

Tiedekunta Opetus - Tiedolliset

Laitos - Instituutti

Matemaattis-luonnontieteellinen Kasvitieteen laitos

Tiedekunta

Tieteen ja Tekniikan tiedekunta

Anne Kuivalainen

Työn nimi - Arvostelu

Kuusen (*Picea abies* (L.) Karst.) solukkoviljelmien DNA-pitoisuuden virtaussytometrinen mittaus

Opiaine - Laitos

Fysiologinen kasvitiede

Työn laji - Arvostelu

Pro gradu

Vuosi - Päivä

1992

Sivumäärä - Sidonnat

49+6 liites.

Toukokuu - Heinäkuu

Tässä työssä kehitettiin virtaussytometristä mittaamenetelmää, joka sopii solukkoviljelmien DNA-pitoisuuden määrittämiseen. DNA-pitoisuutta mitattiin kaikkiaan 11 kuusen (*Picea abies* (L.) Karst.) kalluslinjasta, joista viisi oli embryogeenisiä (valkoisia) ja kuusi ei-embryogeenisiä. Ei-embryogeenisistä linjoista kolme oli vihreää ja loput valkoisia. Ei-embryogeenisistä viljelmistä kolme oli megagametofyyttialkuisia. Lisäksi DNA-pitoisuutta mitattiin kuudesta suspensioviljelmästä, joista kolme oli embryogeenistä ja kolme ei-embryogeenistä.

Virtaussytometrisen DNA-pitoisuuden määrittämisen ensimmäinen vaihe on kasvisoluissa soluseinän aiheuttaman värjäyksen poistaminen. Soluseinän entsymaattinen pilkkominen oli mekaanista erottelua (solukon hienontaminen lasihomogenisaattorissa) huomattavasti tehokkaampi. Optimaalinen entsyymikoostumus protoplastien eristykseen oli 2,0% sellulaasia, 1,0% maseraasia ja 0,02% pektolyaasia, kun eristysliuoksen sakkaroosipitoisuus oli 0,5 M ja CaCl₂-pitoisuus 5,0 mM. Eristysaika oli 16-18 tuntia. Protoplastit pestiin W5-pesuliuoksella.

Mitattaessa kvantitatiivisesti DNA-pitoisuutta EtBr (50 µg/ml, etidiumbromidi) sitoutui DNA:han 2-3 tunnissa. EtBr:llä ei ole DNA:han sitoutuessaan emässpesifisyyttä. Värjäyspuskurin detergenttikonsentraatiolla (Nonident P40) sekä sen ionikoostumuksella oli vaikutusta saatujen tulosten laatuun: 0,5%:nen detergenttiliuos yhdessä Ca²⁺- (10 mM) sekä Mg²⁺-ionien (3 mM) kanssa sekä RNAasin lisäys (20 µg/µl) puskuriin paransi myös histogrammien terävyyttä.

Kuusen solukkoviljelmien DNA-pitoisuuden havaittiin olevan erittäin stabiili. Jopa 6 vuotta vanhat kalluslinjat olivat säilyneet diploideina (36 pg). Sytokiniinin jättäminen pois ravintoalustasta ei myöskään vaikuttanut DNA-pitoisuuksiin. Tosin yhdessä linjassa ero alustojen välillä oli merkittävä (**). Megagametofyyttialkuiset linjat olivat kuitenkin polyploidisoituneet. Siitepölyhiukkasista kasvaneiden siiteputkien sekä megagametofyyttien tumien haploidigenomi oli yhtä suuri (18 pg)

Kalluksen siirto kasvamaan suspensioviljelmänä aiheutti suurimmat DNA-pitoisuuden muutokset. Tällöin DNA-pitoisuus nousi huomattavasti, mutta palautui lähelle kallusviljelmän arvoa n.4-6 viikon viljelyn jälkeen.

Suvullisen alkion kehityksen aikana DNA-pitoisuus muuttui. Kypsyvissä alkioissa varsinaisen alkio-osan ja suspensoriosan DNA-pitoisuudet olivat erilaisia suspensorin DNA-määrän ollessa korkeampi kuin alkio-osan. Itäneiden alkioiden solut olivat diploideja, joten DNA-pitoisuuden muutokset alkionkehityksen aikana eivät näy taimissa.

Menetelmä sopii myös muiden lajien kuin kuusen DNA-pitoisuuden mittaamiseen. Sekä rauduskoivun (*Betula pendula* Roth) suspensioviljelmistä (1,4 pg) että harmaalepän (*Alnus incana* (L.) Moench) lehdestä (0,34 pg) DNA-pitoisuuden määrittäminen onnistui hyvin.

Avainsanat - Työn laji

Virtaussytometria, DNA-pitoisuus, kuusen solukkoviljelmät, süvuttoimat äkiöt

Säilytyspaikka - Tiedon tyyppi

HY, Kasvitieteen laitoksen kirjasto

Käsitteistö - Kirjasto