

Tiedekunta /Osasto - Fakultet/Sektion		Laitos - Institution	
Matemaattis-luonnontieteellinen		Perinnöllisyystieteen laitos	
Tekijä - Författare			
Kimmo Koivu			
Työn nimi - Arbetets titel			
Tupakan mosaiikkiviruksen liikeproteiinigeenin siirto <i>Agrobacterium tumefaciensin</i> avulla <i>Solanum brevidensin</i>			
Oppiaine - Läroämne			
Perinnöllisyystiede			
Työn laji - Arbets art		Aika - Datum	Sivumäärä - Sidotal
Pro gradu - tutkielma		Maaliskuu 1994	89
Tiivistelmä			
<p><i>S. brevidens</i> on luonnonvaraisperuna, joka kasvaa Chilessä ja Argentiinassa. <i>S. brevidens</i> ei tuota mukuloita, vaan sen maataloudellinen arvo perustuu viruskestävyyteen, jota on tarkoitus hyödyntää perunan jalostuksessa. Viljeltyperuna (<i>S. tuberosum</i>) ja <i>S. brevidens</i> ovat vaikea risteyttää keskenään ja toisaalta <i>S. brevidensin</i> genomista halutaan siirtää viruskestävyyden kannalta vain välttämätön osa perunaan. Sen vuoksi viruskestävyysgeenien tunnistus on tärkeä vaihe viruskestävyyden siirtämisessä <i>S. brevidensistä</i> perunaan.</p> <p>Virusresistenssimekanismin ja virusten solusta soluun liikkumisen tutkimiseksi tupakan mosaiikki viruksen (TMV) liikeproteiinigeeni (30K) siirrettiin <i>Agrobacterium tumefaciensin</i> avulla <i>S. brevidensin</i>. 30K-geeni on välttämätön TMV:n liikkumisessa kasvin sisällä solusta-soluun, yhden aminohapon muutos 30K-geenissä (Ls1-mutantti) estää viruksen liikkumisen 32 C:n ei-sallivassa lämpötilassa. (30K-geenin biologinen toimivuus testataan Ls1-mutantilla, transgeenisissä <i>S. brevidenseissä</i> siirtogeenisen 30K-geenin odotetaan komplementoivan Ls1-mutantin 30K-proteiinin toiminta 32 C:ssa.)</p> <p>30K-geenin siirtämiseksi <i>S. brevidensin</i> 30K-geeni oli ensin kloonattava transformaatiovektoriin (kointegroituvektorijärjestelmä) ja transformoitava kaksi-isäntä risteytyksellä <i>Agrobacteriumiin</i>. Lisäksi oli kehitettävä <i>S. brevidensin</i> transformaatiomenetelmä. Sopivien transformaatio-olosuhteiden löytämiseksi optimoitiin lukuisia muuttuvia parametreja, kuten esi- ja yhteiskasvatusolosuhteita ja transformaatiokäsiteltyjen kasvin palojen kasvatusaikoja kasvihormoneja sisältävillä kasvatusalustoilla.</p> <p>Tehokkaimmillaan transformaatiokäsitellyistä <i>S. brevidensin</i> varren paloista 100% tuotti versoja, joista 49% oli markkerigeenitestissä positiivisia. Varren palat osoittautuivat käytetyissä olosuhteissa tehokkaammin regeneroituviksi kuin lehden palat ja pGV3850 Ti-plasmidivektorilla transformoidut kasvin palat tuottivat enemmän siirtogeenisiä versoja kuin pGV2260 Ti-plasmidivektorilla transformoidut kasvin palat. Ratkaiseva tekijä siirtogeenisten versojen tuottamisen kannalta oli kasvattaa kasvin paloja riittävän kauan (noin kolme viikkoa) kallusta indusoivalla kasvihormonialustalla (NAA 0.2 mg/l ja BAP 2,25 mg/l).</p> <p>Mahdolliset 30K-geenin suhteen siirtogeeniset kasvit testattiin southern-hybridisaatiolla. Koettimena käytettiin radioaktiivisella fosforilla leimattua PCR:llä tuotettua 30K-geeniä (807 bp). Kasviesta eristetty kokonais-DNA leikattiin (a) Bam HI:llä, joka leikkaa 30K-geenin kokonaisuksi irti molemmista päistään, (b) Eco RI:llä, joka ei leikkaa T-DNA:n sisältä ja (c) Nde I:llä, joka leikkaa 30K-geenin irti vain 5'-päästä. 30K-geenin suhteen siirtogeenisiä kasveja, joissa 30K-geeni oli yhtenä tai muutamana kopiona saatiin 28 kpl.</p>			
Aveissanat			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Solanum brevidens</i> , transformaatio			
Säilytyspaikka - Förvarningställe			
Perinnöllisyystieteen laitoksen kirjasto			
Muita tietoja - Övriga uppgifter			