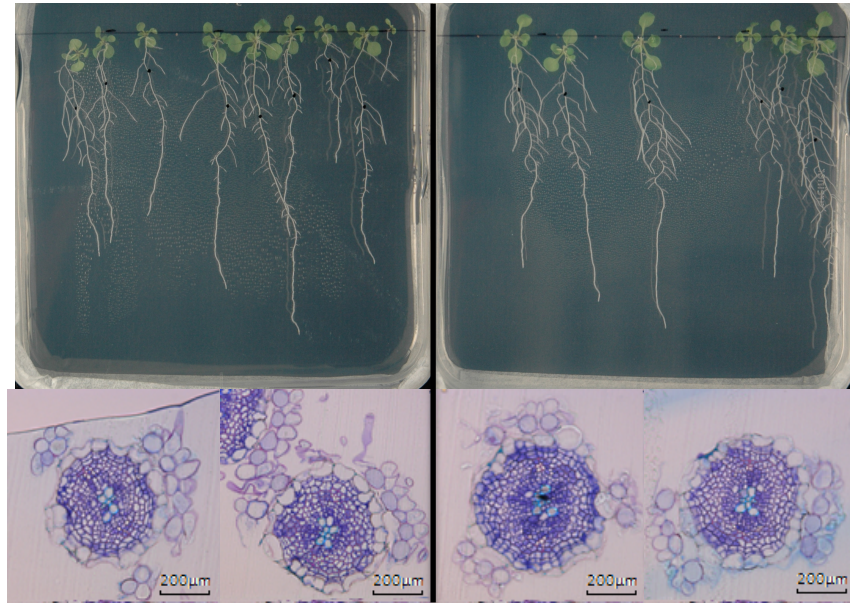


Kuvio 41. Kahden viikon ikäisten M-linjojen juuret ohuimmasta paksuimpaan. Punaisella on merkitty villi tyyppi ja tähdellä tilastollisesti merkittävät linjat.

Kahdessa ohuimmassa linjassa M22 ja M23 juurten pituudet olivat jääneet villi tyyppiä lyhyemmiksi, vaikka kasvit olivat kasvaneet yhtä kauan. Yhden viikon ikäiset M22-linjan kasvit olivat keskimäärin 1,84 cm ja M23-linjassa puolestaan 1,97 cm. Villi tyyppin kasvit puolestaan olivat yhden viikon iässä keskimäärin 3,12 cm (kuvio 42, mustat pisteet maljalla). Linjojen M22 ja M23 lehdet olivat hieman Columbiaa pienempiä ja ohuimman linjan M22 sivujuuret olivat jääneet vielä hyvin pieniksi villi tyyppiin nähden. (Kuviot 42 ja 43)

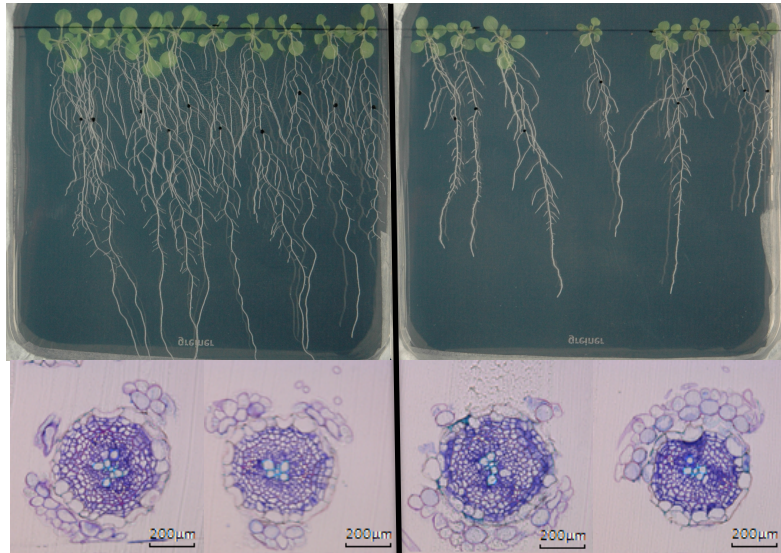


Kuvio 42. Villi tyyppin kasvit kasvatusmaljalla ja kaksi optimaalista juuren poikkileikettä. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa muihin M-linjan kasveihin verrattuna ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.



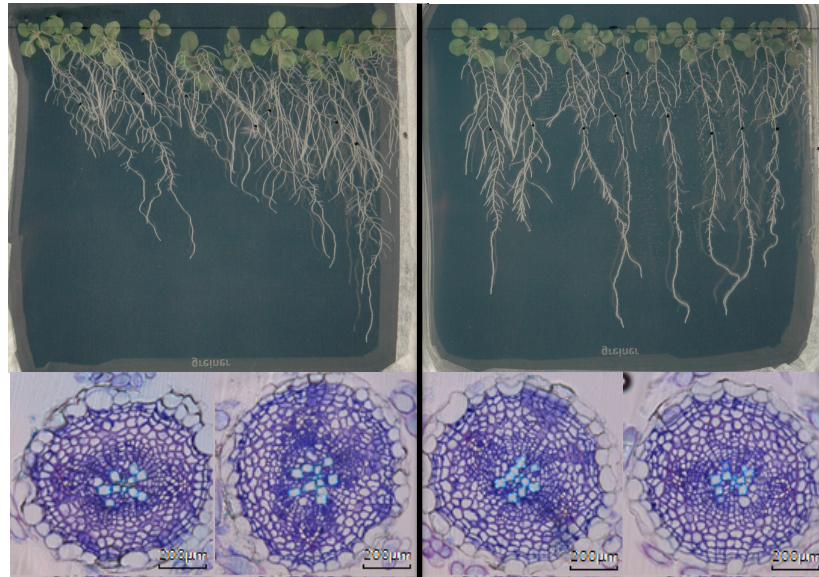
Kuvio 43. Vasemmalla ohuin linja M22 ja oikealla toiseksi ohuin linja M23. Kuvassa on esitetty linjojen kasvit kasvatusmaljalla ja kaksi yksittäistä juuren poikkileikettä. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa villi tyyppiin nähden ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Linjan M24 kasvit muistuttivat hyvin merkitsevästi villi tyyppin kasveja, vaikka juuret olivatkin $132,22 \mu\text{m}$ Columbiaa ohuempia. Yhden viikon ikäisenä M24-linjan juuret olivat keskimäärin $2,75 \text{ cm} \pm 0,40 \text{ cm}$ pituisia ja Columbian $3,12 \text{ cm} \pm 0,34 \text{ cm}$. Linjat olivat siis kasvaneet keskimäärin yhtä nopeasti. Linjan M25 kasvit olivat kaikin puolin villi tyyppiä pienempiä. Yhden viikon iässä juurten pituus oli $2,29 \text{ cm} \pm 0,56 \text{ cm}$. Pää- ja sivujuuret olivat jääneet lyhyiksi ja lehtien koko oli Columbiaa pienempi. Tästä johtuen on luonnollista, että juuret olivat myös ohuempia. (Kuviot 42 ja 44)



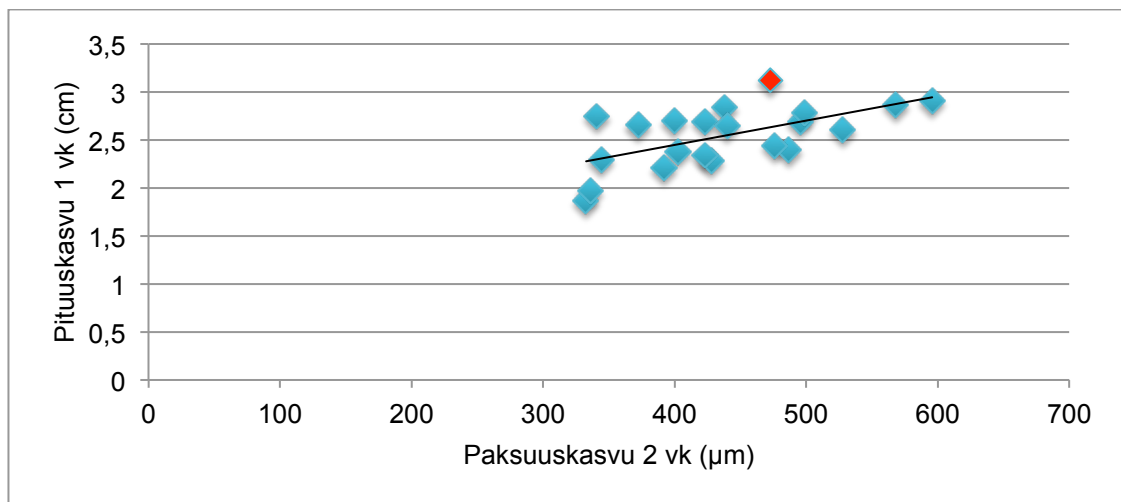
Kuvio 44. Vasemmalla kolmanneksi ohuin linja M24 ja oikealla neljänneksi ohuin linja M25. Kuvassa on esitetty linjojen kasvit kasvamassa maljalla ja kaksi yksittäistä juuren poikkileikettä. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa villi tyyppiin nähden ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Paksujuurisimman linjan, M41 juuret olivat lyhyitä, mutta huomattavasti villi tyyppin juuria paksumpia. Sivujuuria oli paljon ja ne kasvoivat toisiinsa nähden päällekkäin. Yhden viikon iässä M41-linjan juuret olivat keskimäärin kuitenkin vain 0,21 cm villi tyyppin kasveja lyhyempiä. Juuret kasvoivat muista kokoelman kasveista poiketen erityisen paljon vinoon oikealle puolelle. Toiseksi paksuimman linjan, M40 juuret olivat kahden viikon iässä vain hieman villi tyyppin kasveja lyhyempiä. Sivujuuret olivat jääneet lyhyemmiksi kuin villi tyyppissä ja sivujuurista lähti edelleen hyvin pieniä sivujuuriulokkeita. Kasvien lehdet olivat hieman pienikokoisia ja ne olivat alkaneet värjäytymään hieman ruskeiksi. Yhden viikon iässä mutanttulinjan juurten pituudet olivat vain 0,25 cm lyhyemmät villi tyyppin linjaan verrattuna. (Kuviot 42 ja 45)



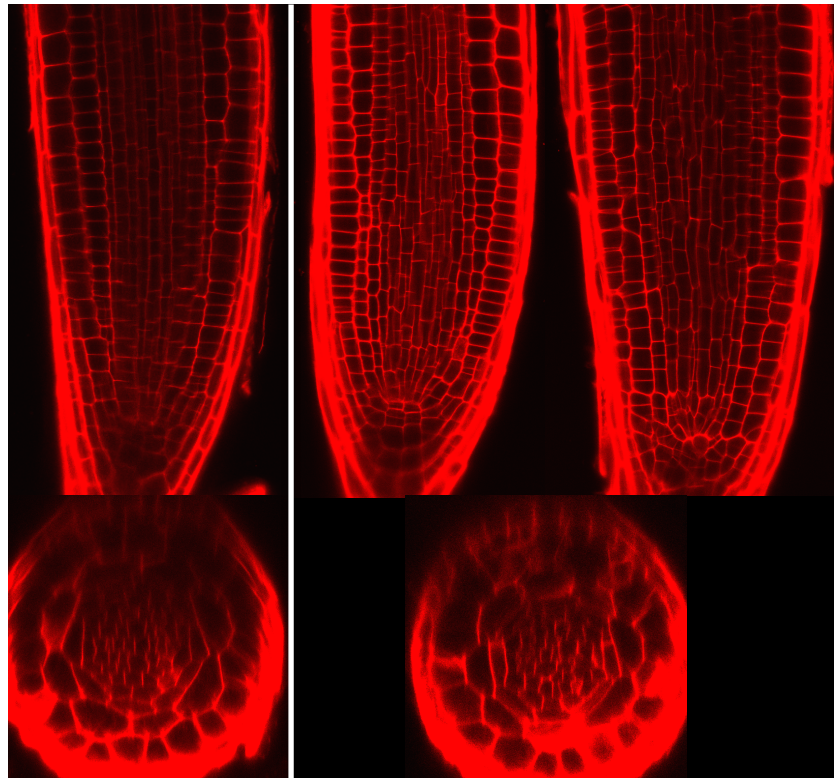
Kuvio 45. Vasemmalla paksuin M41 ja oikealla toiseksi paksuin linja M40. Kuvassa on esitetty linjojen kasvit kasvamassa maljalla ja kaksi yksittäistä juuren poikkileikettä. Juurten poikkileikkeet on esitetty samassa suhteessa villi tyyppiin nähden ja kuvattu x20 suurennuksella. Maljan mitta on 12 cm x 12 cm.

Kuviossa 46 on esitetty yhden viikon ikäisten kasvien juurten pituuksien ja kahden viikon ikäisten kasvien juurten paksuuksien välinen suhde. Kuvion perusteella oli havaittavissa pituuksien ja paksuuksien välillä oleva korrelaatio. Yhden viikon iässä lyhytkasvuisen kasvin juuri oli myös kahden viikon iässä jäänyt ohueksi. Muuttujien välinen korrelaatio oli $r=0,6$.



Kuvio 46. M-kokoelman linjojen keskimääräisten juurten pituuksien suhde yhden viikon iässä kasvien juurten keskimääräiseen paksuuteen kahden viikon ikäisissä kasveissa. Punaisella on merkitty villi tyyppiin linja.

Juurten poikkileikkeiden lisäksi pystyttiin tarkastelemaan M-linjan ohuimman linjan, M22 kasvien solukerroksia juuresta konfokaalimikroskoopin avulla. M22-linjan yksittäisissä kasveissa huomattiin kuvien avulla erilaisia epänormaaleja poikkeamia villi tyyppiin verrattuna. L-linjan konfokaalimikroskooppikuvien mukainen löydös, jossa juuri ohuenee, oli myös havaittavissa M22-linjan yhdessä tarkkailuun otetussa kasvissa (kuvio 47, M22-kasvi vasemmalla). Toisessa linjan yksilössä kasvin kuorisolukerros jakaantui oikealla puolella pian juuren kärjestä lähtien kahdeksi kerrokseksi (kuvio 47, M22-kasvi oikealla). Samalta etäisyydeltä otetut poikkitason kuvat villi tyyppiin ja M22-linjan kasveissa näyttivät selvästi eroja juuren paksuudessa. Mutanttilinjan juuressa solukerrostien määrä oli pienempi Columbiaan verrattuna, mikä tuki poikkileikkeiden perusteella saatuja tuloksia. (kuvio 47, alhaalla) Löydökset olivat kuitenkin kytkeytyneitä vain yksittäisiin juuriin, ja pääasiassa voitiin nähdä, että geenimutaatio ei ollut aiheuttanut radikaaleja rakenteellisia muutoksia juuren kärjessä kummassakaan tarkasteltavassa linjassa ja tässä määrin juuret olivat molemmissa kasveissa villi tyyppiin mukaisia.



Kuvio 47. Konfokaalimikroskooppikuvaa juuresta pitkäsuunnassa ja poikkisuunnassa. Vasemmalla villi tyyppiin kasvi ja oikealla kaksi lateraalisuunnan M22-kasvia ja yksi poikkikuvaa. Poikkitasokuva juuresta on otettu kummassakin linjassa n. 100 μm etäisyydeltä juuren kärjestä.

10 Johtopäätökset

Opinnäytetyöhön analysoitujen kasvilinjojen perusteella saatiin tuloksia lupaavista geeneistä, jotka näyttävät vaikuttavan kasvimutanttien paksuuskasvuun joko lisäävästi tai vähentävästi villi tyyppin linjoihin verrattuna. Johtopäätöksiä tehtiin perustuen muun muassa juurten keskimääräisiin paksuuksiin, pituuksiin sekä itävyyteen. Lisäksi opinnäytetyössä hyödynnettiin t-testiä arvioimaan linjojen paksuuksien tilastollista merkitsevyyttä verrattuna villi tyyppin keskiarvoon. Näillä perusteilla, kyseisillä geeneillä saattaa olla mahdollisia vaikutuksia jällen toiminnan säätelyssä, mikä vaikuttaa kasvin paksuuskasvun vaihteluihin. T-testi suoritettiin Microsoft Excel-ohjelmalla, käyttäen kahden otoksen ja epätasaisen varianssin t-testiä. T-testien tulokset korjattiin tämän jälkeen Holm-Bonferroni Sequential Correction -korjauskertoimella, jonka tarkoitus oli poistaa väärät positiiviset p-arvot. Korjaukset tehtiin Justin Gaetanon suunnittelemaalla Excel-kaavakkeella (Gaetano 2013).

K-kokoelmien linjoissa K3.8-linjan juuret olivat keskimäärin 23,7 % (80,10 μm) ohuempia kuin Columbia. Tilastollisesti ero oli erittäin vahvasti merkittävä ($p < 0,005$). (Taulukko 6) Maljalla olevien kasvien itävyys oli hyvä ja kasvien juuret olivat jääneet yhden viikon iässä keskimäärin vain 1,18 cm lyhyemmiksi. Kyseisellä geeneillä voisi olla siis jokin yhteys juuren fenotyypin muutokseen. Koska linja kuitenkin on useamman insertiön linja, oli vaikea määrittää, oliko paksuuskasvun muutos tutkitun insertiön suhteen oleellinen löydös vai ei.

Mielenkiintoisena löytönä linjan K2.4 kasvien juuret olivat keskimäärin 13,3 % (58,04 μm) paksumpia villi tyyppin juuriin verrattuna, vaikka juuret olivat samanpituisia sekä yhden, että kahden viikon iässä. Paksuusjakaumissa ei kuitenkaan ollut t-testin perusteella tilastollista merkitsevyyttä ($p > 0,05$). (Taulukko 6) K2.4 mutanttilinjassa tutkittavalla geenillä on The Arabidopsis Information Resource -keskuksen ylläpitämän rekisterin mukaan tehtävä sytokiniinista aktivoituvan signalointijärjestelmän osana. Juuret olivat keskimääräisten tulosten perusteella kasvaneet villi tyyppiä paksummiksi, eli on syytä olettaa, että geenin puutoksesta olisi hyötyä jällen aktiivisuuden säätelyssä ja edelleen paksumman juuren saavuttamisessa.

Taulukko 6. K-linjojen juurten paksuuksien suurimmat poikkeamat villi tyypin linjaan verrattuna ja paksuuksien tilastollisesti merkittävä ero p-arvon avulla ilmaistuna. Punainen korostus = erittäin vahvasti tilastollisesti merkittävä ($p < 0,005$).

col ka= 438,03 μm	Ero Columbian keskiarvoon	Ero %	p-arvo
K3.8 ka= 334,06 μm	-80,10 μm	-23,7 %	0,003
K2.4 ka= 496,07 μm	+58,04 μm	+13,3 %	0,42

L-linjojen tulokset näyttävät lupaavilta jälleen kehitykseen vaikuttavien geenien suhteen. Erityisesti kaksi linjaa erottuvat pituuden ja paksuuden välisessä vertailussa. L1 linjassa juurten pituudet erosivat yhden viikon iässä keskimäärin 1,25 cm villi tyypistä ja L21-linjassa juuret olivat samanpituisia kuin Columbian juuret. Kahden viikon ikäisinä juuret olivat käytännössä saavuttaneet saman pituuden villi tyyppiin nähden. Tästä huolimatta juurten keskimääräisissä paksuuksissa oli eroa. L1-linjassa juurten paksuus erosi jopa 29,8 % (-166,60 μm) villi tyypistä. Linja oli tilastollisesti merkittävä t-testin mukaan ($p < 0,005$). L21-linjan juurten paksuudet olivat keskimäärin 54,79 μm paksumpia villi tyypin kasvien juuriin verrattuna. Keskimääräisellä paksuudella ei kuitenkaan ollut tilastollista merkitystä Columbiaan verrattuna ($p > 0,05$). (Taulukko 7) L21-linjan geenillä on toistaiseksi vielä tuntematon rooli lituruohon genomissa. Paksuuksista johtuvat erot voisivat siis lupaavasti selittyä jälleen toiminnassa tapahtuneesta muutoksesta.

Linjoissa L2 ja L3 juurten paksuudet poikkesivat villi tyypistä keskimäärin 28,3 % ja 27,7 % (158,39 μm ja 154,89 μm). Keskiarvot olivat tilastollisesti merkittäviä ($p < 0,005$). (Taulukko 7) Juurten pituudet puolestaan olivat yhden viikon iässä poikenneet keskimäärin 1,1-1,35 cm villi tyypin pituuksista. Kahden viikon iässä juuret olivat maljakuvien perusteella kuitenkin jääneet huomattavasti lyhyemmiksi. Tästä johtuen paksuuskasvun muutokset villi tyyppiin verrattuna saattoivat selittyä lyhyellä pituuskasvulla. Sekundaarikasvu ei ollut päässyt vielä kunnolla alkamaan hitaammin itävissä kasveissa. L2-linjassa estetyllä geenillä on löydetty olevan vaikutus lituruohon juurten muotoutumiseen ja kehittymiseen, mikä saattaisi hyvin selittää juuren ohutkasvuisuuden ja poikkeavan fenotyypin. Tästä johtuen on epätodennäköistä, että paksuuskasvussa aiheutuneet muutokset olisivat peräisin suoranaisesti jälleen säätelevästä toiminnasta. L3-linjassa tutkittavalla geenillä on vielä toistaiseksi tuntematon rooli lituruohon genomissa, joten mahdollisesti mutanttilinjassa voi olla myös viitteitä jälleen toiminnassa tapahtuvista muutoksista.

Tilastollisesti merkittävä ero paksuuskasvujen keskiarvoissa Columbiassa verrattuna oli myös linjassa L7 (taulukko 7). Kyseistä linjaa ei kuitenkaan tarkasteltu sen tarkemmin, koska analyysissä keskityttiin vain paksuuskasvun ääripäihin.

Taulukko 7. L-linjojen juurten paksuuksien suurimmat poikkeamat villi tyyppin linjaan verrattuna ja paksuuksien tilastollisesti merkittävä ero p-arvon avulla ilmaistuna. Punainen korostus = erittäin vahvasti tilastollisesti merkittävä ($p < 0,005$), keltainen = tilastollisesti merkittävä ($p < 0,05$).

col ka= 558,76 μm	Ero Columbian keskiarvoon	Ero %	p-arvo
L1 ka= 392,16 μm	-166,6 μm	-29,8 %	0,000
L2 ka= 400,37 μm	-158,39 μm	-28,3 %	0,018
L3 ka= 403,87 μm	-154,89 μm	-27,7 %	0,000
L7 ka= 463,87 μm	-94,89 μm	-17,0 %	0,000
L21 ka= 613,55 μm	+54,79 μm	+9,8 %	0,546

M-mutanttilinjojen M24, M40 ja M41 juurien paksuuskasvu kahden viikon iässä erosi Columbiasta -28 % (-132,22 μm), 20,1 % (95,27 μm) ja 26 % (122,95 μm). Näistä linja M24 oli tilastollisesti merkittävä ($p < 0,005$). (Taulukko 8) M24 ja M40 linjojen geeneillä on toistaiseksi tuntematon rooli lituruohon genomissa. Paksuuskasvussa tapahtuneet muutokset saattaisivat siis viitata jälleen toimintaa säätelevien geenien puuttumiseen. Tätä johtopäätöstä tukee myös havainto, missä kyseisten linjojen juurten pituudet eivät poikkea suuresti villi tyyppin juurten pituudesta. Yhden viikon iässä juuren pituudet nousivat vahvasti villi tyyppin keskimääräistä pituutta.

Linjojen M22, M23 ja M25 juurten paksuudet poikkesivat enintään 30 % (140,12 μm) villi tyyppin paksuudesta. Juurten keskimääräiset paksuuskasvut olivat tilastollisesti merkittäviä linjoissa M22 ja M25 villi tyyppiin nähden ($p < 0,05$). (Taulukko 8) Juurista oli kuitenkin hankala määrittää paksuuteen vaikuttavan pituuden ja fenotyypin välistä merkitystä, sillä juuret olivat itäneet hitaammin muihin linjoihin verrattuna. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin olettaa, että geeneillä olisi mahdollisesti merkitystä jälleen aktiivisuuden säätelyssä.

Taulukko 8. M-linjojen juurten paksuuksien suurimmat poikkeamat villi tyyppin linjaan verrattuna ja paksuuksien tilastollisesti merkittävä ero p-arvon avulla ilmaistuna. Pu-

nainen korostus = erittäin vahvasti tilastollisesti merkittävä ($p < 0,005$), keltainen = tilastollisesti merkittävä $p < 0,05$).

col ka= 472,81 μm	Ero Columbian keskiarvoon	Ero %	p-arvo
M22 ka= 332,69 μm	-140,12 μm	-29,6 %	0,002
M23 ka= 336,08 μm	-136,73 μm	-28,9 %	0,161
M24 ka= 340,59 μm	-132,22 μm	-28,0 %	0,000
M25 ka= 344,30 μm	-128,51 μm	-27,2 %	0,040
M40 ka= 568,08 μm	+95,27 μm	+20,1 %	0,757
M41 ka= 595,76 μm	+122,95 μm	+26,0 %	0,411

Itämisiongelmat aiheuttivat haasteen *crf*-mutanttilinjojen tulosten tulkintaan. Tulosten perusteella *crf* A-2 kasvoi 31,1 % (156,56 μm) ohuemmaksi villi tyyppiä. Erolla ei kuitenkaan ollut t-testin mukaan tilastollista merkitystä ($p > 0,05$). (Taulukko 9) Ohut paksuus voisi kuitenkin olla merkki *CRF* A -geenin roolista paksuuskasvun säätelyssä. Linjaa vaivasi kuitenkin hieman huono itävyys; vain neljä kymmenestä siemenestä iti kasvatusmaljalla. Itäneiden kasvien juuret olivat kuitenkin viikon ikäisinä villi tyyppin kontrolliin nähden lähes saman pituisia ja kasvit olivat itäneet samaan aikaan Columbian kanssa.

Mutanttilinja *crf* B-1 iti hyvin, ja kasvien juuret olivat viikon ikäisinä samanpituisia villi tyyppin kontrollin kanssa. Kasvien juuret olivat kuitenkin 14,5 % (73,27 μm) ohuempia verrattuna villi tyyppin Columbia kontrolliin. Ero ei kuitenkaan ollut yhtä huomattava kuin *crf* A-2 -mutantissa, eikä se osoittanut tilastollisesti merkittävää tulosta t-testin avulla ($p > 0,05$). Mutanttilinja *crf* G-2 oli keskimäärin 58,16 μm paksumpi Columbiaan nähden. Tilastollisesti paksuus ei kuitenkaan ollut merkittävä ($p > 0,05$). (Taulukko 9) Kyseiset mutanttilinjat antoivat kuitenkin viitteitä mahdollisesta roolista jälleen toiminnan säätelyssä.

Taulukko 9. *crf*-linjojen juurten paksuuksien suurimmat poikkeamat villi tyyppin linjaan verrattuna ja paksuuksien tilastollisesti merkittävä ero p-arvon avulla ilmaistuna.

col ka= 503,97 μm	Ero Columbian keskiarvoon	Ero %	p-arvo
<i>crf</i> A-2 ka= 347,41 μm	-156,56 μm	-31,1 %	0,102

<i>crf</i> B-1 ka= 430,70 µm	-73,27 µm	-14,5 %	0,7
<i>crf</i> G-2 ka= 562,13 µm	+58,16 µm	11,5 %	0,768

Huonosti itäneet linjat *crf* A-1, *crf* D-1, *crf* H-1 ja tuplamutantti *crf* G-1,D-3 eivät soveltuneet syvempään analyysiin epätasaisen ja huonon itämisen takia. Linjat olivat pienikasvuisia ja suurin osa siemenistä ei itänyt. Istutus toistettiin myöhemmin eri sterilisointimenetelmää käyttäen, mutta itämisongelmista ei päästy eroon. Pienikasvuisuuden ja huonon itävyyden voidaan ajatella liittyvän kasvien mahdolliseen fenotyyppiin. Toistuvat itämisongelmat viittaavat kuitenkin todennäköisemmin ikääntyneisiin siemeniin, joten linjojen luotettavaa analysointia varten tarvitaan tuoreempia siemeniä siementuotannon kasveista.

GUS-ekspression avulla saatiin selville *CRF* E ja *CRF* G geenien ilmentymisen koko juuressa, sekä yhden viikon, että kahden viikon näytteistä. Mutanttilinjat *crf* E-1 ja *crf* G-2 olivat paksuuskasvultaan villi tyyppin kokoisia tai hieman paksumpia, eroamalla vain maksimissaan 11,5 % Columbiasta. Tulokset viittasivat, ettei *CRF* E tai *CRF* G geneillä välttämättä ollut roolia jäljen säätelyssä ja muodostumisessa. GUS-ekspressio tuki näitä tuloksia näyttämällä, että johtosolukossa ilmentyvät *CRF* E ja *CRF* G geenit painottuvat sekundaarikasvun aikana nilan ja puusolukon puolelle. Tämän lisäksi juurikärjen takana oleva ensimmäinen ja spesifinen ilmentyminen painottui neljään perisyklin soluun. *CRF* E ja *CRF* G geenit eivät ilmene juuren jakautuvissa jälsisolukossa kahden viikon iässä, kun sekundaarikasvu on käynnistynyt. Itävyysongelmista johtuen, muita tutkittavia GUS-markkerigeenin sisältäviä linjoja ja niiden ilmentymistä ei päästy tarkemmin analysoimaan.

11 Opinnäytetyön luotettavuus

Opinnäytetyön toteutuksen ajan toimittiin tarkan suunnitelman mukaisesti edeten täsmällisesti ja täyttäen laboratoriapäiväkirjaa, johon oli dokumentoitu havainnot ja muut toteutukselle tärkeät yksityiskohdat myöhempää jäljitettävyyttä varten. Toteutettavaan tutkimukseen perehdyttiin perusteellisesti ja hankittiin riittävästi taustatietoa ja aikaisempaa tutkimusmateriaalia aiheesta. Tulokset tuotiin julki tehtyjen havaintojen perusteella ja raportoimme ne totuudenmukaisesti opinnäytetyön raportissa.

Laboratoriotyöskentelyssä on tärkeä huomioida luotettavat ja turvalliset työskentelytavat, joita työn aikana noudatettiin. Geneettisessä tutkimuksessa työskennellään steriileissä työolosuhteissa, jolloin on tärkeää huolehtia työpisteiden puhtaudesta ja suojata tutkimuskohteet kontaminaatiolta työskentelemällä puhtaassa laminaarissa, hanskat kädessä. T-DNA-insertion sisältämät kasvinlinjat olivat siirtogeenisiä, joten kasvien kasvatuksessa sekä käsittelyssä noudatettiin asianmukaisia laboratorionkäytäntöjä ja ohjeita. Terveydelle haitallisten yhdisteiden kanssa työskenneltäessä noudatettiin yleisiä turvallisuutta edistäviä ohjeita työskentelemällä vetokaapissa ja noudattamalla tarvittavaa suojaruustusta.

Tulosten sisäistä valideettia parannettiin laboratoriomenetelmien käytön yhteydessä käyttämällä kontroleita reagenssien ja analyysilaitteiden toimivuuden varmistamiseksi. PCR-reaktioiden toimivuutta kontrolloitiin jokaisen geelierottelun yhteydessä tyhjän kontrollin avulla. Siementen käsittelyssä ja kasvien analysoimisessa verrattiin tuloksia aina olosuhteiden vakioimiseksi Columbia-kontrollin kasveihin. Columbia-kontrollit onnistuivat erittäin hyvin ja lähes poikkeuksetta joka kokoelmassa. Ensimmäisessä *crf*-kokoelmassa Columbia-kontrolli iti hieman huonommin (6/10 kasvia), mutta yleisesti villi tyyppiin kontrollit tuottivat erittäin vähän hajontaa jokaisessa erässä, mikä antoi luottoa käytetyille menetelmille ja kasvuolosuhteille.

Juurten fenotyypin tutkimisessa hyödynnettiin opinnäytetyössä osittain kvantitatiivisia ja kvalitatiivisia menetelmiä. Opinnäytetyön toteutuksen kannalta jälsisolukon säätelyn merkitystä mutanttilinjoissa arvioitiin ja mitattiin juurten keskimääräisen paksuuskasvun avulla. Juuren paksuus on pääasiassa sekundaarisen kasvun aikaansaamaa kasvua, eli jälsisolujen jakautumisen säätelemää toimintaa. Vertailemalla kasvien juurten paksuuksia histologisesti, pystyttiin luotettavasti arvioimaan jäljen aktiivisuuden vaikutusta yksittäisissä juurissa. Tämän lisäksi tarkasteltiin ja arvioitiin muita paksuuteen sidoksissa olevia kehitystekijöitä, kuten pituuskasvua ja itävyyttä, sekä kasvuolosuhteita, jotka vaikuttavat jäljen todelliseen aktiivisuuteen.

Yhtenä oleellisena keinona tulosten tarkastelussa oli kiinnitetty erityistä huomiota juurten paksuuden ja pituuden väliseen korrelaatioon. Juurten pituus ja paksuus muodostaa todellisuudessa monimutkaisen yhteyden ja tuloksista tehtävät johtopäätökset riippuvat siitä, koska juuren pituus on tarkalleen mitattu. Tuloksia pyrittiin yhtenäistämään mittaamalla juurten pituudet aina 7 vuorokauden iässä ja paksuudet 14 vuorokauden iässä. Pituuden ja paksuuden väliset riippuvuudet ja vertailut olivat kuitenkin lähinnä

suuntaa antavia, eivätkä antaneet tilastollisesti luotettavaa tietoa jäljen aktiivisuudesta. Luotettavien ja yhtenäisten tulosten saamiseksi, pituuskasvun mittaus 14 vuorokauden iässä olisi antanut vertailukelpoisempaa tietoa. Ideasta kuitenkin luovuttiin, sillä monissa maljoissa juurten pituuksia oli hankala arvioida 14 vuorokauden iässä, mikä olisi aiheuttanut tulkinnanvaraisuutta ja täten heikentänyt mittausten luotettavuutta.

Tulosten analysoimisessa käytettiin hyväksi lisäksi tilastollista t-testiä arvioimaan, oliko juurten paksuuksien keskiarvojen välillä tilastollisesti merkittävää eroa villi tyypin paksuuksiin nähden. Mutanttilinjojen kokonaisvaltaisessa analysoimisessa arvioitiin kuitenkin tilastollisen merkittävyyden lisäksi muun muassa linjojen yleistä itävyyttä ja pituuskasvun merkitystä tarkkailemalla tilastollisia analyysyjä linjojen paksuuksista ja arvioimalla kasvavuutta maljakuvista. Jatkotutkimuksen kannalta luotettavien ja hyödyllisten tutkimuslinjojen löytämistä varten kaikki nämä tekijät on otettava huomioon arvioitaessa kunkin tekijän painoarvoa.

Tutkimuksen toistettavuus on tärkeä arvioinnin kohde, kun tutkimuskohdetta on kuvailtu osittain laadullisilla menetelmillä. Yksittäinen tutkimus on käytännössä aina ainutlaatuinen ja täsmälleen samaan tulokseen on hyvin vaikea päästä. Jotta tutkimuksella olisi kuitenkin käytännön merkitystä tieteessä, tutkimuksen on oltava toistettava. Yhtenevät tulokset samoja tulkinnan periaatteita ja puolueettomia havainnointikeinoja käyttämällä, antavat viitteitä luotettavista tuloksista. (Vilkkä 2005: 158-160.) Jotta opinnäytetyössä saadut tulokset olisivat lituruohotutkimuksessa merkitykselliset, mielenkiintoiset linjat vaativat tarkempaa tutkimusta ja tässä raportissa esitetyt tutkimustulokset täytyy pystyä biologisesti toistamaan.

Tulosten luotettavuuteen vaikuttavat lisäksi muun muassa tulosten yleistettävyyys ja sisäinen pätevyys (Kankkunen – Vehviläinen-Julkunen 2010: 157-158). Yleistettävyyys liittyy otoskokoon vaikuttaviin tekijöihin. Jokaisesta istutetusta linjasta analysoitiin yhteensä kymmenen kasvin juurta, minkä ajateltiin olevan riittävän suuri otos. Analysoitavien siementen määrä kasvoi yhtä tutkittavaa kokoelmaa kohden yhteensä n. 200-500:n yksittäisen siemenen maljaamiseen, leikkaamiseen ja valokuvaamiseen.

Mutanttilinjojen juurten paksuuksissa esiintyvät selvät erot erottuivat riittävän luotettavasti jopa pienten aineistojen avulla. Siemenlinjat kärsivät kuitenkin paikoittain huonosta itävyydestä, mikä aiheutti paljon hajontaa otannan sisällä. Jotta tulokset edustavat tällöin riittävän luotettavasti koko perusjoukkoa, otoksen on oltava riittävän suuri. (Heik-

kilä 2001: 42-43.) Luotettavuuden parantamiseksi, pyrittiin ottamaan tuloksissa huomioon vain sellaisten linjojen tuloksia, joissa oli tilastollisesti pieni vaihteluväli juurten paksuuksien välillä. Huonosti itävissä linjoissa koko linjaa edustavat tulokset olivat jossain tapauksissa vain yhden kasvin juuren paksuuteen perustuvia mittaustuloksia. Tällaiset tulokset eivät ole koko perusjoukkoon luotettavasti yleistettäviä, eikä niitä tarkastella opinnäytetyössä merkittävinä löydöksinä.

Suuresta, analysoitavasta raakadatan määrästä johtuen on oletettavaa, että kaikkea aineistoa ei ole ajan puitteissa pystytty käymään läpi erittäin huolellisesti. Joissain linjoissa suljettiin välittömästi pois juurten paksuuksissa selvästi poikkeavat tulokset, eikä niitä huomioitu linjakohtaisia keskiarvoja laskiessa. On kuitenkin mahdollista, että osa keskiarvoihin mukaan lasketuista juurten paksuuksista oli peräisin sivujuurista, eivätkä tämän vuoksi anna luotettavaa tietoa juurten todellisesta paksuudesta. Sivujuurten mahdollisuuksia pyrittiin välttämään huomioimalla mahdollisimman pienen keskihajonnan paksuuksien kesken.

12 Eettisyys

Luonnon tarkastelu molekyyli-genetiikan kannalta keskittyy helposti pohtimaan erilaisia kehittämiskohteita ja tapoja parantaa ekosysteemin erinäisiä osia. Luontoa ja kasveja kehitetään ihmisten elämänlaadun parantamiseksi ja yleisen hyvinvoinnin tai vaurauden edistämiseksi. Kehittyvän geeniteknologian tieteenala tarjoaakin paljon mahdollisuuksia, mutta samalla lisää monialaisia uhkia ja pelkoja. Eettisten ongelmien äärellä on kuitenkin tärkeämpää pohtia erilaisia yhteiskunnallisia periaatteita, kuin arvioida näkökulmia muuntogeenisten tuotteiden ja eliöiden käytön hyväksymiselle. (Räikkä – Rossi 2002: 20-24.)

Luontoa ja ympäristöä koskevissa geenitutkimuksissa, esille nousee eettisiä ongelmia ja periaatteita, jotka ohjaavat ja perustelevat toimintaa. Elämän kunnioittamisen periaate perustuu kaiken biologisen elämän kunnioittamiseen ja säilyttämiseen. Tämän ajattelun perusteella orgaanista luontoa heikentävää toimintaa tulee välttää, niin että se ei vaaranna yksittäisten lajien olemassaoloa. Elämän kunnioittaminen asettaa eettisen perustan myös vahingon välttämisen periaatteelle, minkä painoarvoa geenitutkimuksessa pidetään yhtenä tärkeimmistä. Eettinen ajattelu pitää tärkeänä toimia sellaisella tavalla, joka ei aiheuta tarpeetonta vahinkoa ja räsitusta luontoa kohtaan.

Hyödyn maksimoimisen periaatteessa moraalisen toiminnan ohjeena käytetään tekniikan avulla saatuja tai tuotettuja hyötyjä toiminnan seurausten arvioimisessa. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että ihmiskunnan odotettavissa olevan hyödyn suhde on suurin mahdollinen siitä koituihin haittoihin nähden. Kasvien geneettisessä tutkimuksessa hyödyllä tarkoitetaan usein helposti mitattavissa olevia suureita, kuten menetelmien tehokkuutta ja tuottavuuden määrään. (Launis 2003: 32-44.)

Opinnäytetyön toteutusvaiheessa tutkittavalla laboratoriolla on geenimuunneltujen organismien (GMO) käsittelyä koskeva tutkimuslupa geenitekniikan lautakunnalta, jota on noudatettu kasvattamalla ja siirtämällä geenisiirrettyjä organismeja suljetuissa kasvihuoneissa tai tiloissa ja hävittämällä jätteet asiaan kuuluvalla tavalla erikseen tuhottavaksi muista jätteistä poiketen.

13 Pohdinta

Kasvien eri osat viestivät keskenään ja kehittyvät hyvin pitkälti ollessaan riippuvaisia toisista yksittäisistä osista. Tämä voi ilmentyä ehkäisevänä tai korvaavana vaikutuksena esimerkiksi menetetyn elimen tilalle kehittyvän korvaavan elimen muodostumisena. Korvautumisen lisäksi kasvien osilla voi olla toisen kehitystä edistäviä tai muuten muuttavia vaikutuksia. (Collander 1947: 45-49.) Tähän perustuen knock out -mutanttilinjojen tutkiminen ei ole täysin yksinkertaista. Yhden geenin puuttuminen voi laukaista reaktion, jolloin toinen geeni paikkaa puuttuvan ominaisuuden tai proteiinin muodostusta. Näin ollen yksittäisten geenien roolia kasvin fenotyypissä ei aina pystytä suoraviivaisesti määrittämään.

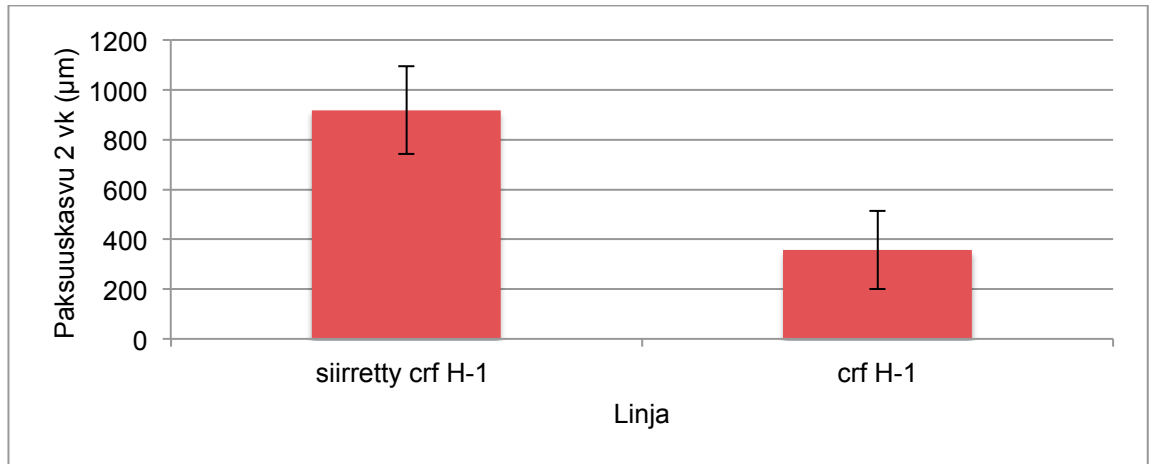
Lisäksi kasvit ovat hyvin herkästi reagoivia erilaisiin ympäristömuutoksiin. Tuloksien tulkinnassa mahdollisia virhelähteitä paksuuskasvien arvioimisessa aiheuttivat muun muassa itämisongelmat, maljoista mahdollisesti johtuvat vaihtelut linjojen välillä ja kasvuolosuhteiden vaihtelut esimerkiksi eri kasvatuskapeissa kasvatetuissa maljoissa.

Erityisen paljon itämiseen liittyviä vaikeuksia liittyi *crf*-linjojen analysoimiseen. Päätelimme, että itämisongelmat voisivat johtua esimerkiksi siementen vanhasta iästä, mitä ei kuitenkaan pystytty todistamaan. Emme olleet tietoisia, kuinka pitkään siemeniä oli säilytetty kantakeskuksessa. Kasvatimme huonosti itäneitä *crf*-mutanttilinjoja kolmessa

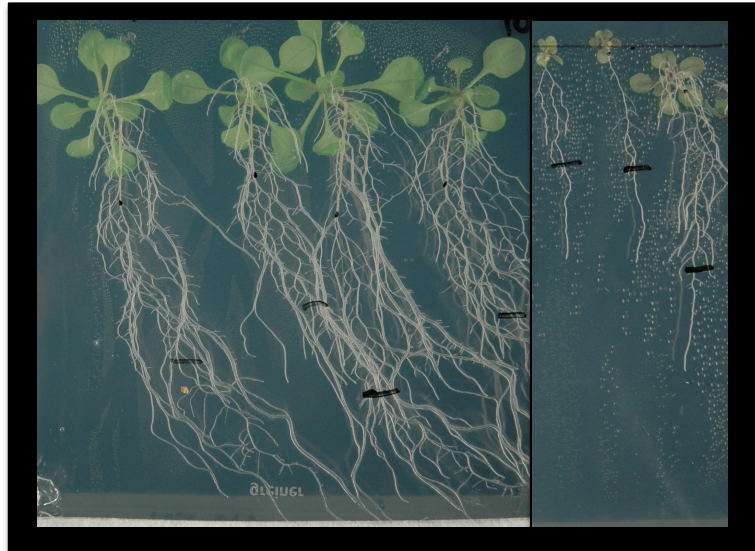
eri erässä ja eri sterilisaatiomenetelmillä, mutta sama ongelma toistui joka erässä. Tämä viittaisi vahvasti siihen, että huono ja epätasainen itäminen johtui siementen ikääntymisestä tai muusta vauriosta kuljetuksen aikana.

Pyrimme estämään kasvatusmaljoista johtuvat virhelähteet järjestämällä kasvukokeille niin yhteneväiset kasvuolosuhteet, kuin mahdollista. Valmistimme joka kokeelle oman erän kasvualustoja, jolla poistimme kokeiden sisäiset vaihtelut ja teimme joka linjalle oman kasvualustan sisäisen vaihtelun välttämiseksi. Toinen vaihtoehto olisi ollut satunnaistaa myös linjakohtaisesti kasvualustat, kasvattamalla samalla maljalla useaa linjaa ja Columbiata, jolloin mahdolliset alustakohtaiset muutokset olisivat tasanneet usealle eri linjalle tasaisesti ja niitä oltaisiin pystytty analysoimaan villi tyyppiä kasvien avulla. Päätelimme kuitenkin, ettei mahdollinen lisäsatunnaistaminen ollut meidän näytemäärälle mahdollista tai tarpeellista.

Satunnaisten maljojen reunoilla oli havaittavissa kuivumista ja joillekin maljoille oli siementen maljauksen yhteydessä ilmestynyt mikrobikontaminaatio, mikä näkyi kasvavana pesäkkeenä kasvatusmaljan pinnalla. Nämä kasvatusmaljaan liittyvät vaihtelut saattoivat osaltaan vaikuttaa yksittäisten linjojen kasvamiseen aiheuttaen stressiä maljalla kasvaville kasveille. Siirsimme yhdeltä kontaminoituneelta maljalta kaikki linjan kasvit uudelle, steriilille maljalle kasvamaan kymmenen päivän iässä, sillä kontaminaatio oli tullut keskelle maljaa ja alkoi selvästi häiritsemään kasvien kasvua. Siirretyt kasvit kasvoivat massiivisesti sekä pituutta, että paksuutta verrattuna saman linjan kasveihin, jotka jätettiin alkuperäiselle kasvualustalle. Molempien linjojen annettiin kasvaa yhteensä 20 päivää kasvatuskaapissa (kuvio 48 ja 49). Kasvien koossa olevia eroja ei pystytty selittämään, mutta löydökset tukevat teoriaa, jonka mukaan kasvit ovat monimutkaisia kokonaisuuksia.



Kuvio 48. Paksuuskasvuus *crf*-linjan kasveissa, jotka siirrettiin kontaminaation jälkeen uudelle kasvumaljalle verrattuna saman linjan kasveissa, jotka kasvoivat alkuperäisellä maljalla.



Kuvio 49. Vasemmalla *crf* H-1 kasvit 20 päivän ikäisinä siirrettyssä maljassa ja oikealla *crf* H-1 linjan kasveja alkuperäisellä maljallaan 20 päivän ikäisinä. Kuvat on otettu samalta etäisyydeltä.

Pyrimme välttämään kasvuolosuhteista johtuvia virhelähteitä tuloksissa kasvattamalla siemeniä kasvatiskaapissa mahdollisimman satunnaisessa järjestyksessä. Lisäksi suljimme maljat keskenään samalla tavalla käyttämällä hengittävää, huokoista teippiä kuivuuden välttämiseksi. Eri erissä istutetut siemenet kasvoivat kuitenkin eri kaapeissa tilan puutteen vuoksi. Useissa maljoissa kasvien juuret alkoivat kasvamaan lievästi vinoon oikealle puolelle, mikä saattaisi selittyä esimerkiksi epätasaisesti maljalle tulevan valon määrästä.

Genotyypityksessä kokeilimme kahta eri menetelmää DNA-näytteen osalta. Alkuperäisen suunnitelman mukaan yhdistimme DNA:n eristystä varten lehtinäytteitä viidestä kasvista, ja eristimme DNA:n mikrosentrifuugiputkessa. Ajoimme PCR-monistuksen ja elektroforeesierottelun K2 kokoelman kahdeksasta mutanttilinjasta tällä menetelmällä. Tuloksista tunnistimme kolme homotsygoottia linjaa, jotka olimme jo antibioottisegregaation avulla todenneet homotsygootiksi. Menetelmällä emme kuitenkaan pystyneet tunnistamaan luotettavasti kuin kaksi heterotsygoottia linjaa viidestä. Tämän takia vaihdoimme DNA:n eristysmenetelmää toteutuksenmukaiseksi, eli eristimme mutanttilinjasta kolmesta viiteen yksilöä erillisiksi näytteiksi, jonka avulla saimme tunnistettua antibioottisegregaation mukaiset heterotsygootit linjat oikein.

Toteutuksessa käytetty DNA-eristys tarkoitti kuitenkin sitä, että viiden lehden sijaan meillä oli vain yksi lehti näytettä kohden, joten eristetyn DNA:n määrä oli huomattavasti pienempi verrattuna alkuperäiseen menetelmään. Tämän takia mittasimme DNA-pitoisuudet alkuperäisistä viiden lehden näytteistä sekä uusista yhden lehden näytteistä jonka avulla saimme PCR-monistuksen optimoitua toteutusta varten. DNA-pitoisuudet mitattiin Nano Drop -laitteella spektrofotometrisesti 260nm aaltopituudella. DNA-pitoisuudet olivat yhden lehden näytteissä huomattavasti matalampia, joten laimensimme myös villi tyypin kontrollia tulevia PCR-monistuksia varten. DNA-pitoisuusmittauksien tulokset on esitelty liitteessä 2.

Useamman insertion linjoissa meillä oli kuitenkin edelleen hankaluuksia lähinnä T-DNA-insertiolle spesifisten tuotteiden kanssa. Suurimman osan T-DNA-insertiotuotteista löysimme kuitenkin muuttamalla templaatin määrää PCR-ajossa, poikkeuksena tästä on K1-linja, josta emme onnistuneet tuottamaan T-DNA-insertiotuotetta. Mielestämme eri menetelmien testaukset toivat loppujen lopuksi luotettavan menetelmän mutanttilinjojen genotyypitykseen, varsinkin kuin yhdistimme PCR-tulokset segregaatiotulosten kanssa.

K-linjoissa meillä oli käytössä kolme useamman insertion linjaa, mikä vaikeutti erityisesti antibioottisegregaation selvää tulkitsemista. Useamman insertion linjoissa tulosten oleellisuutta oli vaikea arvioida luotettavasti, sillä emme pystyneet käyttämillämme alukkeilla määrittämään, ovatko linjat toisten insertioiden suhteen homotsygootteja vai heterotsygootteja. Tästä johtuen oli mahdotonta sanoa, millä geenillä oli kasvin fenotyyppiin ja edelleen paksuuskasvuun liittyvää merkitystä.

Välitimme opinnäytetyön tulokset eteenpäin julkaisemalla tulokset Mähösen tutkimusryhmälle 9.4.2015. Jatkotutkimuksia varten tiedon välittäminen lituruohon jälsisolukon tutkijoille vaikutti parhaimmalta vaihtoehdolta. Työn suorituksen aikana kiinnitimme erityisesti huomiota siihen, että opinnäytetyön tuloksia voitaisiin helposti toistaa ja jatkaa. Kasvatimme kaikista mutanttilinjoista ja GUS-linjoista kasveja siementuotantoa varten. Tämä mahdollistaa Mähösen tutkimusryhmälle uuden erän tuoreita siemeniä jatkotutkimuksia varten. Lisäksi keräsimme *crf*-mutanttilinjoista RNA-näytteitä, jotka pakastettiin laboratorion tiloihin mahdollisia jatkotutkimuksia varten. Saatujen tuloksien ansiosta lupaavia mutanttilinjoja voidaan alkaa tutkia tarkemmin ja selvittää geenien roolia kasvun säätelyssä.

Sen lisäksi, että löysimme lupaavia ehdokkaita jälsitutkimuksen kannalta, törmäsimme myös muihin mahdollisiin fenotyyppeihin, joilla voi olla käyttöä muissa tutkimusryhmissä. Kaksi L-kokoelman linjaa: L16 ja L17 kasvoivat saman paksuisiksi kuin villi tyyppiin Columbia kontrolli, mutta linjoille oli ominaista erittäin lyhyet sivujuuret verrattuna villi tyyppiin (kuvio 50). Osasyynä ilmiöön voi olla stressiperäinen mukautuminen epäsuotuisaan kasvuympäristöön. Maljat oli kuitenkin valmistettu samassa erässä, eikä niiltä löytynyt kontaminaatioita.



Kuvio 50. Vasemmalla L16-linja, keskellä L17-linja ja oikealla villi tyyppi kuvattuna kasvumaljoilla kahden viikon ikäisinä.

GUS-linjat ja *crf*-mutanttilinjat edistivät *CRF*-geenien tutkimusta, ja onnistuimme opinnäytetyön avulla tuomaan esille uutta tietoa *CRF*-geenien ilmentymisestä lituruohon juuressa. Vahvistimme myös aiempien tutkimuksien tuloksia lehtisolukon ilmentymisen suhteen. Mutanttilinjojen tutkimista joudutaan kuitenkin vielä jatkamaan huonosti itäneiden linjojen suhteen kunhan siementuotannon kasvit alkavat tuottamaan itäviä siemeniä.

Opinnäytetyö Mähösen tutkimusryhmässä tuotti halutun tuloksen. Tavoitteemme oli seuloa mutanttilinjoja, joilla olisi rooli jälleen säätelyssä ja kehityksessä. Tulosten perusteella meillä on lupaavia uusia geenejä, joiden toimintaa ja ilmentymistä voisi tutkia, ja opinnäytetyömme toimi tärkeänä ensimmäisenä askeleena tässä prosessissa. Lopuksi haluaisimme kiittää Ari Pekka Mähösen tutkimusryhmää sujuvasta yhteistyöstä ja asiantuntevasta ohjauksesta opinnäytetyön aikana.

Lähteet

Blomster, Tiina – Mähönen, Ari-Pekka. 2013. Lituruohon juuren jälsisolukon molekyyli-biologinen tutkimus. Luonnon tutkija 4/2013. Lehtiartikkeli.

Blomster, Tiina 2015. Kasvibiologi. Helsinki. Suullinen ja kirjallinen tiedonanto 13.1.2015.

Clough, Steven J. – Bent, Andrew F. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* (1998) 16(6), 735–743. Verkkodokumentti. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x/pdf>> Luettu 2.12.2014.

Collander, Runar 1947. Kasvifysiologian perusteet: II. Kehitys, periytyminen ja liikkeet. Helsinki: Otava.

Dolan, Liam – Janmaat, Kees – Linstead, Paul – Poethig, Scott – Roberts, Keith – Scheres, Ben – Willemsen, Viola. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* vol 119, 71-84. Verkkodokumentti. <<http://dev.biologists.org/content/119/1/71.short>> Luettu 11.1.2015.

Duodecim. 2010. Mikrobiologia. Verkkodokumentti. <http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_selaus=15355> Luettu 2.12.2014.

Gaetano, Justin 2013. Holm-Bonferroni Sequential Correction: An Excel Calculator. Verkkodokumentti. <http://www.researchgate.net/publication/236969037_Holm-Bonferroni_Sequential_Correction_An_EXCEL_Calculator>. Luettu 14.4.2015.

Heikkilä, Tarja 2001. Tilastollinen tutkimus. 3. painos. Helsinki: Edita.

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

Häggman, Hely. 1998. Geenitekniikkatutkimus pohjana metsäpuiden molekyylijalostukselle. *Metsätieteen aikakauskirja* 2/1998. Verkkodokumentti. <<http://www.metla.fi/aikakauskirja/full/ff98/ff982235.pdf>> Luettu 2.12.2014.

Jefferson, Richard – Kavanagh, Tony – Bevan, Michael 1987. GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* vol. 6 no.13 pp.3901-3907. 1987. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC553867/>> Luettu 2.12.2014.

Jouannet, Virginie – Brackmann, Klaus – Greb, Thomas 2014. (Pro)cambium formation and proliferation: two sides of the same coin? *Current Opinion in Plant Biology* 2015, 23:54-60. Luettavissa myös elektronisesti <<http://ac.els-cdn.com/S1369526614001447/1-s2.0-S1369526614001447->

main.pdf?_tid=207bf4ea-be8a-11e4-89af-00000aab0f6c&acdnat=1425046298_0b3dfa8e30d91c6069c498820c8ac4f9>

Kankkunen, Päivi – Vehviläinen-Julkunen, Katri 2010. Tutkimus hoitotieteessä. 1.-2. painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Krysan, Patrick – Sussman, Michael – Young, Jeffery. 1999. T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. *The Plant Cell*, vol 1, 2238-2290. American society of Plant Physiologists. Verkkodokumentti.

<<http://www.plantcell.org/content/11/12/2283.full>> Luettu 28.12.2014.

Kärkkäinen, Matti 2003. Puutieteen perusteet. Helsinki: Metsäkustannusosakeyhtiö Metsälehti.

Launis, Veikko – Räikkä, Juha (toim.) 1997. Geenit ja etiikka. Helsinki: Edita Oy.

Launis, Veikko 2003. Geenitekniologia, arvot ja vastuu. Helsinki: Gaudeamus Kirja Oy.

Lesk, Arthur 2004. Introduction to Bioinformatics. New York: Oxford University Press Inc.

Matsumoto-Kitano, Miho – Kusumoto, Takami – Tarkowski, Petr ym. 2008. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 105 no. 50. 20027-20031.

Miyashima, Shunsuke – Sebastian, Jose – Lee, Ji-Young – Helariutta, Ykä 2013. Stem cell function during plant vascular development. *The EMBO Journal* 2, 2013. Vol 32:178-193. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23169537>>.

Mähönen, Ari Pekka 2005. Cytokinins Regulate Vascular Morphogenesis in the Arabidopsis thaliana root. Väitöskirja. Helsinki: Helsingin yliopisto.

Nieminen, Kaisa – Kauppinen, Leila – Helariutta, Ykä. 2004. A Weed for Wood? Arabidopsis as a Genetic Model for Xylem Development. *American Society of Plant Biologists*. Verkkodokumentti. <<http://www.plantphysiol.org/content/135/2/653>> Luettu 2.12.2014.

O'Malley, Ronan – Ecker, Joseph 2010. Linking genotype to phenotype using the Arabidopsis unimutant collection. *The Plant Journal* (2010): 61. 928-940.

Palva, Tapio 2001. Koivun perimän salat avautuvat. Teoksessa Rydman, Jan (toim.): Tiede ja elämä – Tieteen päivät 2001. Helsinki: Tieteellisten seurain valtuuskunta. 43-52.

Pyykkö, Maire 1979. Kasvianatomia. 3. painos. Helsinki: Oy Gaudeamus Ab.

Räikkä, Juha – Rossi, Kaija 2002. Geenit ja etiikka: Kysymyksiä uuden geenitekniologian arvoista. Helsinki: WSOY.

Sehr, Eva – Agustí, Javier – Lehner, Reinhard – Farmer, Edward – Schwarz, Martina – Greb, Thomas 2010. Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot

reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. Verkkodokumentti <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2988407/pdf/tpj0063-0811.pdf>>. Luettu 26.12.2014.

SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. 2013. Verkkodokumentti. <<http://signal.salk.edu/>>. Luettu 22.02.2015.

Solunetti 2006. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/etusivu/>>. Luettu 10.1.2015.

Suomen luontaisia puulajeja. 2011. UPM Metsä. Verkkodokumentti. <https://www.metsamaailma.fi/fi/ForestInformation/ForestLibrary/Documents/Metsiemme_Puita_UPM_opasvihko.pdf>. Luettu 27.12.2014.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Tamarin, Robert 2002. Principles of Genetics. New York: The McGraw Companies. 7th edition.

The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Verkkodokumentti. <<http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/full/408796a0.html#f2>>. Luettu 26.9.2014.

The Arabidopsis Information Resource 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>>. Luettu 25.9.2014.

Thornycroft, David – Sherson, Sarah – Smith, Steven 2001. Using gene knock-outs to investigate plant metabolism. Journal of Experimental Botany, Vol. 52, No. 361. 1593-1601. Verkkodokumentti. <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/52/361/1593.full.pdf+html>> Luettu 20.03.2015.

Tilastokeskus 2013. Verkkodokumentti. <<http://www.tilastokeskus.fi>> Luettu 29.11.2014.

Vilka, Hanna 2005. Tutki ja kehitä. 1.-2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Watson, James D. – Gilman, Michael – Witkowski, Jan – Zoller, Mark 1998. Recombinant DNA. Seventh printing. New York: W. H. Freeman and Company.

Zhang, Jing – Elo, Annakaisa – Helariutta, Ykä. 2011. Arabidopsis as a model for wood formation. Verkkodokumentti. <http://www.planta.cn/forum/files_planta/science_174.pdf> Luettu 2.12.2014.

Zwack, Paul J. – Shi, Xiuling – Robinson, Bruce R. – Gupta, Sarika – Compton, Margaret A. – Gerken, Dana M. – Goertzen, Leslie R. – Rashotte, Aaron M. 2012. Vascular Expression and C-Terminal Sequence Divergence of Cytokinin Response Factors in Flowering Plants. Plant Cell Physiology 2012 Oct;53(10):1683-95.

Analysoitavien linjojen mittaustulokset

crf erä I

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
crf A-2	1	1,193		1	319,284	
	2	1,214		2	399,742	
	3	1,758		3	323,201	
		ka 1,388	SD 0,320		ka 347,409	SD 45,364

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
crf B-1	1	2,717		1	389,988	
	2	2,822		2	387,674	
	3	3,047		3	414,528	
	4	2,819		4	422,160	
	5	3,130		5	428,320	
	6	2,237		6	483,864	
	7	3,000		7	423,252	
	8	2,890		8	485,784	
	9	2,496		9	461,172	
	10			10	410,257	
		ka 2,795	SD 0,282		ka 430,700	SD 35,137

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
crf C-2	1	2,766		1	517,484	
	2	3,229		2	520,636	
	3	3,309		3	430,969	
	4	2,981		4	538,851	
	5	2,542		5	347,657	sama juur A
	6	3,417		6	346,578	sama juur A
	7	2,838		7	464,658	
	8	3,156		8	384,610	sama juur B
	9	2,383		9	395,153	sama juur B
	10	2,286		10	417,177	
				11	397,369	
				12	461,382	
		ka 2,891	SD 0,396	x2 Juur. liikaa	ka 435,210	SD 65,935

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
crf D-3	1	2,295		1	292,603	
	2	2,563		2	509,803	
	3	2,272		3	595,388	
	4	2,315		4	568,772	
	5	2,398		5	386,821	
	6	1,215		6	562,735	
	7	2,824		7	463,350	
		ka 2,269	SD 0,504		ka 482,782	SD 110,266

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
col (wt)	1	2,894		1	492,604	
	2	2,850		2	639,540	
	3	3,610		3	483,144	
	4	3,064		4	392,508	
	5	2,168		5	512,032	
	6	2,716		6		
		ka 2,884	SD 0,469		ka 503,966	SD 88,644

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf E-1	1	3,604		1	565,984			
	2	2,623		2	650,743			
	3	3,188		3	544,284			
	4	1,291		4	542,473			
	5	3,417		5	533,250			
	6	3,162		6	427,399			
	7	3,451		7	480,215			
	8	2,899		8	571,077			
	9	3,100		9	394,411			
	10	2,414		10				
	ka	2,915	SD	0,680	ka	523,315	SD	78,198

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf F	1	2,795		1	437,006			
	2	2,808		2	622,014			
	3	2,068		3	638,369			
	4	2,921		4	562,714			
	5	3,276		5	466,160			
	6	2,789		6	496,446			
	7	3,014		7	662,269			
	8	2,893		8	424,282			
	9	2,444		9	534,211			
	10	2,786		10	461,652			
	ka	2,779	SD	0,326	ka	530,512	SD	87,234

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf G-2	1	3,032		1	581,927			
	2	2,716		2	672,050			
	3	2,672		3	475,042			
	4	2,364		4	501,237			
	5	2,238		5	727,824			
	6	3,069		6	564,613			
	7	2,569		7	500,750			
	8	2,765		8	502,478			
	9	2,729		9	520,148			
	10	2,697		10	575,214			
	ka	2,685	SD	0,257	ka	562,128	SD	81,980

crf 20pv

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf A-1	1	1,193		1	687,210			
	2	1,214		2	567,904			
	3	1,758		3				
	ka	1,388	SD	0,320	ka	627,557	SD	84,362

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf D-1	1	1,081		1	482,776			
	ka	1,081	SD	0	ka	482,776	SD	0

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf H-1	1	0,668		1	187,382			
	2	0,157		2	462,025			
	3	1,017		3	197,699			
	4	1,294		4	401,228			
	5			5	537,185			
+ 1 myöh. itänyt kasv.	ka	0,784	SD	0,490	ka	357,104	SD	157,797

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf H-1 Transf	1	3,138		1	919,667			
	2	2,648		2	1116,234			
	3	3,470		3	951,640			
	4	2,646		4	687,430			
Siirr. uudelle malj. kont. takia	ka	2,976	SD	0,403	ka	918,743	SD	176,627

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf G-1, D-3	1	1,058		1	424,256			
	2	0,403		2	250,768			
	3			3	269,114			
+ 1 myöh. itänyt kasv.	ka	0,731	SD	0,463	ka	314,713	SD	95,310

crf erä III 14pv

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf A-1	1	1,803		1	241,207			
	2	2,463		2	252,412			
	3	1,232		3	114,356	late		
	4			4	257,897			
+ 1 myöh. itänyt kasv.	ka	1,833	SD	0,616	ka	216,468	SD	68,428

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf D-1	1	0,737		1	74,886			
	2	2,232		2	109,741			
	3	2,307		3	304,979			
	4	0,903		4	296,071			
	5			5	87,747			
+ 1 myöh. itänyt kasv.	ka	1,545	SD	0,840	ka	174,685	SD	115,593

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf H-1	1	0,909		1	178,361			
	2	1,215		2	64,239	late		
	3	1,037		3	192,345			
	4			4	282,964			
+ 1 myöh. itänyt kasv. + kont. 4mm	ka	1,054	SD	0,154	ka	179,477	SD	89,733

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
crf G-1, D-3	1	1,418		1	59,718			
	2	0,391		2	151,246			
	3	1,563		3	307,246			
	4	0,941		4	165,032			
+ 1 pien. kasv.	ka	1,078	SD	0,530	ka	170,811	SD	102,262

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
col (wt)	1	2,090		1	413,004			
	2	3,041		2	440,800			
	3	3,419		3	410,894			
	4	2,829		4	361,704			
	5	2,695		5	379,698			
	6	2,502		6	329,401			
	7	3,348		7	365,525			
	8	1,814		8	400,450			
	ka	2,717	SD	0,569	ka	387,685	SD	35,438

Gabi

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
col (wt)	1	3,332		1	417,514			
	2	3,232		2	426,338			
	3	2,744		3	362,381			
	4	2,545		4	399,132			
	5	2,550		5	470,854			
	6	2,924		6	528,539			
	7	1,970		7	433,862			
	8	2,280		8	460,042			
	9	2,888		9	429,701			
	10	2,066		10	451,906			
	ka	2,653	SD	0,460	ka	438,027	SD	44,505

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
K1.2	1	2,634		1	659,581			
	2	2,997		2	305,220			
	3	4,081		3	539,246			
	4	3,553		4	757,515			
	5	3,481		5	654,577			
	6	2,975		6	418,245			
	7	3,159		7	555,696			
	8	2,933		8	545,397			
	ka	3,227	SD	0,457	ka	554,435	SD	143,076

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
K2.4	1	3,479		1	630,857			
	2	3,788		2	369,302			
	3	3,537		3	585,068			
	4	3,214		4	566,743			
	5	3,689		5	516,614			
	6	3,273		6	443,219			
	7	3,442		7	417,770			
	8	3,682		8	496,273			
	9	3,435		9	506,018			
	10	3,446		10	428,866			
	ka	3,499	SD	0,182	ka	496,073	SD	82,405

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
K3.2	1	3,733		1	589,029			
	2	2,709		2	557,368			
	3	3,094		3	485,834			
	4	2,828		4	281,166			
	5	3,871		5	434,231			
	6	3,727		6	373,805			
	7	2,141		7	356,955			
	8	3,239		8	439,454			
	9	2,217		9	552,215			
	10	3,709		10	577,724			
	ka	3,127	SD	0,641	ka	464,778	SD	105,434

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
K3.3	1	2,087		1	637,608	
	2	3,526		2	174,140	poistettu ka
	3	1,301		3	692,259	
	4	3,114		4	454,956	
	5	3,592		5	524,459	
	6	2,000		6	623,056	
	7	2,782		7	319,969	

	8	3,280		8	347,051	
	9	2,958		9	344,330	
	10	2,188		10	401,577	
	ka	2,683	SD	0,756	ka	482,807
					SD	141,745

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
K3.7	1	3,589		1	548,055	
	2	2,108		2	439,792	
	3	4,539		3	560,918	
	4	4,084		4	350,880	
	5	4,266		5	409,625	
	6	2,266		6	668,812	
	7	3,214		7	564,859	
	8	2,779		8		
+ 1 pien. kasv.	ka	3,356	SD	0,919	ka	506,134
					SD	109,917

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
K3.8	1	2,162		1	344,117	
	2	3,288		2	385,146	
	3	1,673		3	294,172	
	4	2,462		4	373,144	
	5	2,933		5	384,296	
	6	2,809		6	344,819	
	7	2,428		7	318,092	
	8	3,098		8	383,375	
	9	2,358		9	394,237	
	10			10		
	ka	2,579	SD	0,504	ka	357,933
					SD	34,727

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
K4.12	1	4,063		1	394,935	
	2	0,873		2	204,729	
	3	0,721		3	610,319	
	4	2,991		4	480,379	
	5	2,068		5	444,778	
	6	3,197		6	144,142	
	7	0,435		7	59,157	
	ka	2,050	SD	1,415	ka	334,063
					SD	200,856

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
K5.4	1	3,706		1	231,618	
	2	0,895		2	352,265	
	3	1,219		3	512,891	
	4	0,965		4	806,688	
	5	3,711		5	241,345	
	ka	2,099	SD	1,474	ka	428,961
					SD	239,660

Salk set 1

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L1	1	2,025		1	459,433	
	2	2,886		2	389,316	
	3	0,371		3	328,667	
	4	2,960		4	388,896	
	5	2,991		5	339,452	
	6	2,619		6	425,948	
	7	2,256		7	328,439	
	8	2,392		8	477,139	
	ka	2,313	SD	0,859	ka	392,161
					SD	58,282

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L2	1	2,205		1	420,280	
	2	2,420		2	515,595	
	3	1,622		3	416,015	
	4	2,718		4	430,366	
	5	2,669		5	280,019	
	6	3,109		6	420,494	
	7	2,441		7	319,839	
		ka 2,455	SD 0,466		ka 400,373	SD 77,666

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L3	1	2,959		1	486,764	
	2	2,242		2	427,672	
	3	2,257		3	279,573	
	4	1,409		4	422,033	
	5	2,043		5	440,093	
	6	2,560		6	363,016	
	7	2,458		7	267,474	
	8	1,788		8	336,763	
	9	2,088		9	480,101	
	10	2,234		10	535,229	
kasv.lehd.liila.kelt.		ka 2,204	SD 0,423		ka 403,872	SD 89,674

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L4	1	2,997		1	422,187	
	2	1,892		2	384,444	
	3	2,522		3	479,276	
	4	1,546		4	359,045	
	5	2,560		5	544,966	
	6	2,165		6		
		ka 2,280	SD 0,520		ka 437,984	SD 74,996

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L5	1	1,182		1	370,345	
	2	3,528		2	410,347	
	3	1,485		3	830,138	
	4	0,995		4	405,759	
	5	2,194		5	260,180	
	6	0,994		6	401,454	
	7	2,319		7	428,879	
	8	1,229		8	306,081	
	9	0,942		9	570,521	
+1 pien.kasv. kasv.lehd.liila.kelt.		ka 1,652	SD 0,870		ka 442,634	SD 168,806

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L6	1	0,791		1	528,597	
	2	2,859		2	373,895	
	3	2,775		3	243,273	
	4	2,380		4	457,233	
	5	2,663		5	419,097	
	6	3,165		6	432,983	
	7	1,632		7	452,687	
	8	3,583		8	613,662	
	9	2,647		9	499,160	
	10	2,561		10		
		ka 2,506	SD 0,786		ka 446,732	SD 103,148

Liite 1
7 (14)

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L7	1	3,859		1	474,323	
	2	3,069		2	402,546	
	3	4,089		3	453,656	
	4	4,197		4	485,365	
	5	4,266		5	394,076	
	6	4,136		6	522,270	
	7	3,546		7	529,917	
	8	3,916		8	430,113	
	9	2,711		9	521,358	
	10	2,809		10	425,075	
	ka	3,660	SD 0,592		ka 463,870	SD 50,585

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L8	1	3,792		1	631,476	
	2	4,609		2	453,350	
	3	3,441		3	376,176	
	4	3,976		4	377,648	
	5	2,183		5	538,009	
	6	4,845		6	366,205	
	7	3,445		7	473,148	
	8	4,066		8	435,556	
	9	3,557		9	544,720	
	10	3,396		10		
	ka	3,731	SD 0,737		ka 466,254	SD 90,647

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L9	1	2,699		1	479,149	
	2	3,016		2	357,639	
	3	4,009		3	426,195	
	4	2,866		4	476,575	
	5	3,065		5	619,973	
	6	3,849		6	648,923	
	7	2,282		7	448,868	
	8	3,167		8	477,660	
	9	1,623		9		
	10	3,559		10		
	ka	3,014	SD 0,715		ka 491,873	SD 96,993

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L10	1	2,869		1	420,206	
	2	3,271		2	541,680	
	3	3,514		3	549,180	
	4	3,389		4	605,177	
	5	2,053		5	461,310	
	6	3,091		6	405,167	
+1 pien.kasv.	ka	3,031	SD 0,530		ka 497,120	SD 80,032

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L11	1	2,363		1	536,122	
	2	3,926		2	459,723	
	ka	3,145	SD 1,105		ka 497,923	SD 54,022

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L12	1	3,667		1	461,109	
	2	3,408		2	624,348	
	3	4,111		3	544,406	
	4	2,706		4	450,504	
	5	3,068		5	531,791	
	6	1,668		6	474,791	
	7	3,165		7	685,125	
	8	2,654		8	300,334	
	9	2,723		9		
+1 pien.kasv. 2mm kelt.kont.malj.		ka 3,019	SD 0,701		ka 509,051	SD 117,428

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L13	1	3,336		1	279,640	
	2	1,172		2	647,256	
	3	3,486		3	611,014	
	4	3,425		4	415,039	
	5	3,447		5	580,596	
	6	2,077		6	483,067	
	7	3,649		7	517,056	
	8	4,045		8	569,474	
	9	2,364		9	541,948	
+1 pien.kasv.		ka 3,000	SD 0,925		ka 516,121	SD 112,420

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L14	1	3,526		1	356,388	
	2	3,363		2	491,237	
	3	4,083		3	689,988	
	4	4,236		4	634,655	
	5	2,105		5	465,048	
	6	3,192		6	343,868	
	7	2,191		7	655,312	
	8	3,243		8	538,567	
	9	3,092		9	507,926	
	10	3,030		10		
		ka 3,206	SD 0,687		ka 520,332	SD 123,733

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L15	1	2,083		1	621,214	
	2	0,772		2	435,834	
	3	3,552		3		
	4	3,142		4		
	5	1,534		5		
	6	3,381		6		
+3 myöh.itä.kasv.		ka 2,411	SD 1,126	Näyt.laat.huo.	ka 528,524	SD 131,083

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L16	1	3,087		1	523,289	
	2	3,819		2	498,820	
	3	3,289		3	529,953	
	4	3,713		4	579,219	
	5	2,934		5	265,753	
	6	3,551		6	646,101	
	7	3,261		7	515,786	
	8	2,673		8	647,087	
	9	2,727		9	608,694	
	10	1,487		10	536,981	
lyh.sivujuu.?		ka 3,054	SD 0,674		ka 535,168	SD 108,848

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
L17	1	3,232		1	417,089			
	2	3,467		2	485,993			
	3	2,029		3	478,473			
	4	3,998		4	478,537			
	5	3,867		5	637,391			
	6	4,099		6	682,809			
	7	3,816		7	446,046			
	8	3,021		8	579,918			
	9	3,240		9	627,052			
+1 myöh.itä.kasv. lyh.sivujuu.?	ka	3,419	SD	0,644	ka	537,034	SD	95,777

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
L18	1	3,278		1	466,176			
	2	2,995		2	120,088	sivujuuri, ei ka		
	3	2,293		3	547,431			
	4	3,468		4	676,255			
	5	4,074		5	425,119			
	6	3,651		6	535,660			
	7	3,624		7	496,375			
	8	2,525		8	525,972			
	9	3,399		9	644,418			
	10	3,029		10	536,184			
	ka	3,234	SD	0,538	ka	539,288	SD	79,294

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
col_set I (wt)	1	3,412		1	646,780			
	2	3,662		2	466,528			
	3	3,582		3	569,863			
	4	3,796		4	566,675			
	5	3,787		5	555,577			
	6	3,812		6	550,576			
	7	3,177		7	523,282			
	8	3,259		8	562,312			
	9	3,686		9	604,495			
	10	3,323		10	541,519			
	ka	3,550	SD	0,238	ka	558,761	SD	47,349

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
L19	1	4,161		1	630,363			
	2	4,314		2	542,682			
	3	3,728		3	484,591			
	4	4,586		4	665,037			
	5	1,288		5	707,491	leik.laat.huo		
	6	3,101		6	599,045			
	7	2,943		7	210,036	sivujuuri?		
	8	2,086		8	854,272			
	9	3,043		9	452,522			
+1 myöh.itä.kasv.	ka	3,250	SD	1,080	ka	571,782	SD	181,873

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
L20	1	3,647		1	572,943			
	2	4,080		2	195,929	poistettu ka		
	3			3	639,884			
+1 myöh.itä.kasv.	ka	3,864	SD	0,306	ka	606,414	SD	47,334

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
L21	1	4,520		1	612,077	
	2	3,186		2	657,317	
	3	2,641		3	596,081	
	4	4,283		4	494,111	
	5	3,697		5	730,584	
	6	3,760		6	622,213	
	7	3,674		7	583,968	
	8	3,595		8	652,471	
	9	3,303		9	609,935	
	10	3,746		10	576,792	
		ka 3,641	SD 0,531		ka 613,555	SD 61,477

Salk set II

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M22	1	2,255		1	330,182	
	2	1,547		2	359,617	
	3	1,236		3	425,077	
	4	2,242		4	362,183	
	5	2,554		5	322,334	
	6	1,953		6	275,748	
	7	0,887		7	235,377	
	8	2,243		8	350,990	
+1 pien.kasv.		ka 1,865	SD 0,582		ka 332,689	SD 57,683

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M23	1	1,582		1	221,584	
	2	1,745		2	382,489	
	3	1,950		3	450,304	
	4	1,941		4	384,705	
	5	1,561		5	256,695	
	6	3,040		6	320,729	
		ka 1,970	SD 0,550		ka 336,084	SD 86,270

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M24	1	2,930		1	452,349	
	2	2,879		2	390,471	
	3	2,705		3	360,339	
	4	3,276		4	333,572	
	5	2,490		5	323,882	
	6	3,119		6	310,947	
	7	3,210		7	319,205	
	8	2,050		8	285,040	
	9	2,371		9	265,291	
	10	2,469		10	364,831	
		ka 2,750	SD 0,402		ka 340,593	SD 54,136

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M25	1	2,915		1	276,929	
	2	2,511		2	398,689	
	3	3,236		3	421,393	
	4	1,688		4	238,372	
	5	2,314		5	309,919	
	6	1,841		6	295,437	
	7	1,917		7	338,913	
	8	1,936		8	474,740	
		ka 2,295	SD 0,556		ka 344,299	SD 80,422

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M26	1	1,996		1	509,679	
	2	2,980		2	426,476	
	3	2,685		3	296,388	
	4	2,204		4	310,769	
	5	3,219		5	278,086	
	6	3,032		6	347,969	
	7	2,844		7	439,049	
	8	2,934		8		
	9	2,002		9		
		ka 2,655	SD 0,467		ka 372,631	SD 86,871

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M27	1	2,534		1	389,882	
	2	2,331		2	510,104	
	3	2,100		3	292,244	
	4	0,494		4	437,724	
	5	2,133		5	384,121	
	6	3,051		6	465,723	
	7	2,081		7	336,063	
	8	2,429		8	317,776	
	9	2,797		9		
	10	2,114		10		
		ka 2,206	SD 0,684		ka 391,705	SD 75,715

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M28	1	3,141		1	368,480	
	2	2,975		2	376,775	
	3	2,486		3	454,076	
	4	2,997		4	425,320	
	5	2,560		5	321,685	
	6	2,435		6	415,141	
	7	2,087		7	302,219	
	8	2,705		8	439,267	
	9	2,759		9	493,198	
	10	2,883		10		
		ka 2,703	SD 0,317		ka 399,573	SD 62,498

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M29	1	2,231		1	345,732	
	2	2,817		2	487,458	
	3	3,666		3	386,000	
	4	2,843		4	322,128	
	5	1,471		5	377,518	
	6	2,195		6	570,929	
	7	2,959		7	438,788	
	8	1,959		8	342,219	
	9	2,575		9	351,137	
	10	1,113		10		
		ka 2,383	SD 0,753		ka 402,434	SD 81,971

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M30	1	1,630		1	271,454	
	2	2,894		2	299,245	
	3	3,090		3	504,232	
	4	2,617		4	443,897	
	5	2,575		5	435,369	
	6	2,900		6	510,143	
	7	3,287		7	496,036	

	8	1,556		8		
	9	0,520		9		
+1 leafless.dwarf	ka	2,341	SD	0,911	ka	422,911
			SD			98,656

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M31	1	2,669		1	174,527	
	2	2,977		2	345,879	
	3	3,253		3	479,908	
	4	1,624		4	428,997	
	5	2,886		5	611,180	
	6	2,850		6	459,507	
	7	0,422		7	576,685	
	8	3,836		8	276,227	
	9	3,434		9	453,350	
	10	2,998		10		
	ka	2,695	SD	0,984	ka	422,918
			SD			138,649

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M32	1	2,448		1	564,837	
	2	2,042		2	309,689	
	3	2,249		3	216,425	
	4	0,767		4	515,653	
	5	2,598		5	541,222	
	6	2,492		6	387,177	
	7	2,733		7	422,551	
	8	2,519		8	426,483	
	9	2,799		9	466,575	
	10	2,164		10		
vähän.liila.lehd.	ka	2,281	SD	0,584	ka	427,846
			SD			112,458

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M33	1	2,154		1	371,021	
	2	2,917		2	485,191	
	3	3,300		3	269,512	
	4	3,622		4	508,265	
	5	2,417		5	608,023	
	6	2,603		6	357,238	
	7	2,704		7	482,087	
	8	3,322		8	478,900	
	9	2,539		9	380,418	
	ka	2,842	SD	0,484	ka	437,851
			SD			101,489

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M34	1	1,954		1	358,174	
	2	3,155		2	571,349	
	3	1,822		3	586,010	
	4	4,084		4	341,942	
	5	2,521		5	410,456	
	6	2,330		6	371,263	
+1 pien.kasv.	ka	2,644	SD	0,849	ka	439,866
			SD			109,982

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
col_set2 (wt)	1	2,370		1	489,365	
	2	3,115		2	400,572	
	3	3,106		3	558,830	
	4	2,993		4	422,551	
	5	3,103		5	468,825	
	6	3,367		6	494,010	
	7	3,618		7	463,145	

	8	3,241		8	485,490	
	9	3,193		9	472,458	
	ka	3,123	SD	0,337	ka	472,805
					SD	44,913

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M35	1	1,369		1	514,171	
	2	2,863		2	532,681	
	3	2,587		3	299,048	
	4	2,615		4	450,668	
	5	2,488		5	713,262	
	6	2,017		6	324,221	
	7	2,327		7	494,976	
	8	3,233		8	480,996	
	ka	2,437	SD	0,561	ka	476,253
					SD	128,918

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M36	1	3,539		1	319,284	
	2	2,847		2	273,976	
	3	1,352		3	617,883	
	4	1,632		4	666,448	
	5	2,577		5	512,477	
	6	2,943		6	603,738	
	7	2,155		7	469,865	
	8	2,180		8	489,747	
	9	2,370		9	427,417	
+1 pien.kasv.	ka	2,399	SD	0,673	ka	486,759
					SD	132,744

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M37	1	2,532		1	551,199	
	2	2,635		2	477,578	
	3	2,019		3	310,077	
	4	3,032		4	461,076	
	5	3,521		5	540,098	
	6	3,040		6	455,701	
	7	2,061		7	674,375	
	ka	2,691	SD	0,548	ka	495,729
					SD	111,474

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M38	1	3,397		1	292,577	
	2	2,520		2	465,804	
	3	2,200		3	566,958	
	4	3,017		4	669,869	
+1 myöh.itä.kasv.	ka	2,784	SD	0,529	ka	498,802
					SD	160,755

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M39	1	2,580		1	500,047	
	2	3,016		2	474,111	
	3	2,741		3	532,947	
	4	2,936		4	616,947	
	5	2,563		5	594,480	
	6	1,812		6	446,096	
	ka	2,608	SD	0,431	ka	527,438
					SD	67,450

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti
M40	1	3,084		1	524,407	
	2	2,937		2	515,232	
	3	3,067		3	267,123	
	4	2,712		4	687,127	
	5	1,369		5	645,490	

	6	2,600		6	617,849			
	7	3,198		7	586,028			
	8	3,029		8	553,289			
	9	2,982		9	716,178			
	10	3,696		10	524,407			
hiem.lyhyet.sivujuur.	ka	2,867	SD	0,603	ka	568,080	SD	132,472

Linja	Juuren nr	Juuren pituus (cm)	Kommentti	Juuren nr	Juuren paksuus (µm)	Kommentti		
M41	1	2,619		1	405,185			
	2	2,387		2	578,077			
	3	2,228		3	761,468			
	4	2,225		4	596,652			
	5	3,467		5	690,939			
	6	2,633		6	510,873			
	7	3,274		7	627,147			
	8	3,680		8				
	9	3,586		9				
	10	2,984		10				
	ka	2,908	SD	0,564	ka	595,763	SD	116,434

Käytettyjen DNA-pitoisuuksien arvot

Viiden lehden DNA näytteet

K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)	K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)
K2.1	30.8	K2.2	33.3
K2.3	35.2	K2.4	30.2
K2.5	28.9	K2.8	33.6
K2.9	25.3	K2.12	35.0

Yhden lehden DNA näytteet, K2-kokoelma

K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)	K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)
K2.3-1	3.8	K2.4-1	20.2
K2.3-2	5.6	K2.4-2	22.5
K2.3-3	5.1	K2.4-3	4.8
K2.3-4	4.4	K2.4-4	9.9
K2.3-5	3.1	K2.4-5	3.9

Yhden lehden DNA näytteet, K4-kokoelma

K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)	K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)
K4.4-1	19.6	K4.5-3	13.7
K4.4-2	11.9	K4.12-1	14.7
K4.4-3	3.9	K4.12-2	15.7
K4.5-1	14.3	K4.12-3	14.1
K4.5-2	13.3		

Columbia kontrollin pitoisuudet

K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)	K-linja	DNA pitoisuus (ng/μl)
Col	50.4	Col 1:10	4.7