

Rypsin puristekakun rehuarvon parantaminen

Anna Maria Nuutila & Veli Kauppinen
VTT Bio- ja elintarviketekniikka



ISBN 951-38-4879-5
ISSN 1235-0605
Copyright © Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT) 1996

JULKAISIJA – UTGIVARE – PUBLISHER

Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT), Vuorimiehentie 5, PL 2000, 02044 VTT
puh. vaihde (90) 4561, telekopio (90) 456 4374

Statens tekniska forskningscentral (VTT), Bergsmansvägen 5, PB 2000, 02044 VTT
tel. växel (90) 4561, telefax (90) 456 4374

Technical Research Centre of Finland (VTT), Vuorimiehentie 5, P.O.Box 2000, FIN-02044 VTT, Finland
phone internat. + 358 0 4561, telefax + 358 0 456 4374

VTT Bio- ja elintarviketekniikka, Panimo- ja kasvibioteeniikka, Tietotie 2, PL 1505, 02044 VTT
puh. vaihde (90) 4561, telekopio (90) 455 2028

VTT Bio- och livsmedelsteknik, Bryggeri- och växtbioteknik, Datavägen 2, PB 1505, 02044 VTT
tel. växel (90) 4561, telefax (90) 455 2028

VTT Biotechnology and Food Research, Brewing Technology and Plant Biotechnology, Tietotie 2,
P.O.Box 1505, FIN-02044 VTT, Finland
phone internat. + 358 0 4561, telefax + 358 0 455 2028

Kannen kuva: Tapio Mannelin/Suomen Rehu Oy

Tekninen toimitus Kerttu Tirronen

VTT OFFSETPAINO, ESPOO 1996

UDK 633.4:633.853.4:636.085/.087

Avainsanat plants (botany), feeding stuffs, animal nutrition, forage crops, farm crops, oilseed crops, proteins, lysine, biotechnology

TIIVISTELMÄ

Rypsin (*Brassica rapa* subsp. *oleifera*) puristekakkua, joka jää jäljelle öljyä puristettaessa, käytetään rehuteollisuuden raaka-aineena. Rypsin puristekakun lysii- ja treoniinipitoisuudet ovat kuitenkin liian pieniä, joten rehua valmistettaessa seokseen joudutaan lisäämään synteettisiä aminohappoja. Tämä nostaa tuotantokuluja. Jos rypsin varastoproteiineja muokattaisiin enemmän lysiniä ja treoniiniä sisältäviksi, synteettisten aminohappojen käyttöä ei enää tarvittaisi.

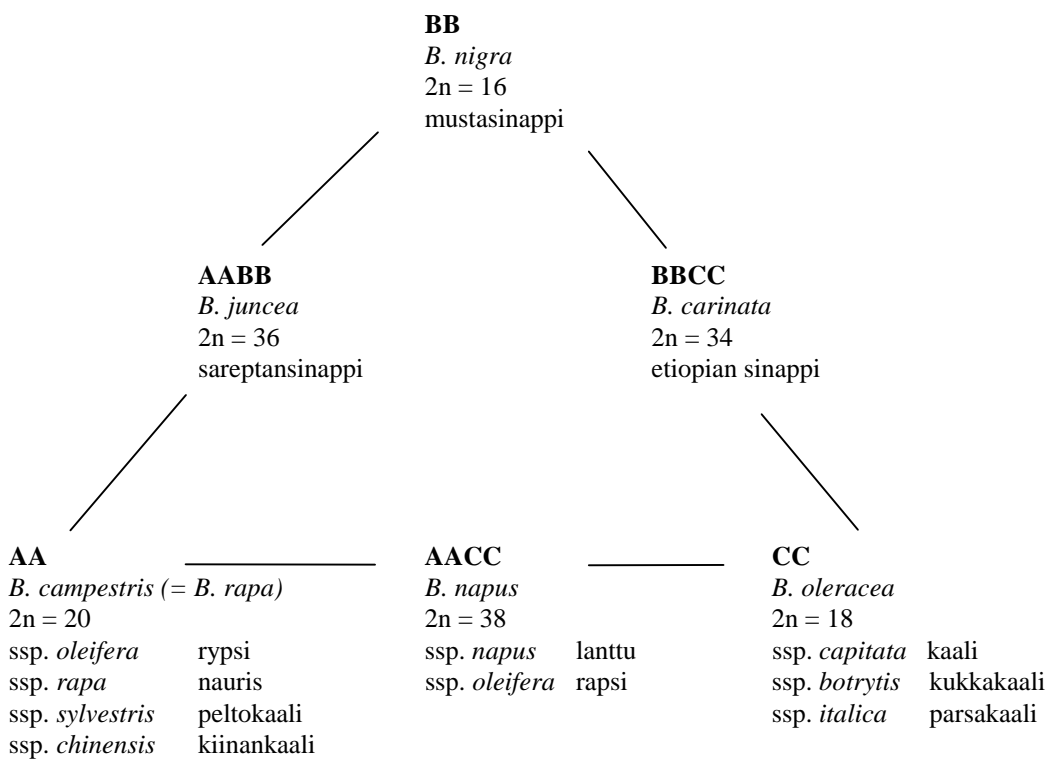
Tässä kirjallisuustutkimuksessa on selvitetty yhdessä suomalaisen rehuteollisuuden kanssa mahdollisuudet rypsin puristekakun aminohappokoostumuksen parantamiseen niin, että puristekakku vastaisi paremmin rehuteollisuuden tarpeita. Ensimmäinen selvityskohde on ollut lysiinipitoisuuden nostaminen rypsin siemenen varastoproteiineissa kasvibiotekniikan avulla. Rehuteollisuuden kanssa yhteistyössä on arvioitu myös tutkimus- ja kehitystyön taloudellista kannattavuutta.

SISÄLTÖ

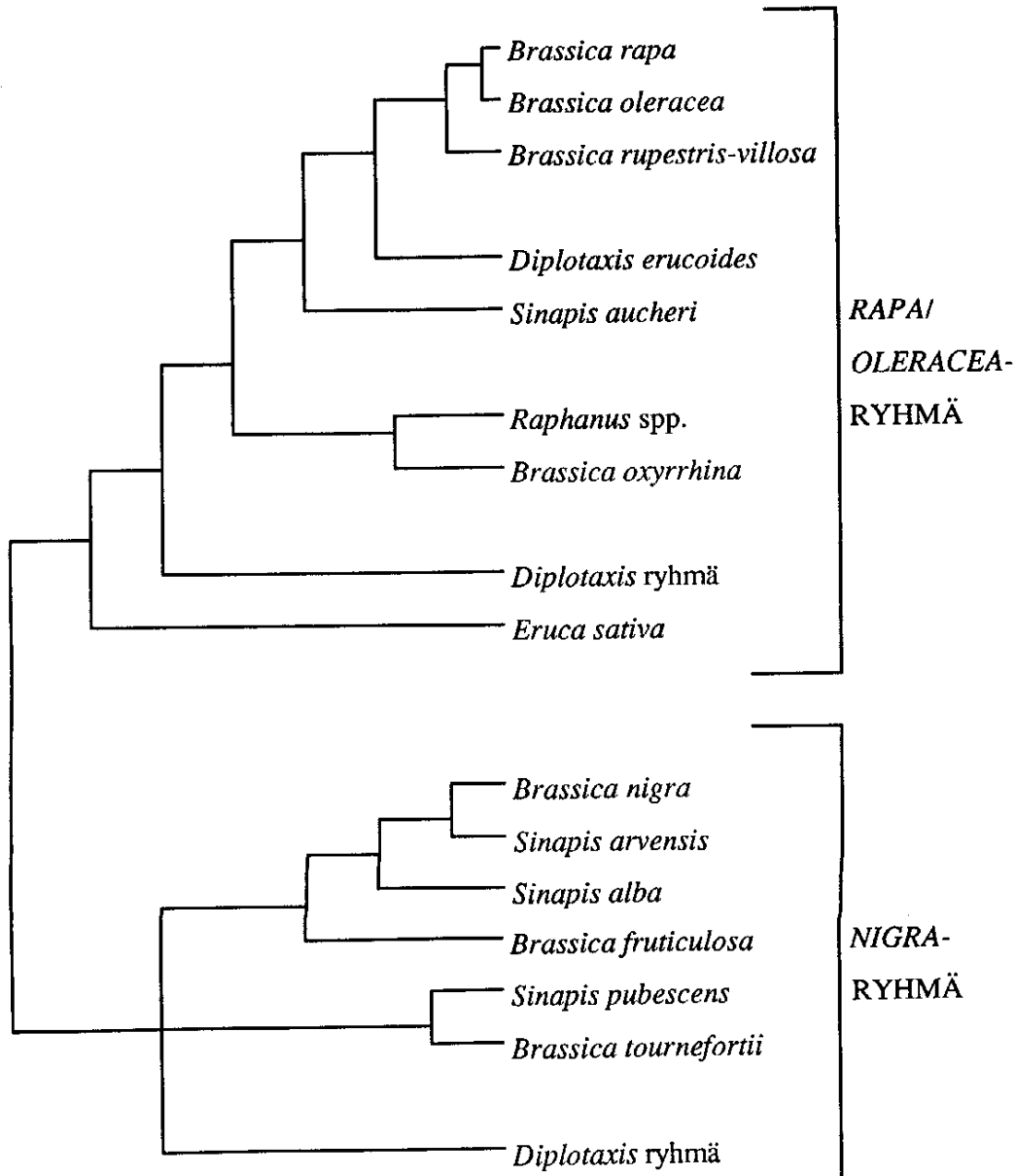
TIIVISTELMÄ	3
1 BRASSICA-SUKU	5
1.1 Soluviljelytekniikat	7
1.1.2 Haploidiviljely	7
1.1.3 Protoplastiviljely ja protoplastifuusiot	7
1.2 Geeninsiirtomenetelmät	8
1.2.1 Agrobakteeri	8
1.2.2 Suora geeninsiirto	8
1.3 <i>B. campestris</i> ssp. <i>oleifera</i> (rypsi)	9
1.3.1 Soluviljelytekniikat	9
1.3.2 Protoplastifuusiot	10
1.3.3 Geeninsiirrot	10
2 KOIRASSTERILITEETTI	11
2.1 Sytoplasminen koirassteriliteetti (CMS)	11
2.2 Tuman säätelemä koirassteriliteetti (NMS)	12
3 SIEMENEN VARASTOPROTEIINIT JA NIIDEN MUOKKAAMINEN	13
4 SIIRTOGEENISEN RYPSIN VILJELYN RISKINARVIOINTI	15
5 PATENTIT JA PATENTTIHAKEMUKSET	17
6 TALOUDELLINEN KANNATTAVUUS	22
6.1 Rehuraaka-aineiden optimointi ja hinnanmuodostus	22
6.2 Rypsin siemenvalkuaisen kasvibioteknisen muokkaamisen hinnanmuodostus	23
6.3 Projektin toteutettavuus	24
7 KIRJALLISUUS	26

1 BRASSICA-SUKU

Brassica -sukuun kuuluvat kasvit ovat tärkeitä öljynlähteitä, rehukasveja ja vihannuksia. Suvun kuuden yleisimmän lajin phylogeneettiset suhteet on esitetty seuraavassa kaavakuvassa (Prakash ja Chopra 1991, Gyulai *et al.* 1992, Sjödin 1992, Lydiate *et al.* 1993):



Nykyaikaisten molekyyli-tason analyysien (mm. RFLP) perusteella on kuitenkin ehdotettu että suku pitäisi jakaa kahteen erilliseen alakuun: *B. nigra* -ryhmään ja *B. campestris / oleracea* -ryhmään (Warwick *et al.* 1992, Lydiate *et al.* 1993):



Brassica-suvun tärkeitä öljykasveja ovat mm. rapsi (*B. napus*) ja rypsi (*B. campestris / rapa*). Rapsi on itsepölytteinen, mutta rypsi puolestaan avopölytteinen (Busch *et al.* 1994). Rypsin kasvukausi on lyhyempi kuin rapsin, ja siksi se on Suomessa näistä tärkeämpi viljelykasvi.

1.1 SOLUVILJELYTEKNIIKAT

1.1.1 Haploidiviljely

Haploidiviljelyä käytetään usein kasvinjalostuksen apuvälineenä, jotta kasvin resessiiviset ominaisuudet saataisiin esiin. Haploideja on tuotettu soluviljelmissä useimmista *Brassica*-lajeista. Niiden tärkeimmät tuottamismenetelmät ovat hedestä ja mikrosporiviljelmät. Näistä mikrosporiviljelmät ovat osoittautuneet noin kymmenen kertaa tehokkaammiksi ja myös vähemmän tetraploideja ja muita geneettisiä epänormaalisuuksia tuottaviksi kuin hedeviljelmät (Siebel ja Pauls 1989, Kott *et al.* 1990). Viljelyssä mikrospreista saadaan somaattisia alkioita, jotka tuottavat versoja. Versoja voidaan saada myös muodostuneesta kalluksesta, mutta tämä on hitaampaa, ja osa muodostuvista kasveista saattaa olla aneuploideja. *B. napuksen* mikrosporalkuperää olevien alkoiden on osoitettu keräävän varastoyhdisteitä (mm. proteiineja ja lipidejä) samoin kuin tsygoottisten alkoiden (Crouch 1982, Wiberg *et al.* 1991). Tämän perusteella *B. napuksen* mikrospreista saatuja alkioita voidaan hyödyntää sekä varastoproteiinien geenitutkimuksissa että aikaansaatuisten muutosten seulonnassa.

1.1.2 Protoplastiviljely ja protoplastifuusiot

Brassica-protoplasteja on ensimmäisen kerran eristetty onnistuneesti vuonna 1973. Jo seuraavana vuonna Kartha ryhmineen regeneroi rapsin protoplasteista kallusta ja kasveja (Kartha *et al.* 1974). Sen jälkeen on julkaistu useiden eri *Brassica*-lajien tehokkaita protoplastiviljelymenetelmiä (Glimelius 1984, Barsby *et al.* 1986).

Brassica-lajeista on tuotettu vuosien mittaan runsaasti erilaisia somaattisia hybridejä, jotka on saatu aikaan protoplastifuusiolla. Tällä menetelmällä voidaan laajentaa jalostuksen käytettävissä olevaa geenimateriaalia. Suvun sisäisiä hybridejä ovat mm. amfidiploidit lajit *B. carinata*, *B. juncea* ja *B. napus*, jotka on saatu diploidien lajien *B. nigra*, *B. oleracea* ja *B. campestris* fuusioina. Näissä hybrideissä on onnistuneesti yhdistetty kaksi genomia ja saatu aikaan uusi toimiva yksikkö (Glimelius *et al.* 1989). Esimerkiksi fertiili ja stabiili *B. napus* ($n = 19$) on tuotettu fuusioimalla *B. campestris* ($n = 10$) ja *B. oleracea* ($n = 9$) (Wojciechowski 1985, Sundberg *et al.* 1987). Hybridejä on tuotettu myös *Brassican* ja muiden sukujen, kuten *Arabidopsis*, *Sinapis*, *Diplotaxis*, *Raphanus* ja *Eruca*, välillä (Bauer-Weston *et al.* 1993, Lydiate *et al.* 1993).

Sytoplasman organellien genomit koodaavat mm. sytoplasmista koirassteriliteettiä (CMS, cytoplasmic male sterility), triatsiiniresistenssiä (TR) ja atratsiiniresistenssiä (ATR). Protoplastifuusion avulla nämä organelit voidaan siirtää protoplastiin, jossa on haluttu tumagenomi, ja saada aikaan uusi rekombinantti. Mitokondriaalinen DNA koodaa koirassteriliteettiä ja kloroplasti-DNA triatsiiniresis-

tenssiä (Kott *et al.* 1990). Koirassteriliteetti on siirretty tällä menetelmällä mm. rapsista parsakaaliin (Yarrow *et al.* 1990). On myös osoitettu että kaksi sytoplasman organellien koodaamaa ominaisuutta voidaan siirtää samaan kasviin: parsakaaliin on siirretty koirassteriliteetti myös *B. nigrasta*, ja näin saadusta parsakaalista on tehty hybridi atratsiiniresistentin rypsin kanssa (Christey *et al.* 1991).

1.2 GEENINSIIRTOMENETELMÄT

Brassica-lajeille on käytetty useita eri geeninsiirtomenetelmiä mm. agrobakteeri-infektiota, polyetyleeniglykolia (PEG), liposomeja, elektroporaatiota, mikroinjektiota ja yhdistettyä DNA-imbitionia ja partikkelipommitusta. Näistä yleisimmin käytetty on agrobakteeri-infektio, sillä *Brassicat* sopivat varsin hyvin agrobakteerin isännäksi. Esimerkiksi rapsista tuotetuista siirtogeenisistä kasveista on neljä viidesosaa tuotettu agrobakteerimenetelmällä (Kott *et al.* 1990).

1.2.1 Agrobakteeri

Agrobakteereista on yleisemmin käytetty *Agrobacterium tumefaciensista*. Lähtömateriaalina ovat olleet varsi, hypokotyylin palat, sirkkalehdet, varren epidermipalaset, mikrosporit, embryot ja protoplastit (Ohlsson ja Eriksson 1988, Kott *et al.* 1990, De Block ja Debrouwer 1991, Mukhopadhyay *et al.* 1992, Radke *et al.* 1992). Rapsille tehokkaimmiksi *A. tumefaciens* -linjoiksi ovat osoittautuneet nopaliinilinjat, erityisesti C58 (Kott *et al.* 1990).

Myös *A. rhizogenesistä* on käytetty geeninsiirtoon *Brassica*-lajeilla (mm. Petit *et al.* 1983, David ja Tempe 1988, Tepfer 1990). *A. rhizogenesiksen* suosiota geeninsiirtovälineenä on vähentänyt regeneroitujen kasvien muuttunut morfologia (mm. Guerche *et al.* 1987b, Hroudá *et al.* 1988), josta tosin voidaan päästä risteyttämällä eroon.

1.2.2 Suora geeninsiirto

Brassica -protoplasteihin on siirretty suoraan DNA:ta elektroporaation, PEG-käsittelyn ja liposomien avulla (Guerche *et al.* 1987a, Köhler *et al.* 1990, Rouan *et al.* 1991, Bergman ja Glimelius 1993, Lurquin ja Rollo 1993). Liposomi- ja PEG-geeninsiirron jälkeen ei viljelmistä ole kuitenkaan saatu regeneroiduksi kasveja.

Rapsin (*B. napus*) mikrosporeista saatuihin alkioihin on siirretty DNA:ta suoraan mikroinjektiolla. Alkioista saaduista sekundaarialkioista onnistuttiin regeneroimaan siirtogeenisiä kasveja (Neuhaus *et al.* 1987). Myös partikkelipommitusta yhdistettynä DNA-absorptioon (imbition) on käytetty geeninsiirtomenetelmänä rapsille (Chen ja Beversdorf 1994). Lähtömateriaalina tässä menetelmässä olivat

hypokotyyliit, joiden regeneraatiofrekvenssi oli lähes 90 %. Menetelmällä on tuotettu runsaasti siirtogeenisiä kasveja. Itsepölytyksen jälkeen yhdeksän kasvin jälkeläiset analysoitiin. Seitsemän näistä kasveista tuotti homotsygootin jälkeläistön.

1.3 *B. campestris* ssp. *oleifera* (RYPSI)

1.3.1 Soluviljelytekniikat

Rypsi (*B. campestris* ssp. *oleifera*) on osoittautunut soluviljelyssä vaikeammaksi kuin sen sukulaislajit, ja siksi sen viljelymenetelmätkin on julkaistu myöhemmin kuin muiden *Brassica*-lajien. Myös Dietert *et al.* (1982) ovat todenneet tämän tutkiessaan genotyypin vaikutusta solukkoviljelyominaisuuksiin *Brassica*-suvussa

Elmshausen *et al.* (1978) eristivät rypsistä protoplasteja, jotka eivät kuitenkaan jakautuneet. Vuonna 1979 rypsin protoplasteista onnistuttiin regeneroimaan kallusta ja lisäksi viljelmissä saatiin aikaan juurten muodostusta (Schenck ja Hoffmann 1979). Glimelius (1984) onnistui regeneroimaan rypsin protoplasteista kalluksia, mutta näistä vain 1 % regeneroitui kasveiksi. Zhao *et al.* (1994) tuottivat rypsin sirkkalehtiprotoplasteista kallusta, josta regeneroitui versoja 15 - 20 % frekvenssillä. Näistä kuitenkin vain osa juurtui ja voitiin siirtää multaan.

Regeneraatiota on tutkittu myös muilla lähtömateriaaleilla kuin protoplasteilla. Dunwell (1981) onnistui regeneroimaan lehtikiekoista muutamia kasveja rypsin lähisukulaisesta, *B. campestris* ssp. *rapiferasta*. Kun Lazzeri ja Dunwell (1984) käyttivät lähtömateriaalina juuren paloja, ei versoja muodostunut lainkaan. Chandler *et al.* (1986) aloittivat kalluksia rypsin sirkkalehdistä ja sirkkavarresta, mutta eivät onnistuneet regeneroimaan näistä kasveja. Myöskään suora organogeneesi sirkkavarresta ei onnistunut. Narasimhulu ja Chopra (1988) onnistuivat regeneroimaan kasveja *in vitro* sirkkalehdistä. Paras tässä kokeessa saatu regeneraatio-frekvenssi oli 32 % (yhdeksi lajikkeelle neljästä testatusta parhaalla alustalla) kun se muilla *Brassica*-lajeilla samassa kokeessa oli 50 - 66 %. Chi ja Pua (1989) ja Chi *et al.* (1990) paransivat kiinankaalin (*B. campestris*) regeneraatiota etyleeni-inhibiittorin avulla. Vuonna 1991 Hachey *et al.* julkaisivat tehokkaan menetelmän rypsin regeneroimiseksi sirkkalehdistä *in vitro*: regeneraatiofrekvenssi oli 70 %. Tällainen frekvenssi on jo riittävä esimerkiksi agrobakteeri-infektioon perustuvaan geeninsiirtoon. Burnett *et al.* (1994) paransivat rypsin sirkkalehdistä tapahtuvaa regeneraatiota käyttämällä etyleeni-inhibiittoria ja saivat frekvenssiksi 79 %.

Keller *et al.* (1975) tuottivat ensimmäisinä kasveja rypsin hedeviljelmistä embryogeneesin kautta. Tuotetut kasvit olivat kuitenkin diploideja tai polyploideja. Lämpökäsittelyn avulla Keller ja Armstrong (1979) onnistuivat regeneroimaan hedeviljelmistä kasveja, joista 70 % oli haploideja. Saatujen alkuiden regeneraatiofrekvenssi oli 20 - 30 %. Lichter (1989) tuotti embryoita rypsin mikrosporiviljel-

mässä, mutta ei regeneroinut saatuja alkioita kasveiksi. Haploideja alkioita rypsin mikrosporiviljelmistä tuottivat myös Baillie *et al.* (1992). Kuitenkin vain 20 % saaduista alkiosta kehittyi suoraan kasveiksi. Kasveista 20 % tuotti siitepölyä ja niiden oletettiin olevan spontaanisti syntyneitä diploideja. Myös Burnett *et al.* (1992) saivat mikrosporiviljelmistä saatujen alkioiden regeneraatioprosentiksi 21 % eli käytännössä saman kuin aiemmat ryhmät.

1.3.2 Protoplastifuusiot

Rypsin protoplasteja on käytetty paljon protoplastifuusiotutkimuksissa. Niitä on fuusioitu mm. *B. oleracean* kanssa, jolloin on saatu lopputuotteeksi rapsi (Elmshauer *et al.* 1978, Sundberg ja Glimelius 1986, Sundberg *et al.* 1987). Glimelius *et al.* (1986) rikastivat fuusioituja *B. campestris*-*B. oleracea* - protoplasteja soluselektorin avulla ja regeneroivat rikastetuista protoplasteista versoja.

1.3.3 Geeninsiirrot

*Agrobacterium tumefaciens*ia on käytetty pääasiallisena geeninsiirtovälineenä rypsilä. Ohlsson ja Eriksson (1988) transformoivat rypsin protoplasteja kahdella *A. tumefaciens*-kannalla (C58 ja B6S3), joista C58 oli selvästi tehokkaampi. Protoplasteista regeneroitiin kallusta, joka kasvoi kanamysiiniselektiolla. Kalluksista 80 - 90 % tuotti nopaliinia. Kalluksia ei saatu regeneroiduksi kasveiksi.

Rypsin siirtogeenisiä kasveja *A. tumefaciens*in avulla tuottivat ensimmäisinä Radke *et al.* (1992) (Calgene Inc.). Transformaatio frekvenssi oli 1 - 9 % ja menetelmällä oli tuotettu julkaisemiseen mennessä yli 200 siirtogeenistä kasvia. Periytymistä tutkittiin neljällä kasvulla, joista kahdessa geeni oli yhtenä ja kahdessa kahtena kopiona. Vastaavat segregaatiosuhteet olivat 3:1 ja 15:1 (siirtogeeninen : ei-siirtogeeninen). Tällä menetelmällä on muokattu rypsin siemenen varastoöljyn öljykoostumusta nostamalla steariinihapon määrää (Knutzon *et al.* 1992)(Clagene Inc). Samana vuonna myös Mukhopadhyay *et al.* (1992) julkaisivat siirtogeenisen rypsin, joka oli tuotettu *A. tumefaciens*in avulla. Ainakin 16 regeneroitua kasvia oli todettu siirtogeenisiksi. Nämä molemmat menetelmät (Radke *et al.* 1992 ja Mukhopadhyay *et al.* 1992) käyttivät lähtömateriaalina hypokotyyliä. Mukhopadhyay *et al.* (1992) kokeilivat myös sirkkalehtiä lähtömateriaalina, mutta saivat tällöin vain kaksi kasvia, jotka olivat kimeerejä.

2 KOIRASSTERILITEETTI

Koirassteriliteetti on hyödyllinen työkalu nykyaikaisessa kasvinjalostuksessa. Koirassteriliteetti voi koodautua joko tuman tai sytoplasman organellien genomien kautta. Koirassteriliteettiä voidaan hyödyntää mm. kasvinjalostuksessa itsepölytyksen estämiseen haluttuja hybridejä tuottaessa. Toisaalta koirassteriliteetin avulla voidaan myös estää siitepölyn leviäminen siirtogeenisten kasvien kenttäkokeissa. Molemmat tunnetut koirassteriliteetin muodot ovat joissain olosuhteissa mahdollisesti instabiileja.

2.1 SYTOPLASMINEN KOIRASSTERILITEETTI (CMS)

Useimmiten koirassteriliteetti on mitokondrion genomien koodaama, ja siksi se periytyy sytoplasman mukana. Sytoplasmisesti koirassteriilit (CMS) kasvit eivät tuota elävää siitepölyä ja eivätkä voi siksi pölyttää, mutta ne voidaan kuitenkin pölyttää. *Brassica*-lajien CMS-tutkimukset ovat yleensä keskittyneet kolmeen koirassteriiliin sytoplasmaan: *ogu*, *nap*, ja *pol*. Useimmista *B. napus* lajikkeista löytyy normaali *nap*-sytoplasma. Se aiheuttaa koirassteriliteettiä vain joissain *B. napus* -lajikkeiden tumagenotyypeissä ja sen aiheuttama koirassteriliteetti on epästabiili lämpimissä olosuhteissa. *ogu*-sytoplasma (alunperin retiisistä) aiheuttaa myös epähaluttuja muutoksia *Brassicoissa*. *pol*-sytoplasma aiheuttaa suhteellisen lämpöstabiilin koirassteriliteetin ja lisäksi se osataan myös poistaa. Tämän vuoksi *pol*-systeemi vaikuttaakin käyttökelpoisimmalta mm. hybridin rapsin tuottamiseen (Singh ja Brown 1991).

CMS on mahdollista siirtää lajista toiseen perinteisen risteytyksen keinoin, joskin menetelmä on varsin työläs. Koirassteriili rypsi on saatu aikaan risteyttämällä ja takaisinristeyttämällä rypsi *B. oxyrrhinan* kanssa (Prakash ja Chopra 1988).

Parsakaaliin on siirretty rapsin CMS protoplastifuusion avulla (Yarrow *et al.* 1990). Erickson *et al.* (1989) osoittivat, että sytoplasmisen koirassteriliteetti voi siirtyä myös seksuaalisesti: siitepöly kuljettaa mukanaan myös sytoplasman geenimateriaalia. He osoittivat, että *Brassicalla* mitokondriaalisesta plasmidista voidaan päästä eroon soluviljelyn avulla ja että mitokondrian geenimateriaali voi siirtyä paternaalaisesti siitepölyn mukana. Singh ja Brown (1991) esittivät, että *pol*-tyyppinen sytoplasmisen koirassteriliteetti johtuu mitokondrion *orf224/atp6*-geenialueen muutoksista ja että fertiiliteetti voidaan palauttaa tuman *Rfp1* tai *Rfp2*-geeneillä, jotka muuttavat *atp6*-alueen geenituotteen laskostumista. Muutokset *orf224/atp6*-geenialueella aiheuttavat mitokondrion osittaisen toimintahäiriön, joka tulee esiin kasvin fenotyyppitasolla koirassteriliteettinä (Singh ja Brown 1991). Vertaamalla koirasfertiilin ja koirassteriilin rapsin mitokondrioiden genomien fyysisiä karttoja L'Homme ja Brown (1993) vahvistivat rakennemuutokset, jotka aiheuttavat sytoplasmisen koirassteriliteetin, juuri tälle alueelle.

2.2 TUMAN SÄÄTELEMÄ KOIRASSTERILITEETTI (NMS)

On myös mahdollista aiheuttaa koirassteriliteetti tuman genomien kautta (NMS, tuman säätelemä koirassteriliteetti) (Lichtenstein 1990). Tuman säätelemä koirassteriliteetti (NMR) saadaan aikaan heteessä ilmenevien kimeerien ribonukleasigeenien avulla. Mariani *et al.* (1990) aiheuttivat koirassteriliteetin sekä tupakassa että rapsissa kahdella eri kimeerillä ribonukleasikonstruktiilla (*TA29-RNase T1*, *T29-barnase*), jotka ilmenevät heteessä ja tuhoavat selektiivisesti heteen ponnin sisimmäisen seinäkerroksen, tapetumin. Tapetum erittää proteiineja ja muita yhdisteitä, jotka edistävät siitepölyhiukkasten kehitystä. Tapetumin tuhoutuminen estää siitepölyn muodostumisen ja aiheuttaa koirassteriliteetin. Koirassteriilien kasvien fertiiliteetti voidaan palauttaa kimeerillä ribonukleasi-inhibiittorilla. Mariani *et al.* (1992) palauttivat siirtogeenisen koirasteriilin rapsin fertiiliteetin *barstar*-inhibiittorin avulla. Kasvit, joiden heteet ilmentävät molempia *barnase*- ja *barstar*-geenejä, ovat fertiilejä. *Barstar* ja *barnase* muodostavat tapetumin soluissa kompleksin, jolloin barnasen sytotoksinen vaikutus estyy. Myös tumaperäinen rapsin koirassteriliteetti voi tietyissä olosuhteissa (mm. korkea lämpötila: 25 - 30° C) olla epästabiili. Syytä tähän ei ole vielä selvitetty (Denis *et al.* 1993). DeBlock ja Debrouwer (1993) tekivät histokemiallisen analyysin heteiden kehityksestä sekä *barnase*- että *barnase-barstar*-positiivissa kasveissa. *barnase*-positiivisissa kasveissa koko hede lakastui kehityksen lopuksi kun taas *barnase-barstar*-kasveissa heteen kehitys oli samanlainen kuin normaalissa, ei-siirtogeenisessä kasvissa.

3 SIEMENEN VARASTOPROTEIINIT JA NIIDEN MUOKKAAMINEN

Kasviproteiinin ravintoarvo määräytyy paljolti sen aminohappokoostumuksen mukaan. Jos jokin aminohappo on rajoittava tekijä eläimen ravinnossa niin muita aminohappoja käytetään energian lähteenä eikä proteiinisynteesissä. Monien kasvien varastoproteiinien koostumus ja geenisäätely on jo varsin hyvin selvitetty. Aminohappotasapainon parantamista siemenen varastoproteiineissa voidaan lähestyä esim. seuraavilla kahdella tavalla:

- Varastoproteiini, jonka aminohappokoostumus ei ole haluttu, voidaan korvata paremmalla varastoproteiinilla kasvibiotekniikan avulla (John 1992).
- Varastoproteiinin aminohappokoostumusta voidaan muokata. 11S/12S-globuliineissa esiintyy yleisesti polaaristen aminohappojen ketjuja (inserts), jotka voivat vaihdella runsaasti pituudeltaan, aminohappokoostumukseltaan ja sijainniltaan lajin sisällä ja lajien kesken. Tämä vaihtelu tekee näistä alueista sopivia kohteita aminohappokoostumuksen geenitekniselle muokkaukselle (Shotwell ja Larkins 1989, John 1992).

Useimmat siemenproteiinien karakterisoinnit *Brassica*-lajeilla on tehty rapsilla, joka on maailmanlaajuisesti tärkeä öljykasvi. Rapsin siementen pääasiallinen varastoproteiini (60 % proteiinista) on 12S-tyyppinen globuliini (cruciferiini), jonka suhteellinen molekyylipaino (M_r) on luokkaa 300 000. Proteiini muodostuu kuudesta erilaisesta alayksiköstä, joissa on hapan (M_r noin 40 000) ja emäksinen (M_r noin 20 000) polypeptidi. Hapan ja emäksinen osa ovat liittyneet toisiinsa disulfididisidoksin. Alayksiköistä muodostuu ensin trimeerejä, ja kaksi päällekkäin asettunutta trimeeriä muodostaa lopullisen rakenteen. Kvaternäärinen rakenne on trigonaalinen antiprisma. Rapsin toinen varastoproteiini on nimeltään napiini ja se on 2S(1.7S)-tyyppinen albumiini. Siemenen ollessa kypsä napiini muodostaa noin 20 % siemenproteiinista (Crouch *et al.* 1983). Molemmat varastoproteiinit muodostuvat alkion sirkkavarressa ja sirkkalehdessä ja varastoituvat pääasiallisesti niiden vakuoleihin. Molemmat proteiinit häviävät nopeasti itämisen alettua (Murphy *et al.* 1989, Höglund *et al.* 1992).

Sekä cruciferiini että napiini on karakterisoitu kirjallisuudessa (Ericson *et al.* 1986, Rödin ja Rask 1990, Sjö Dahl *et al.* 1991). Myös rypsin 2S varastoproteiini on karakterisoitu (Dasgupta ja Mandeal 1991). Useat rapsin 2S ja 12 S proteiineja koodaavat geenit on eristetty ja sekvensoitu (Crouch *et al.* 1983, Josefsson *et al.* 1987, Scofield ja Crouch 1987, Ryan *et al.* 1989, Rödin *et al.* 1990, Baszczynski ja Fallis 1990, Rödin *et al.* 1992, Breen ja Crouch 1992, Dasgupta *et al.* 1993).

Rapsilla aminohappotasapainoa on pyritty muuttamaan korkeamman metioniinipitoisuuden suuntaan siirtämällä siihen toisesta kasvista (Brazil nut) eristettyä DNA-ta, jonka koodaama proteiini on aminohappotasapainoltaan erilainen. Tästä prote-

iinista on 18% metioniinia, kun rapsissa vastaavasti metioniinipitoisuus on 2,1 - 2,6 % (Gander *et al.* 1991, Altenbach *et al.* 1992). Toisaalta myös 2S-albumiinia on muokattu lisäämällä siihen metioniinia koodaavia osia. Tämä voidaan tehdä alueella joka on kuudennen ja seitsemannen kysteiinitähteen välissä. Tämä alue vaihtelee eri kasveilla sekä pituuden että sekvenssin suhteen ja muodostaa todennäköisesti rakenteellisesti itsenäisen renkaan proteiinissa (DeClerq *et al.* 1990a ja b). Molemmilla menetelmillä on voitu nostaa varastoproteiinin metioniinipitoisuutta (Guerche *et al.* 1990, DeClerq *et al.* 1990a ja b, Altenbach *et al.* 1992). Saatu parannus metioniinipitoisuudessa ei vielä ole ollut riittävä, mutta DeClerq *et al.* (1990b) pitävät tavoittelemaansa ekspressiotasoa (2 - 3 % kokonais-proteiinista) täysin mahdollisena.

Myös siementen lysiinipitoisuutta on pyritty nostamaan geeninsiirtojen avulla. Rice *et al.* (1994) ovat nostaneet siemenen varastoproteiinin lysiinipitoisuutta rakentamalla synteettisen 31 % lysiiniä sisältävän proteiinin. Proteiini ilmeni tupakan siemenvalkuaisessa 2 %:n tasolla ja soijapavun siementen uuttuvissa proteiineissa 0,8 %:in tasolla. Falco *et al.* (1995) (E.I.DuPont de Nemours & Co.) onnistuivat nostamaan sekä rapsin että soijan siementen lysiinipitoisuutta muokkaamalla lysiinin biosynteesireitin säätelyä. Siirtogeenisen rapsin siemenissä saavutettiin kaksinkertainen kokonaislysiinipitoisuus ja siirtogeenisen soijan siemenissä viisinkertainen kokonaislysiinipitoisuus lähtömateriaaliin verrattuna (Falco *et al.* 1995).

4 SIIRTOGEEENISEN RYPSIN VILJELYN RISKINARVIOINTI

Useat ryhmät eri puolilla maailmaa ovat tehneet siirtogeenisellä rapsilla kenttäkokeita, joissa on pyritty arvioimaan siirtogeenisen kasvin agronomiset ominaisuudet sekä mahdollinen siirretyn geenin aiheuttama riski (Arnoldo *et al.* 1992, Morris *et al.* 1994). *Brassica*-lajien kykyä risteytyä toistensa ja muihin sukuihin kuuluvien kasvien kanssa on selvitetty sekä kirjallisuuden (Kapteijns 1993, Scheffler ja Dale 1994) että käytännön risteytyskokeiden ja eri lajien itävyyden selvittämisen perusteella (Kerlan *et al.* 1992, Adler *et al.* 1993, Eber *et al.* 1994).

Siirtogeenisen rapsin käyttäytymistä riskianalyysiä varten suunnitelluissa kenttäkokeissa on tutkittu niin Englannissa (Crawley *et al.* 1993, Scheffler *et al.* 1993) kuin Yhdysvalloissakin (Morris *et al.* 1994). Myös rypsin lähisukulaista kiinankaalia on käytetty mallikasvina geenivirran kartoittamisessa (Manasse 1992). Näissä kokeissa on otettu avopölytteisyyden vuoksi huomioon myös hyönteisten aiheuttama leviäminen.

Arnoldo *et al.* (1992) totesivat että kenttäkokeissa (Kanadassa) siirtogeeninen rapsi oli agronomisilta ominaisuuksiltaan (kypsyminen, saanto, öljy- ja proteiinipitoisuus) täysin verrattavissa ei-siirtogeenisiin vertailukasveihin.

Manasse (1992) esitti tekemiensä kokeiden pohjalta, että siitepölyn leviämisen täydellinen estäminen on mahdotonta ja siksi siirtogeenisten peltujen yhteydessä onkin aina tarkkaan harkittava saatavaa kokonaisuutta ja -haittaa. Hän totesi, että siirtogeeniset kasvit kannattaa rajata houkuttelevilla kasveilla, jolloin siitepöly jää niihin ennen kuin hyönteiset poistuvat alueelta.

Englantilaiset Crawley *et al.* (1993) päätyivät tulokseen, että ainakaan heidän tutkimansa rapsit (kanamysiinitolerantit ja herbisiditolerantit kasvit) eivät olleet voimakkaammin leviäviä ja paremmin selviytyviä kuin tavalliset vertailukasvit. Kasvien agronomisessa käyttäytymisessä oli joitain eroja, mutta tällöin siirtogeeniset linjat selviytyivät heikommin kuin kontrolli.

Amerikkalaiset Morris *et al.* (1994) - yhteistyössä Calgene Inc:n kanssa - tutkivat, estävätkö paljas alue tai pyydyskasvi (siitepölypyydys) siirtogeenisen pölyn leviämistä tehokkaasti. Molemmilla keinoilla pyritään vähentämään erityisesti hyönteisten aiheuttamaa leviämistä. Kokeiden perusteella he päättelivät, että tehokkain tapa vähentää tai estää siirtogeenisen siitepölyn leviämistä on käyttää siirtogeenisten kasvien ympärillä pyydyskasveja. Käytettävän alueen leveys tulee tasapainottaa halutun tuloksen (kuinka suuri "containment") ja pyydyskasvin aiheuttamien kulujen suhteen.

Cresswell (1994) on kehittänyt menetelmän, jolla voidaan mitata yhdestä mehiläisenvierailusta aiheutuva siirtogeenin leviäminen. Mallikasvina hän käytti rapsia.

Hän totesi, että 91 % toimivasta siitepölystä jäi ensimmäiseen neljään kukkaan (muodostui siirtogeeninen siemen) eikä yhtään siirtogeenistä siementä löytynyt enää neljännen kukkan jälkeen. Tämä nostaa Manassen (1992) tekemän havainnon houkuttelevien rajauskasvien käytöstä entistä tärkeämmäksi leviämisen vähentäjänä.

5 PATENTIT JA PATENTTIHAKEMUKSET

Seuraavassa on lueteltu aikajärjetyksessä uusimmasta vanhimpaan niin *Brassica*-sukuun kuin proteiinin muokkaukseen ja koirassteriliteettiinkin liittyvät patentit ja patenttihakemukset, jotka tulivat tehdyssä tietohaussa esiin.

EP 620281 19 Oct 1994 (Mitsubishi)

Oilseed transgenic plant containing seed storage protein antisense DNA, napin or cruciferin antisense DNA cloning in rape, soybean or maize, for alteration of lipid or amino acid content

- sis. rapsi

WO 9420628 A2 940915 (du Pont de Nemours)

Improving the sulfur amino acid content of feedcrops by seed-specific expression of the gene for a sulfur-rich storage protein

- sis. rapsi (mallikasvi)

WO9416078 21 Jul 1994 (Pioneer Hi-Bred)

Alpha-hordothionin derivative; recombination protein engineering for increased lysine content and gene cloning in a DNA cassette in a vector for expression in maize transgenic plant for imparting fungus disease-resistance

- sis. Brassica

WO 9413814 A1 940623 (Nickerson Biocem Ltd)

DNA encoding 2-acyltransferases and its use in altering the fatty acid profiles of plant oils

- sis. rapsi

WO 9413809 A1 940623 (University of Melbourne)

Developmental regulation in anther tissue of plants

- sis. rypsi

US 5315001 A 940524 (Calgene)

Molecular cloning and expression of cDNA for plant acyl carrier protein

- sis. rapsi, rypsi

WO 9410189 A1 940511 (Calgene)

Plant fatty acid synthases and the genes encoding and their use in the alteration of plant fatty acid profiles

- sis. rapsi, rypsi

WO 9325695 A1 931223 (Plant Genetic Systems)
Maintenance and reversal of male sterility in plants by crossing with plants carrying male fertility restoring genes
- sis. rapsi

WO 9321320 A1 931028 (University Technologies International Inc)
Oil-body proteins as carriers of high-value peptides in plants
- sis. rapsi

WO 9320216 14 Oct 1993 (Univ. Technol. Int.)
Method for DNA expression in seed; oil body protein transcription regulation sequence seed tissue-specific gene expression in rape, maize, carrot or Arabidopsis oilseed transgenic plant
- sis. rapsi

WO 9319190 A1 930930 (du Pont de Nemours)
Increasing the lysine and threonine content of the seeds of plants by introduction of genes for feedback-insensitive biosynthetic enzymes
- sis. rapsi

WO 9305153 A1 930318 (Imperial Chemical Industries PLC)
A family of fungicidal and bactericidal proteins from plant seeds
- sis. rapsi, rypsi

US 5188958 23 Feb 1993 (Calgene)
Brassica napus, *Brassica campestris* transgenic plant construction by *Agrobacterium tumefaciens* plasmid gene expression; propagation from callus culture
- sis. rapsi ja rypsi

WO 9303160 A1 930218 (du Pont de Nemours)
Synthetic storage proteins containing defined levels of essential amino acids for improvement of the nutritional value of plants
- sis. rapsi, rypsi

WO 9302197 A1 930204 (Nickerson Biocem Ltd)
Callase-related DNAs and their use for inducing male sterility in plants
- sis. rapsi

WO 9218634 A1 921029 (Unilver PLC)
Plant promoter involved in controlling lipid biosynthesis in seeds and its use in modifying seed oil production
- sis. rapsi

WO 9217850 15 Oct 1992 (Rhone-Poulenc-Agrochimie)
Chimeric helianthinin gene construction for transgenic plant construction
- sis. rapsi

WO 9214822 3 Sept 1992 (Du-Pont)

High sulfur plant seed storage protein gene; cloning and expression in maize, soybean, rape, tobacco or rice transgenic plant using plamid pCC10 vector

- sis. rapsi

WO 9211379 A1 920709 (Nickerson International Seed Co)

Tapetum-specific promoters from *Brassicaceae* and their use in producing male-sterile plants

- sis. rapsi

EP 486234 A2 920520 (Pioneer Hi-Bred International)

Plant transformation by microparticle bombardment with *Agrobacterium* adsorbed to the particles

- sis. *Brassica*

EP 486233 A2 920520 (Pioneer Hi-Bred International)

Plant transformation with *Agrobacterium* using microprojectile bombardment

- sis. *Brassica*

WO 9205251 2 Apr 1992 (INRA)

New DNA imparting cytoplasmic male sterility to plants; cytoplasmic male sterile rape, *Brassica oleracea*, *Brassica campestris*, *Brassica juncea*, black mustard etc. construction using Ogura sterility DNA sequence without causing chlorosis etc.

- sis. rapsi, rypsi

WO 9204454 A1 920319 (du Pont de Nemours)

Induction of male sterility in crop plants with heterologous genes expressed from tissue-specific promoters

- sis. rapsi

WO 9203564 A1 920305 (Calgene)

Plant fatty acid synthases and cDNAs encoding them

- sis. rapsi

WO 9201799 6 Feb 1992 (Paladin Hybrids)

Binary cryptocytotoxic method of hybrid seed production; genic male sterile transgenic plant construction

- sis. rapsi

CA 2021643 AA 920121 (Paladin Hybrids Inc)

Regulatable induction of male sterility in plants

- sis. rapsi, rypsi

WO 9119806 A1 911226 (Monsanto Co)
Increasing starch content of plants by increasing ADP glucose pyrophosphorylase activity
- sis. rapsi

EP 449376 A2 911002 (Gist-Brocades, Mogen International)
Transgenic seed for use as a source of heterologous enzymes
- sis. rapsi

WO 9113980 19 Sept 1991 (Calgene)
DNA constructs for use as probes or for plant transformation; Bce4 gene DNA probe construction, DNA sequence expression in *Brassica* seed tissue
- sis. *Brassica* sp.

WO 9113972 A1 910919 (Calgene)
Cloning of plant desaturase cDNA and its expression in transgenic plants
- sis. rapsi, rypsi

US 5049503 17 Sept 1991 (Pioneer Hi-Bred)
Affecting fertility in plant variants; by culturing immature gametic cells, generating embryos and selecting somatic embryos for regeneration into plants
- sis. *Brassica* sp.

WO 9008828 A2 900809 (Paladin Hybrids Inc)
Production of male-sterile plants using antisense DNA for production of hybrid seed
- sis. rapsi, rypsi

WO 8910396 A1 891102 (Plant Genetic Systems)
Production of male-sterile plants and seeds by recombinant DNA methods
- sis. rapsi

FR 2629098 A1 890929 (Rhone-Poulenc Agrochimie)
Plasmids for expression of nitrilase gene in plants and herbicide resistant plants
- sis. rapsi

EP 331083 A2 890906 (Sweizerrisches Eidgenossenschaft)
Method for the production of transgenic plants (microinjection)
- sis. rapsi

EP 329308 A2 890823 (Paladin Hybrids Inc)
Use of pollen-specific antisense transcripts for the production of male sterile *Brassica*
- sis. rapsi, rypsi

EP 318341 31 May 1991 (Plant-Genet Systems)

Production of transgenic plants containing protein of high nutritional value; by inserting gene for 2S albumin modified for enrichment of specific amino acids
- sis. rapeseed

EP 317509 A2 890524 (Ciba-Geigy)

Use of homologous recombination to target the insertion of genes into plant genomes
- sis. *Brassica*

WO 8903887 A1 890505 (Plant Genetic Systems)

A process for the production of biologically active peptide via the expression of modified storage seed protein genes in transgenic plants
- sis. rapeseed

EP 275069 A2 880720 (DNA Plant technology Corp, du Pont de Nemours)

Pollen-mediated gene transformation in plants
- sis. *Brassica*

JP 63112936 A2 880518 (Mitsubishi)

Construction of plasmids and their use in transformation of *Brassica*
- sis. *Brassica*

EP 255378 A2 880203 (Calgene)

Expression vectors containing promoters for seed-specific expression of genes in transformed plants
- sis. rapeseed, rapeseed

EP 255377 A2 880203 (Calgene)

Sequencing of acyl-carrier protein gene and its seed-specific expression in transformed plants
- sis. rapeseed, rapeseed

WO 8707299 A1 871203 (Calgene)

Transformation and foreign gene expression in *Brassica* species (*Agrobacterium*)
- sis. rapeseed, rapeseed

EP 223247 A2 870527 (Ciba-Geigy)

Direct gene transfer into plastids and mitochondria of plant protoplasts without use of pathogens
- sis. rapeseed

6 TALOUDELLINEN KANNATTAVUUS

6.1 REHURAAKA-AINEIDEN OPTIMOINTI JA HINNANMUODOSTUS

Tyypillinen rehunvalmistuksessa käytetty rypsirouhe sisältää raakavalkuaista 32 - 34 %. Jos muokataan kasvibioteknisesti varastoproteiinin lysiinipitoisuutta, niin valmistuksessa käytettävän rypsirouheen koostumus ja rehun hinta muuttuvat muokatun proteiinin ilmenemistason ja -tavan mukaan. Laskelmat on tehty neljälle erilaiselle vaihtoehdolle.

Vaihtoehdoissa 1 ja 2 oletetaan, että raakavalkuaisen määrä pysyy vakiona (34 %), mutta lysiinin pitoisuus kasvaa: siirrettävän proteiinin lysiinipitoisuus on joko 10 % tai 15 % ja ilmenemistaso 2 - 4 %. Vaihtoehdoissa 3 ja 4 lysiinin pitoisuus kasvaa samoin kuin ensimmäisissä, mutta samalla raakavalkuaisen määrä kasvaa (34 - 38 %). Sulavan lysiinin osuuden on oletettu pysyvän kaikissa vaihtoehdoissa vakiona (74 % lysiinistä). Verrattaessa vaihtoehtoja 1 - 4 nähdään, että raakavalkuaisen muutos vaikuttaa energia-arvoihin sekä sialla että naudalla. Pelkkä lysiinipitoisuuden nousu ei tätä tee. Naudalla varsinaiset säästöt johtuvatkin juuri energia-arvon paranemisesta. Tämän vuoksi vaihtoehdot 3 ja 4 säästävät eniten rehureseptien kustannuksia.

Vaihtoehtojen 1 - 4 suurimmat säästöt rehureseptien hinnassa ovat seuraavat (vuosimyyntiksi oletettu 350 000 tn/ rehu):

	Sianrehu		Naudanrehu		Kokonaissäästö
	mk/tn	mk/vuosi	mk/tn	mk/vuosi	ö mk/vuosi
Vaihtoehto 1	1,931	675 850	-	-	675 850
Vaihtoehto 2	4,238	1 483 300	-	-	1 483 300
Vaihtoehto 3	4,740	1 659 000	2,511	878 850	2 537 850
Vaihtoehto 4	7,259	2 540 650	2,511	878 850	3 419 500

Suurimmat säästöt rehureseptin hintaan saatiin kaikissa vaihtoehdoissa, kun siirretty proteiini ilmeni 4 %:in tasolla varastovalkuaisesta. Sen sijaan reseptiin hyväksytyn raaka-aineen määrä vaihteli. Taulukosta nähdään, että pelkällä lysiinipitoisuuden nostolla voidaan saavuttaa jopa 4,238 mk/tn säästö sianrehureseptin hinnassa. Vuodessa tämä tarkoittaa 1 483 300 mk:n säästöä, kun rehun myynti on esimerkiksi 350 000 tn. Naudanrehussa ei saada säästöjä pelkällä lysiinipitoisuuden nostolla. Jos sen lisäksi onnistutaan samalla nostamaan myös raakavalkuaisen määrää, voidaan proteiinimuokkauksella saada sianrehureseptiin 7,259 mk:n ja naudanhureseptiin 2,511 mk:n säästöt tonnilta. Jos molempien rehujen vuosimyyntin oletetaan olevan 350 000 tn, olisi vuosittainen kokonaissäästö 3 419 500 mk.

6.2 RYPSIN SIEMENVALKUAISEN KASVIBIOTEKNISEN MUOKKAAMISEN HINNANMUODOSTUS

Rypsin siemenproteiinien kasvibiotekninen muokkaaminen vaatii sekä solukkoviljelyn että molekyylibiologian osaamista. Työn etenemistä sen eri osilta kuvaa seuraava kaavio:

Työvaihe	1. vuosi	2. vuosi	3. vuosi
Soluviljely- ja regeneraatiotekniikat rypsilille	_____		
Geenikonstruktioiden rakentaminen	_____		
Geeninsiirrot ja kasvien regenerointi		_____	
Regeneroitujen kasvien analysointi			_____

Tarvittava minimityöpanos siirtogeenisen rypsin tuottamiseksi kolmessa vuodessa on kuusi tutkijatyövuotta. Tästä 3 htv kuluvat solukkoviljelyyn ja geeninsiirtoihin sekä kasvien regenerointiin (1 tutkija, 3 vuotta). Toiset 3 htv sisältävät geenikonstruktioiden rakentamisen sekä geeninsiirroista regeneroitujen kasvien molekyylibiologiset analyysit (mm. PCR, southern blot jne.)(1 tutkija, 3 vuotta). Kustannukset siirtogeenisen rypsin tuottamiseksi laboratorioissa ovat seuraavat:

$$2 \text{ tutkijaa} \times 3 \text{ vuotta} \times 500\,000 \text{ mk} = \mathbf{3\,000\,000 \text{ mk}}$$

Tämän jälkeen saatu siirtogeeninen rypsi siirretään jalostusohjelmaan. Siinä siirtogeenisestä rypsiä muokataan lopullinen viljelylajike, jolle sitten tehdään asiaan kuuluvat viljely- ja kenttäkokeet. Tällaisen jalostusohjelman kesto on yleensä noin kuudesta seitsemään vuotta (Nichols *et al.* 1992). Ohjelman keston vaikuttaa kuitenkin se, kuinka paljon geeninsiirroissa lähtömateriaalina käytetty lajike on muuttunut laboratoriovaiheen aikana. Jos viljely- ja sato-ominaisuudet ovat säilyneet ennallaan, voidaan jalostusohjelmaa mahdollisesti lyhentää joiltain osin.

6.3 PROJEKTIN TOTEUTETTAVUUS

Siirtogeenistä rypsiä on tuotettu tähän mennessä kahdessa eri tutkimusryhmässä (Radke *et al.* 1992 ja Mukhopadhyay *et al.* 1992). Näistä Calgene Inc. on tuottanut julkaisun mukaan yli 200 siirtogeenistä kasvia ja Mukhopadhyay *et al.* ainakin 16 kasvia. Sen sijaan rapsilla siirtogeenisten kasvien tuottaminen on rutiinimenetelmä.

Siirtogeenisellä rapsilla (oil seed rape/ Canola) on tehty jo vuosina 1986-1992 varsin runsaasti kenttäkokeita (OECD 1993):

Maa	Myönnettyjen lupien määrä
Australia	1
Belgia	19
Kanada	218
Ranska	21
Hollanti	2
Espanja	1
Ruotsi	4
Iso-Britannia	15
Yhdysvallat	9
Yhteensä	290

Nämä 290 lupaa muodostavat 33,0 % kaikista myönnetyistä siirtogeenisten kasvien kenttäkoeluvista. Rapsille myönnetyt luvat kattavat yhteensä 357 koealuetta.

Kenttäkokeissa käytetyt rapsit ovat olleet siirtogeenisiä seuraavilta ominaisuuksiltaan suhteen (OECD 1993):

Ominaisuus	Määrä
Herbisiditoleranssi	242
Tautikestävyys	2
Virusresistenssi	2
Hyönteisresistenssi	1
Laatu-ominaisuudet	21
Koirassteriliteetti ja sen poistaminen	27
Yhteensä	295

Geeninsiirtomenetelmät ja -sovellukset sekä soluviljelytekniikat on patentoitu varsin laajasti *Brassica*-lajeilla. Seuraavassa taulukossa esitetään kirjallisuushaussa esilletulleet patentit ja patenttihakemukset, joissa *Brassica*-lajit on mainittu.

Patenttien tai hakemusten määrä	Pääasiallinen sovellus
13	proteiinimuokkaus
6	lipidi- tai öljymuokkaus
1	tärkkelysmuokkaus
1	vierasentsyymit
11	koirassteriliteetti
1	herbisidiresistenssi
1	soluviljelytekniikat
11	geeninsiirtomenetelmät tms.

Patenttien pitävydestä ja patenttimaksujen suuruudesta ei ole selkeitä ennakkotapauksia.

7 KIRJALLISUUS

- Adler, L.S., Wikler, K., Wyndham, F.S., Linder, C.R. ja Schmitt, J. 1993. Potential for persistence of genes escaped from canola: germination cues in crop, wild, and crop-wild hybrid *Brassica rapa*. *Functional Ecol.*, vol. 7, s. 736 - 745.
- Altenbach, S.B., Kuo, C.-C., Staraci, L.C., Pearson, K.W., Wainwright, C., Georgescu, A. ja Townsend, J. 1992. Accumulation of a Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. *Plant Mol. Biol.*, vol. 18, s. 235 - 245.
- Arnoldo, M., Baszczyński, C.L., Bellemare, G., Brown, G., Carlson, J., Gillespie, B., Huang, B., MacLean, N., MacRae, W.D., Rayner, G., Rozakis, S., Westecott, M. ja Kemble, R.J. 1992. Evaluation of transgenic canola plants under field conditions. *Genome*, vol. 35, s. 58 - 63.
- Baillie, A.M.R., Epp, D.J., Hutcheson, D. ja Keller, W.A. 1992. In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. *Plant Cell Rep.*, vol. 11, s. 234 - 237.
- Barsby, T.L., Yarrow, S.A. ja Shepard, J.F. 1986. A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.*, vol. 5, s. 101 - 103.
- Baszczyński, C.L. ja Fallis, L. 1990. Isolation and nucleotide sequence of a genomic clone encoding a new *Brassica napus* napin gene. *Plant Mol. Biol.*, vol. 14, s. 633 - 635.
- Bauer-Weston, B., Keller, W., Webb, J. ja Gleddie, S. 1993. Production and characterization of asymmetric somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 86, s. 150 - 158.
- Bergman, P., Glimelius, K. 1993. Electroporation of rapeseed protoplasts - transient and stable transformation. *Physiol. Plant.*, vol. 88, s. 604 - 611.
- Breen, J.P. ja Crouch, M.L. 1992. Molecular analysis of a cruciferin storage protein gene family of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, vol. 19, s. 1049 - 1055.
- Burnett, L., Arnoldo, M., Yarrow, S. ja Huang, B. 1994. Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, vol. 37, s. 253 - 256.

- Burnett, L., Yarrow, S. ja Huang, B. 1992. Embryogenesis and regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa* L. ssp. *oleifera*. Plant Cell Rep., vol. 11, s. 215 - 218.
- Busch, L., Gunter, V., Mentele, T., Tachikawa, M. ja Tanaka, K. 1994. Socializing nature: Technoscience and the transformation of rapeseed into canola. Crop Sci., vol. 34, s. 607 - 614.
- Chandler, S.F., Mandal, B.B. ja Thorpe, T.A. 1986. Effect of sodium sulphate on tissue cultures of *Brassica napus* cv. Westar and *Brassica campestris* L. cv. Tobin. J. Plant Physiol., vol. 126, s. 105 - 117.
- Chen, J.L. ja Beversdorf, W.D. 1994. A combined use of microprojectile bombardment and DNA imbibition enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet., vol. 88, s. 187 - 192.
- Chi, G.-L., Barfield, D.G., Sim, G.-E. ja Pua, E.-C. 1990. Effect of AgNO₃ and aminoethoxy-vinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Rep., vol. 9, s. 195 - 198.
- Chi, G.-L. ja Pua, E.-C. 1989. Ethylene inhibitors enhanced *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (chinese cabbage) in vitro. Plant Sci., vol. 64, s. 243 - 250.
- Christey, M.C., Makaroff, C.A. ja Earle, E.D. 1991. Atrazine-resistant cytoplasmic male-sterile-*nigra* broccoli obtained by protoplast fusion between cytoplasmic male-sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *Brassica campestris*. Theor. Appl. Genet., vol. 83, s. 201 - 208.
- Crawley, M.J., Hails, R.S., Rees, M., Kohn, D. ja Buxton, J. 1993. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. Nature, vol. 363, s. 620 - 623.
- Cresswell, J.E. 1994. A method for quantifying the gene flow that results from a single bumblebee visit using transgenic oilseed rape, *Brassica napus* L. cv. Westar. Transg. Res., vol. 3, s. 134 - 137.
- Crouch, M.L. 1982. Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. Planta, vol. 156, s. 520 - 524.
- Crouch, M.L., Tenbarger, K.M., Simon, A.E. ja Ferl, R. 1983. cDNA clones for *Brassica napus* seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. J. Mol. Appl. Gen., vol. 2, s. 273 - 283.
- Dasgupta, S., Dasgupta, J. ja Mandal, R.K. 1993. Cloning and sequencing of 5' flanking sequence from the gene encoding 2S storage protein, from two *Brassica* species. Gene, vol. 133, s. 301 - 302.

- Dasgupta, S. ja Mandal, R.K. 1991. Characterization of 2S seed storage protein of *Brassica campestris* and its antigenic homology with seed proteins of other *Cruciferae*. *Biochem. Internat.*, vol. 25, s. 409 - 417.
- David, C. ja Tempe, J. 1988. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*) by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, vol. 7, s. 88 - 91.
- DeBlock, M. ja Debrouwer, D. 1991. Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 82, s. 257 - 263.
- DeBlock, M. ja Debrouwer, D. 1993. Engineering fertility control in transgenic *Brassica napus* L.: histochemical analysis of anther development. *Planta*, vol. 189, s. 218 - 225.
- DeClerq, A., Vandewiele, M., De Rycke, R., Van Damme, J., Van Montagu, M., Krebbers, E. ja Vandekerckhove, J. 1990a. Expression and processing of an *Arabidopsis* 2S albumin in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, vol. 92, s. 899 - 907.
- DeClerq, A., Vandewiele, M., Van Damme, J., Guerche, P., Van Montagu, M., Vandekerckhove, J. ja Krebbers, E. 1990b. Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. *Plant Physiol.*, vol. 94, s. 970 - 979.
- Denis, M., Delourme, R., Gourret, J.-P., Mariani, C. ja Renard, M. 1993. Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, vol. 101, s. 1295 - 1304.
- Dietert, M.F., Barron, S.A. ja Yoder, O.C. 1982. Effects of genotype on in vitro culture in the genus *Brassica*. *Plant Sci. Lett.*, vol. 26, s. 233 - 240.
- Dunwell, J.M. 1981. *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species. *J. Exp. Bot.*, vol. 32, s. 789 - 799.
- Eber, F., Chèvre, A.M., Baranger, A., Vallée, P., Tanguy, X. ja Renard, M. 1994. Spontaneous hybridization between a male-sterile oilseed rape and two weeds. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 88, s. 362 - 368.
- Elmshäuser, H.A., Forche, E. ja Neumann, K.-H. 1978. Untersuchungen zur Protoplastengewinnung bei verschiedenen *Brassica*-Arten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd.*, vol. 91, s. 313 - 324.

- Erickson, L., Kemble, R. ja Swanson, E. 1989. The Brassica mitochondrial plasmid can be sexually transmitted. Pollen transfer of a cytoplasmic genetic element. *Mol. Gen. Genet.*, vol. 218, s. 419 - 422.
- Ericson, M.L., Rödin, J., Lenman, M., Glimelius, K., Josefsson, L.-G. ja Rask, L. 1986. Structure of the rapeseed 1.7S storage protein, napin, and its precursor. *J. Biol. Chem.*, vol. 261, s. 14576 - 14581.
- Falco, S.C., Giuda, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R.T. ja Webber, P. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *BioTechnol.*, vol. 13, s. 577 - 582.
- Gander, E.S., Holmstroem, K.-O., De Paiva, G.R., De Castro, L.A., Carneiro, M. ja Grossi de Sá, M.-F. 1991. Isolation, characterization and expression of a gene coding for a 2S albumin from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut). *Plant Mol. Biol.*, vol. 16, s. 437 - 448.
- Glimelius, K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiol. Plant.*, vol. 61, s. 38 - 44.
- Glimelius, K., Djupsjöbacka, M. ja Fellner-Feldegg, H. 1986. Selection and enrichment of plant protoplast heterokaryons of *Brassicaceae* by flow sorting. *Plant Sci.*, vol. 45, s. 133 - 141.
- Glimelius, K., Fahlesson, J., Landgren, M., Sjödin, C. ja Sundberg, E. 1989. Somatic hybridization as a means to broaden the gene pool of cruciferous oil plants. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift*, vol. 99, s. 103 - 108.
- Guerche, P., Charbonnier, M., Jouanin, L., Tourneur, C., Paszkowski, J. ja Pelletier, G. 1987a. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. *Plant Sci.*, vol. 52, s. 111 - 116.
- Guerche, P., De Almeida, E.R.P., Schwarztein, M.A., Gander, E., Krebbers, E. ja Pelletier, G. 1990. Expression of the 2S albumin from *Bertholletia excelsa* in *Brassica napus*. *Mol. Gen. Genet.*, vol. 221, s. 306 - 314.
- Guerche, P., Jouanin, L., Tepfer, D. ja Pelletier, G. 1987b. Genetic transformation of oilseed rape (*Brassica napus*) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and analysis of inheritance of the transformed phenotype. *Mol. Gen. Genet.*, vol. 206, s. 382 - 386.
- Gyulai, G., Kiss, E. ja Heszky, L.E. 1992. Biotechnology of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Agron. Hung.*, vol. 41, s. 277 - 287.
- Hachey, J.E., Sharma, K.K. ja Moloney, M.M. 1991. Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured in vitro. *Plant Cell Rep.*, vol. 9, s. 549 - 554.

Hrouda, M., Dusbábková, J. ja Necásek, J. 1988. Detection of Ri T-DNA in transformed oilseed rape regenerated from hairy roots. *Biol. Plant.*, vol. 30, s. 234 - 236.

Höglund, A.-S., Rödin, J., Larsson, E. ja Rask, L. 1992. Distribution of napin and cruciferin in developing rape seed embryos. *Plant Physiol.*, vol. 98, s. 509 - 515.

John, P. 1992. *Biosynthesis of the Major Crop Products*. John Wiley and Sons, New York. S. 127 - 147.

Josefsson, L.-G., Lenman, M., Ericson, M.L. ja Rask, L. 1987. Structure of a gene encoding the 1.7S storage protein, napin, from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.*, vol. 262, s. 12196 - 12201.

Kapteijns, A.J.A.M. 1993. Risk assessment of genetically modified crops. Potential of four arable crops to hybridize with the wild flora. *Euphytica*, vol. 66, s. 145 - 149.

Kartha, K.K., Michayluk, M.R., Kao, K.N., Gamborg, O.L. ja Constabel, F. 1974. Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (*Brassica napus* L. cv. Zephyr). *Plant Sci. Lett.*, vol. 3, s. 265 - 271.

Keller, W.A. ja Amstrong, K.C. 1979. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 55, s. 65 - 67.

Keller, W.A., Rajhathy, T. ja Lacpra, J. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Can. J. Genet. Cytol.*, vol. 17, s. 655 - 666.

Kerlan, M.C., Chèvre, A.M., Eber, F., Baranger, A. ja Renard, M. 1992. Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species: I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica*, vol. 62, s. 145 - 153.

Knutzon, D.S., Thompson, G.A., Radke, S.E., Johnson, W.B. ja Knauf, V.C. 1992. Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ., vol. 89, s. 2624 - 2628.

Kott, L.S., Erickson, L.R. ja Beversdorf, W.D. 1990. The role of biotechnology canola/ rapeseed research. Teoksessa: Shahidi, F. (toim.) *Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology*. New York: Van Nostrand Reinhold. S. 47 - 78.

Köhler, F., Benediktson, I., Cardon, G., Andreo, C.S. ja Schieder, O. 1990. Effect of various irradiation treatments of plant protoplasts on the transformation rates after direct gene transfer. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 79, s. 679 - 685.

- Lazzerri, P.A. ja Dunwell, J.M. 1984. *In vitro* shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus* cultivars. *Ann. Bot.*, vol. 54, s. 341 - 350.
- L'Homme, Y. ja Brown, G.G. 1993. Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus. *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, s. 1903 - 1909.
- Lichtenstein, K. 1990. Engineering plant male sterility using a cell-restricted cytotoxin. *TIBS*, vol. 15, s. 453 - 454.
- Lichter, R. 1989 Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. *Plant Breeding*, vol. 103, s. 119 - 123.
- Lurquin, P.F., Rollo, F. 1993. Liposome-mediated delivery of nucleic acids into plant protoplasts. *Methods in Enzymology*, vol. 22, s. 409 - 415.
- Lydiate, D., Sharpe, A., Lagercrantz, U. ja Parkin, I. 1993. Mapping of the *Brassica* Genome. *Outlook on Agriculture*, vol. 22, s. 85 - 92.
- Manasse, R.S. 1992. Ecological risks of transgenic plants: effects of spatial dispersion on gene flow. *Ecol. Appl.*, vol. 2, s. 431 - 438.
- Mariani, C., DeBeuckeleer, Marc., Truettner, J., Leemans, J. ja Goldberg, R.B. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, vol. 347, s. 737 - 741.
- Mariani, C., Gossele, V., DeBeuckeleer, M., DeBlock, M., Goldberg, R.B., DeGreef, W. ja Leemans, J. 1992. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*, vol. 357, s. 384 - 387.
- Morris, W.F., Kareiva, P.M. ja Raymer, P.L. 1994. Do barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops? *Ecol. Appl.*, vol. 4, s. 157 - 165.
- Mukhopadhyaya, A., Arumugam, N., Nandakumar, P.B.A., Pradhan, A.K., Gupta, A.K. ja Pental, D. 1992. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. *Plant Cell Rep.*, vol. 11, s. 506 - 513.
- Murphy, D.J., Cummins, I. ja Ryan, A.J. 1989. Immunocytochemical and biochemical study of the biosynthesis and mobilisation of the major seed storage proteins of *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 27, s. 647 - 657.
- Narasimhulu, S.B. ja Chopra, V.L. 1988. Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of *Brassicaceae*. *Plant Cell Rep.*, vol. 7, s. 104 - 106.

- Neuhaus, G., Spangenberg, G., Mittelsten Scheid, O. ja Schweiger, H.-G. 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 75, s. 30 - 36.
- Nichols, J.B., Dalton, C.C., Todd, G.A. ja Broughton, N.W. 1992. Genetic engineering of sugar beet. *Zuckerind.*, vol. 117, s. 797 - 800.
- OECD. 1993. Field releases of transgenic plants, 1986-1992. An Analysis. OECD, Paris.
- Ohlsson, M. ja Eriksson, T. 1988. Transformation of *Brassica campestris* protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens*. *Hereditas*, vol. 108, s. 173 - 177.
- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G. ja Guyon, P. 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.*, vol. 190, s. 204 - 214.
- Prakash, S. ja Chopra, V.L. 1988. Synthesis of alloplasmic *Brassica campestris* as a new source of cytoplasmic male sterility. *Plant Breed.*, vol. 101, s. 253 - 255.
- Prakash, S. ja Chopra, V.L. 1991. Cytogenetics of crop *Brassicac*s and their allies. Teoksessa: Tsuchiya, T. ja Gupta, P.K. (toim.) *Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, evolution*. Part B. Oxford: Elsevier. S. 161 - 180.
- Radke, S.E., Turner, J.C. ja Facciotti, D. 1992. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, vol. 11, s. 499 - 505.
- Rice, J.A., Keeler, S.J., Hirata, L.T., Beaman, C., Webber, P. ja Jones, T. 1994. Expression of synthetic high lysine seed storage proteins can significantly increase the accumulation levels of lysine in mature seeds of transgenic crop plants. *J. Cell. Biochem.*, vol. 18A, s. 107.
- Rouan, D., Montané, M.-H., Alibert, G. ja Teissié, J. 1991. Relationship between protoplast size and critical field strength in protoplast electropulsing and application to reliable DNA uptake in *Brassica*. *Plant Cell Rep.*, vol. 10, s. 139 - 143.
- Ryan, A.J., Royal, C.L., Hutchinson, J. ja Shaw, C.H. 1989. Genomic sequence of a 12S seed storage protein from oilseed rape (*Brassica napus* c.v. jet neuf). *Nucl. Acids Res.*, vol. 17, s. 3584.
- Rödin, J., Ericson, M.L., Josefsson, L.-G. ja Rask, L. 1990. Characterization of a cDNA clone encoding a *Brassica napus* 12 S protein (cruciferin) subunit. *J. Biol. Chem.*, vol. 265, s. 2720 - 2723.

- Rödin, J. ja Rask, L. 1990. Characterization of the 12S storage protein of *Brassica napus* (cruciferin): disulfide bonding between subunits. *Physiol. Plant.*, vol. 79, s. 421 - 426.
- Rödin, J., Sjö Dahl, S., Josefsson, L.-G. ja Rask, L. 1992. Characterization of a *Brassica napus* gene encoding a cruciferin subunit: estimation of sizes of cruciferin gene families. *Plant Mol. Biol.*, vol. 20, s. 559 - 563.
- Scheffler, J.A. ja Dale, P.J. 1994. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transg. Res.*, vol. 3, s. 263 - 278.
- Scheffler, J.A., Parkinson, R. ja Dale, P.J. 1993. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transg. Res.*, vol. 2, s. 356 - 364.
- Schenck, H.R. ja Hoffmann, F. 1979. Callus and root regeneration from mesophyll protoplasts of basic Brassica species: *Brassica campestris*, *B. oleracea* and *B. nigra*. *Z. Pflanzenzüchtg.*, vol. 82, s. 354 - 360.
- Scofield, S.R. ja Crouch, M.L. 1987. Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.*, vol. 262, s. 12202 - 12208.
- Shotwell, M.A. ja Larkins, B.A. 1989. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. Teoksessa: Marcus, A. (toim.) *The Biochemistry of Plants*. Vol. 15. *Molecular Biology*. San Diego: Academic Press. S. 297 - 345.
- Siebel, J. ja Pauls, K.P. 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 78, s. 473 - 479.
- Singh, M. ja Brown, G.G. 1991. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell* vol. 3, s. 1349 - 1362.
- Sjö Dahl, S., Rödin, J. ja Rask, L. 1991. Characterization of the 12S globulin complex of *Brassica napus*. *Eur. J. Biochem.*, vol. 196, s. 617 - 621.
- Sjödin, C. 1992. *Brassicaceae*, a plant family well suited for modern biotechnology. *Acta Agric. Scand., Sect. B, Soil and Plant Sci.*, vol. 42, s. 197 - 207.
- Sundberg, E. ja Glimelius, K. 1986. A method for production of interspecific hybrids within *Brassicaceae* via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci.*, vol. 43, s. 155 - 162.

- Sundberg, E., Landgren, M. ja Glimelius, K. 1987. Fertility and chromosome stability in *Brassica napus* resynthesised by protoplast fusion. Theor. Appl. Genet., vol. 75, s. 96 - 104.
- Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Physiol. Plant., vol. 79, s. 140 - 146.
- Warwick, S.I., Black, L.D. ja Anguinalgalde, I. 1992. Molecular systematics of *Brassica* and allied genera (subtribe Brassicinae, Brassiceae) - chloroplast DNA variation in the genus *Diplotaxis*. Theor. Appl. Genet., vol. 83, s. 839 - 850.
- Wiberg, E., Råhlen, L., Hellman, M., Tillberg, E., Glimelius, K. ja Stymne, S. 1991. The microspore derived embryo of *Brassica napus* L. as a tool for studying embryo-specific lipid biogenesis and regulation of oil quality. Theor. Appl. Genet., vol. 82, s. 515 - 520.
- Wojciechowski, A. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* L. and *B. oleracea* L. II. Morphological traits, somatic chromosome number, meiotic division and microsporogenesis. Genet. Pol., vol. 26, s. 437 - 445.
- Yarrow, S.A., Burnett, L.A., Wildeman, R.P. ja Kemble, R.J. 1990. The transfer of 'Polima' cytoplasmic male sterility from oilseed rape (*Brassica napus*) to broccoli (*B. oleracea*) by protoplast fusion. Plant Cell Rep., vol. 9, s. 185 - 188.
- Zhao, K.-N., Whitecross, M.I. ja Bittisnich, D.J. 1994. Studies on plant regeneration from cotyledonary protoplasts in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep., vol. 13, s. 164 - 170.