

Kauran jalostusominaisuuksiin vaikuttavien geenien paikantaminen

Pirjo Tanhuanpää¹⁾, Outi Manninen¹⁾, Alan Schulman^{1,2)}, Ruslan Kalendar²⁾, Marja Eurola³⁾, Veli Hietaniemi³⁾, Marja Jalli⁴⁾, Leena Pietilä⁵⁾, Elina Kiviharju¹⁾

¹⁾ MTT Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, ³⁾ MTT Palveluyksikkö, ⁴⁾ MTT Kasvintuotannon tutkimus, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

²⁾ MTT/BI Kasvigenomiikan laboratorio, Biotekniikan instituutti, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

⁵⁾ Boreal Kasvinjalostus Oy, Myllytie 10, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@boreal.fi

Tiivistelmä

Kauran lajikejalostuksella pyritään tuottamaan entistä satoisampia ja laadukkaampia lajikkeita. Bioteknisiä menetelmiä hyödyntämällä mahdollisuudet vastata rehu- ja elintarviketeollisuuden sekä viljelijöiden toivomuksiin paranevat. Kauran (*Avena sativa* L.) molekyylogeneettinen tutkimus on kehittynyt hitaasti verrattuna maailmanlaajuisesti tärkeämpiin viljalajeihin. Koska Suomi on kansainvälisesti suuri kaurantuottajamaa, on kilpailukykyisten lajikkeiden tuottaminen tärkeää. Tässä hankkeessa kehitettiin ja sovellettiin biotekniikan menetelmiä kotimaisen kauranjalostuksen tueksi.

Tutkittaviksi ominaisuuksiksi valittiin kauran sisältämä terveysvaikutteinen ravintokuitu β -glukaani, rehun energia-arvon kannalta tärkeä öljypitoisuus ja viime vuosina Suomeen levinnyt kauran lehtilaikkutauti. Tutkimuksessa koottiin yli kuusisataa DNA-merkkiä käsittävä geenikartta käyttäen pohjoismaista kauran risteytysjälkeläistöä, joka oli muokattu solukkoviljelyssä haploidiavaiheen avulla täysin yhtenäisiksi DH-linjoiksi. Kartan avulla paikannettiin tutkittuihin ominaisuuksiin vaikuttavia geenejä. Tutkimuksessa löydettiin muun muassa seitsemän öljypitoisuuteen, kaksi β -glukaaniin ja monta lehtilaikkutautiin vaikuttavaa kromosomialuetta. Lisäksi kartoitettiin viljelyominaisuuksiin vaikuttavia geenejä.

Ominaisuuteen vaikuttavan geenin lähellä sijaitsevia DNA-merkkejä voidaan käyttää näiden ominaisuuksien merkkiavusteisessa valintajalostuksessa. Haploidijalostustekniikat ja DNA-merkkiavusteinen valintajalostus ovat tämän päivän kauranjalostuksen ulottuvilla. Tulevaisuudessa nopeasti kehittyvät, koko genomin tutkimuksen eli genomiikan menetelmät tarjoavat lisävälineitä kauran ominaisuuksien periytymisen ymmärtämiseen ja jalostukseen.

Avainsanat: kaura, *Avena sativa*, solukkoviljely, geenikartoitus, geenit

Johdanto

DNA-merkit eli geenimerkit ovat molekyylibiologian työkaluja, joiden avulla voidaan muun muassa paikantaa tärkeisiin ominaisuuksiin vaikuttavia geenejä. Kauran molekyyligeneettistä tutkimusta on hankaloittanut sen suuri heksaploidi perimä. Tämä tarkoittaa sitä, että kromosomiston seitsemän kromosomin perussetti vastinpareineen on perimässä kolminkertaisena (yhteensä 42 kromosomia). Kauran molekyyligeneettistä tietoa on kuitenkin viime vuosina julkaistu enenevässä määrin. Heksaploidista kaurasta on jo olemassa geenikarttoja ja niitä on käytetty eri ominaisuuksiin vaikuttavien geenien paikantamiseen (esim. O'Donoghue ym. 1995; Jin ym. 2000; Kianian ym. 1999; De Koyler ym. 2004; Portyanko ym. 2001, 2005; Zhu & Kaeppler 2003).

Toivottuun ominaisuuteen riittävän läheisesti kytkeytyneen DNA-merkin avulla voidaan tätä ominaisuutta edustavat jalostuslinjat valita vaihtelevasta risteytysjälkeläistöstä. Koska valinnan perusteena käytetään DNA-merkkiä, itse ominaisuutta ei tarvitse mitata. Tällöin valintaa voidaan tehdä jo varhaisessa kasvun vaiheessa, ilman aikaa vieviä ja kalliita kemiallisia analyysejä ja kasvitautien tartutuskokeita. Lisäksi vältytään ympäristöolosuhteiden kuten säätekijöiden valintaa hankaloittavalta vaikutukselta: vaikka toivottu ominaisuus ei jonain vuonna näkyisi kasvin ilmiössä, sen aiheuttava geeni voidaan DNA-merkein todeta kasvin perimästä.

Kaksoishaploideista jalostuslinjoista eli DH-linjoista (doubled haploid) koostuva geenikartoitusp populaatio helpottaa geneettisen analyysin tekemistä (Graner 1996). Hyöty perustuu linjojen täydelliseen yhtenäisyyteen eli homotsygotiaan ja korostuu tutkittaessa perimältään kauran kaltaista lajia. DH-linjoja voidaan kauralla tuottaa ponsiviljelyn avulla.

Jalostustavoitteita on monia riippuen sadon käyttökohteista. Elintarviketeollisuutta kiinnostaa mm. β -glukaani, jota kaura sisältää runsaasti. Se on pääosin liukoinen ravintokuitu, joka vähentää riskiä sairastua sydän- ja sepelvaltimotauteihin. Rehulaadun kannalta tärkeimpiä jalostustavoitteita on energiamäärän lisääminen (Pullinen 1998), johon päästään mm. kauran öljypitoisuutta nostamalla. Etu on erityisen suuri hevosten rehussa (Kempe ym. 2001), joka on yksi vientikauran pääkohteista. Suomalaisen kauran markkinointi laadukkaana raaka-aineena on ollut helppoa, koska kasvitaukeja on esiintynyt oloissamme vain vähän. Muutaman viimevuoden aikana kauran lehtilaikkutauti (*Drechslera avenae*) on kuitenkin vallannut jalansijaa Suomessa (Kangas ym. 2002), ja se on syytä huomioida uusia lajikkeita jalostettaessa. Aina tärkeällä sijalla jalostuksessa ovat niin sanotut agronomiset ominaisuudet, kuten sato, hehtolitrapaino, tuhannen jyvän paino, pituus ja kasvuaika.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tehdä geenikartta käyttäen pohjoismaista kauran risteytysjälkeläistöä ja edistää merkkiavusteisen valinnan käytönottoa Suomen lajikejalostuksessa.

Aineisto ja menetelmät

Kasvimateriaali, kenttäkokeet ja ominaisuuksien analysointi

Geenikartoitusta varten Boreal Kasvinjalostus Oy risteytti jalostamansa Aslakin ja Svalöf-Weibull Ab:n lajikkeen Matildan, ja toimitti käyttöömmme kaksisataa F_1 -siementä. Täysin homotsygoottinen kaksoishaploidi kartoitusjälkeläistö, 148 DH-linjaa, tuotettiin ponsiviljelyn avulla (Kiviharju ym. 2005). Ponsiviljelyn tehokkuus oli keskimäärin 0,7 vihreää kasvia sataa eristettyä heteenponta kohden. Kasveista 61% (90 kpl) oli virtausytometrianalyysin perusteella haploideja ja käsiteltiin kolkisiinilla kromosomiston kahdentamiseksi. Lopuissa kasveissa kromosomisto oli kahdentunut spontaanisti. Siemensadot kerättiin talteen ja DH-linjat lisättiin kenttäkokeita ja ominaisuusanalyysijä varten kasvihuoneella ja pellolla. Kenttäkokeet tehtiin Jokioisissa vuonna 2005 yhden neliömetrin ruuduilla neljällä kerranteella, ja vuonna 2006 kuuden neliömetrin ruuduilla kolmella kerranteella. Kasvukausien säät poikkesivat huomattavasti toisistaan: vuoden 2006 kesä oli poikkeuksellisen lämmin.

Aslak \times Matilda DH-aineiston β -glukaani- ja öljypitoisuudet (raakarasva) määritettiin MTT:n Palvelulaboratoriossa molempien vuosien kenttäkoeäynteistä. β -Glukaanipitoisuus määritettiin kuorituista kauran ytimistä entsyymaattispektrofotometrisesti McClearyn ja Coddin (1991) -menetelmällä. Öljypitoisuus määritettiin gravimetrisesti. Tulokset esitetään prosentteina kuiva-aineesta. Kauran lehtilaikkutaudin kestävyys testattiin kahdella tauti-isolaatilla kasvihuonetestissä, joka oli kehitetty MTT:n projektissa: ”Pitkäkestoista lehtilaikkutautien kestävyyttä suomalaiseen ohraan ja kauraan”. Lisäksi aineistosta määritettiin tavanomaiset jalostukseen liittyvät viljely- ja laatuominaisuudet, mm. sato, tuhannen jyvän paino, hehtolitraino, kasvuaika, pituus, proteiinipitoisuus.

DNA-eristykset, DNA-merkit ja tilastolliset analyysit

DNA:t eristettiin kasvien lehdistä hieman muokatulla CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) - menetelmällä (Poulsen ym. 1993).

Tutkimuksessa käytettiin PCR (Polymerase Chain Reaction) -pohjaisia DNA-merkkejä: mikrosatelliitteja, REMAP- (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), IRAP- (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR- (Inter Simple Sequence Repeat), SRAP- (Sequence-Related Amplified Polymorphism), AFLP- (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP- (Single Nucleotide Polymorphism) ja SCAR- (Sequence Characterised Amplified Region) merkkejä, joista REMAP-, IRAP-, RAPD-, SCAR- ja ISSR-merkit havainnointiin agarosigeelillä, muut automaattisella sekvenssointilaitteella.

Geenikartta laadittiin JoinMap 3.0 (van Ooijen & Voorrips 2001) -ohjelmalla käyttäen kytkentäkriteerinä LOD (logarithm of odds) -arvoa 8.0 – 10.0. Geneettiset etäisyydet (cM=centiMorgan) laskettiin käyttäen Kosambin kartoitusfunktiota. Geenilokusten paikantamiseen käytettiin NQTL-ohjelmistoa

(Tinker&Mather 1995). DNA-merkkien segregaatio testattiin χ^2 -analyysin avulla. Ominaisuusdatan kuvailuun käytettiin SAS-ohjelmaa (Univariate Procedure, SAS Institute Ins., Cary, NC).

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Ominaisuuksien analysointitulokset

Vuoden 2005 kenttäkokeessa β -glukaanipitoisuudet olivat seuraavat: Aslak 4,6 %, Matilda 3,7 % ja Aslak \times Matilda DH-linjat välillä 2,8 - 5,9 % (keskiarvo 4,1 %). Vuoden 2006 kenttäkokeessa Aslak 3,7 %, Matilda 3,4 % ja DH-linjat välillä 2,7 - 4,8 % (keskiarvo 3,7 %).

Öljypitoisuuden suhteen vaihteluväli oli suurempi: vuonna 2005 Aslak 6,8 %, Matilda 9,7 % ja DH-linjat välillä 4,9 - 10,2 % (keskiarvo 7,8 %). Vuonna 2006 Aslak 7,4 %, Matilda 9,6 % ja DH-linjat välillä 6,2 - 10,1 % (keskiarvo 8,1 %). Korkean β -glukaanin, ja erityisesti muutamat erittäin korkean öljypitoisuuden omaavat Aslak \times Matilda DH-linjat ovat ponsiviljelyn avulla saavutetun geneettisen yhtenäisyytensä vuoksi erittäin kiinnostavaa aineistoa kauran lajikejalostukseen.

Lehtilaikkutaudin kasvihuonealtistuksessa vanhempien tautisuusluokat olivat isolaatilla 1 tartutettuna Aslak 7,6, Matilda 3,2 ja DH-linjat välillä 3,0 – 8,5 (keskiarvo 5,6). Isolaatilla 2 tartutettuna Aslak 5,7, Matilda 3,8, ja DH-linjat välillä 3,3 – 7,7 (keskiarvo 5,2). Luokitteluasteikon mukaan pienet arvot osoittavat kestävyyttä ja suuret alttiutta. Lehtilaikkutauti havainnoitiin kenttäkokeesta vuonna 2005. Varhaisen vaiheen havainto taudin ilmentymisvaiheessa Aslakista oli käytetyllä luokitteluasteikolla 3 ja Matildasta 1,5. Maksimaalisen infektiovaiheen havainto oli Aslakista 5,3 ja Matildasta 2,8. DH-jälkeläistössä tautisuus vaihteli tauti-infektion ilmentymisvaiheessa välillä 1,3 – 4,3 (keskiarvo 2,3) ja taudin maksimaalisessa esiintymisvaiheessa välillä 2,0 – 7,0 (keskiarvo 4,0). Lehtilaikkutautia ei esiintynyt vuonna 2006. Yllämainittujen ominaisuuksien jakaumat kyseisessä Aslak \times Matilda DH-kartoitusjälkeläistössä, sekä agronomisten ominaisuuksien tuloksia on esitetty julkaisussa Tanhuanpää ym. (2007).

Geenikartoitus

Alustava geenikartta on esitetty julkaisussa Tanhuanpää ym 2007. Kartan koostamiseen käytettiin 137:ää DH-linjaa. Tutkimuksessa löytyi 717 DNA-merkkiä, jotka olivat monimuotoisia risteytysvanhemmissa ja niillä analysoitiin koko DH-jälkeläistö. Merkeistä 625 sijoittui 28 kytkentäryhmään (ryhmissä enemmän kuin 4 merkkiä ja pituus yli 10 cM). Merkkien määrä ryhmissä vaihteli 6:sta 70:een. Kartan kokonaispituus oli 1526 cM. Jotkut ryhmistä kuuluvat todennäköisesti samaan kromosomiin, mutta sijaitsevat kromosomin eri varsissa, koska viljellyllä kauralla on vain 21 kytkentäryhmää.

Suuri osa DNA-merkeistä (54 %) segregoitui DH-jälkeläistössä poiketen odotetusta lukusuhteesta 1:1. Nämä merkit kasaantuivat usein tietyille alueille tai tiettyihin kytkentäryhmiin ja olivat yleensä vinoja Aslakin alleelin suuntaan (89 %). Vinosti segregoituneet merkit sijaitsevat todennäköisesti kromosomialueilla, joissa on elinkykyyn ponsiviljelyssä vaikuttavia geenejä. Koska Aslak toimii ponsiviljelyssä paremmin, sen alleelit vallitsevat jälkeläistössä. Ilmiö on yleisesti tunnettu eri lajien DH-jälkeläistöissä (Foisset & Delourme 1996, Manninen 2000).

QTL-analyyseissä löytyi seitsemän öljypitoisuuden vaikuttava kromosomialueita, joista neljä oli samoja kumpanakin havainnointivuotena. Kukin QTL selitti 11 – 29 % öljypitoisuuden vaihtelusta ja Matildan alleelit lisäsivät öljypitoisuutta. β -Glukaaniin vaikuttavia kromosomialueita löytyi kaksi, jotka yhdessä selittivät 37 % ominaisuuden vaihtelusta populaatiossa ja Aslakin alleelit lisäsivät β -glukaania.

Lehtilaikkutaudin kestävyttä testattiin kasvihuoneella kahdella eri isolaatilla ja havainnointiin peltokokeissa. Kasvihuonetestien perusteella löytyi neljä kestävyteen vaikuttavaa isolaatti-spesifistä kromosomialuetta (vaikutus 15 - 34 %). Peltokokeiden tuloksia käyttäen löytyi kolme kestävyteen vaikuttavaa aluetta, joista yksi oli sama kuin kasvihuonekokeiden perusteella löytynyt. Matildan alleelit lisäsivät lehtilaikkutaudin kestävyttä. Suurivaikutteisia kestävyysgeenejä lehtilaikkutautia vastaan ei Aslakissa tai Matildassa tiettävästi ole, vaikka virallisissa lajikekokeissa on havaittu eroja näiden lajikkeiden kenttäkestävyydessä, Matildan ollessa kestävämpi. Peltokokeiden perusteella löytyneillä kromosomialueilla saattaa siis esim. olla geenejä, jotka hidastavat taudin etenemistä.

Valkuaisainepitoisuuteen, hehtolitrapainoon, tuhannen jyvän painoon, saatoon, pituuteen, lakoon ja kasvu-aikaan vaikuttavia geenilokuksia voitiin myös sijoittaa kytkentäkartalle (tarkemmat tiedot posterissa). Eri vuosina saattoi löytyä eri määrä tiettyyn ominaisuuteen vaikuttavia lokuksia, mikä on ymmärrettävää, koska kyseessä ovat monimutkaisesti määräytyvät ominaisuudet, joihin ympäristöolosuhteet vaikuttavat. Vuodet 2005 ja 2006 olivat sääoloiltaan varsin erilaiset ja myös koeruudut olivat eri kokoisia, mikä vaikutti varsinkin sato-ominaisuuksien määrittämiseen. Tiedetyt kromosomialueet vaikuttivat useaan eri ominaisuuteen. Jalostajan kannalta jalostettaviin ominaisuuksiin vaikuttavien geenien sijainti lähekkäin voi olla sekä etu että haitta. Jos hyödylliset alleelit tulevat risteytyksessä samalta vanhemmalta, ne on risteytyksissäkin helpompi säilyttää mukana kun ne sijaitsevat samalla kromosomialueella. Jos taas halutaan yhdistää kahden eri vanhemman edulliset ominaisuudet jälkeläistössä, ominaisuuksiin vaikuttavien geenien sijaitseminen lähekkäin tekee jalostuksen työläämmäksi. Tarvitaan hyvin suuri jälkeläistö, jotta kyetään löytämään jälkeläislinja, jossa rekombinaatio on tapahtunut juuri niiden lähekkäin sijaitsevien geenien välissä.

Johtopäätökset

Tässä tutkimuksessa laadittiin ensimmäinen kauran geenikartta käyttäen pohjoismaista risteytysjälkeläistöä. Kartta on ainutlaatuinen myös siksi, että siinä käytettiin ponsiviljelyssä tuotettua DH-jälkeläistöä. Karttaan paikannettiin useita laatuun, agronomisiin ja taudinkestävyysominaisuuksiin vaikuttavia kromosomi-alueita. Kartan avulla kauranjalostaja saa tietoa näiden hyödyllisten ominaisuuksien periytymisestä. Lisäksi lähellä toivottuun ominaisuuteen positiivisesti vaikuttavaa geeniä olevia DNA-merkkejä voidaan käyttää merkkiavusteisessa valinnassa. Kaikki kartalle paikannetut ominaisuudet ovat sellaisia, joihin vaikuttaa useampi kuin yksi geeni, jolloin yksittäisen geenin vaikutus ei välttämättä ole kovin suuri. Tällöin DNA-merkeillä kannattaa valita useampaa geeniä yhtäaikaa.

Kirjallisuus

- Foisset, N. & Delourme, R.** 1996. Segregation distortion in androgenic plants. Teoksessa: Jain, M. S., Sopory, S. K. & Veilleux, R. E. (toim.) *In vitro* haploid production in higher plants. Vol 2 -Applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Graner, A.** 1996. RFLP-mapping the haploid genome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Teoksessa: Jain, S. M., Sopory, S. K. & Veilleux, R. E. (toim.) *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. s. 127-150.
- Jin, H., Domier, L. L., Shen, X. & Kolb, F. L.** 2000. Combined AFLP and RFLP mapping in two hexaploid oat recombinant inbred populations. *Genome* 43: 94–101.
- Kangas A., Kedonperä A., Laine A., Niskanen M., Salo Y., Vuorinen M., Jauhainen L. & Mäkelä L.** 2002. Viljalajikkeiden taudinalttius virallisissa lajikekoikeissa 1991–2001. MTT:n selvityksiä 9. Jokioinen: MTT. s. 43–45.
- Kempe, R., Särkijärvi, S., Saastamoinen, M., Ahtila, L. & Kommeri, U.** 2001. Kaura hevosten ja koirien ruokinnassa ja rehujen raaka-aineena. Teoksessa: Salovaara, H., Sontag-Strohm, T. (toim.). Kaurasta elinvoimaa: maa- ja metsätalousministeriön rahoittamat kansallisen kauraohjelman tutkimushankkeet 1998–2000. Helsingin yliopisto. Elintarviketeknologian laitos. EKT-sarja 1221: 109–126.
- Kianian, S. F., Egli, M. A., Phillips, R. L., Rines, H. W., Somers, D. A., Gegenbach, B. G., Webster, F. H., Livingston, S. M., Groh, S., O'Donoghue, L. S., Sorrels, M. E., Wesenberg, D. M., Stuthman, D. D. & Fulcher, R. G.** 1999. Association of a major groat oil content QTL and an acetyl-CoA carboxylase gene in oat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 884–894.
- Kiviharju, E., Moisander, S. & Laurila, J.** 2005. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant cell tissue and organ culture* 81: 1–9.
- de Koeber, D. L., Tinker, N. A., Wight, C. P., Deyl, J., Burrows, V. D., O'Donoghue, L. S., Lybaert, A., Molnar, S. J., Armstrong, K. C., Fedak, G., Wesenberg, D. M., Rossnagel, B. G. & McElroy, A. R.** 2004. A molecular linkage map with associated QTLs from a hulless x covered spring oat population. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1285–1298.
- Manninen, O.** 2000. Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 57–62.

- McCleary, B. V. & Codd R.** 1991. Measurement of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in barley and oats: a streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 55: 303–312.
- O'Donoghue, L. S., Kianian, S. F., Rayapati, P. J., Penner, G. A., Sorrels, M. E., Tanksley, S. D., Phillips, R. L., Rines, H. W., Lee, M., Fedak, G., Molnar, S. J., Hoffman, D., Salas, C. A., Wu, B., Autrique, E. & Van Deynze, A.** 1995. A molecular linkage map of cultivated oat. *Genome* 38: 368–380.
- Portyanko, V. A., Chen, G., Rines, H. W., Phillips, R. L., Leonard, K. J., Ochocki, G. E. & Stuthman, D. D.** 2005. Quantitative trait loci for partial resistance to crown rust, *Puccinia coronata*, in cultivated oat, *Avena sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 313–324.
- Portyanko, V. A., Hoffman, D. L., Lee, M. & Holland, J. B.** 2001. A linkage map of hexaploid oat based on grass anchor DNA clones and its relationship to other oat maps. *Genome* 44: 249–265.
- Poulsen, G. B., Kahl, G. & Weising, K.** 1993. Abundance and polymorphism of simple repetitive DNA sequences in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 994–1000.
- Pullinen, T.** 1998. Oats: A strategic Assessment. Prepared for the Finnish Ministry of Agriculture and Forestry. Sparks Companies, Inc, Memphis, TN, USA / Bio Business Consulting, Riihimäki, Finland.
- Tanhuanpää, P., Manninen, O., Schulman, A., Kalendar, R., Hietaniemi, V., Euro-la, M., Pietilä, L. & Kiviharju, E.** 2007. Kauran laatuominaisuuksien geenikartointi. In: Elina Kiviharju, Anneli Ritala, Alan Schulman, Leena Pietilä ja Pirjo Tanhuanpää (toim.). *Biotekniikka kauran jalostuksessa: Uudet menetelmät laadun parantamiseksi*. Maa- ja elintarviketalous 99: s. 8-33. Saatavissa internetistä: <http://www.mtt.fi/met/pdf/met99.pdf>
- Tinker, N. A. & Mather, D. E.** 1995. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *JAG* 1:2. Saatavissa internetistä: <http://wheat.usda.gov/jag>
- Van Ooijen, J. W. & Voorrips, R. E.** 2001. JoinMap® 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Zhu, S. & Kaeppler, H. F.** 2003. A genetic linkage map for hexaploid, cultivated oat (*Avena sativa* L.) based on an intraspecific cross 'Ogle/MAM17-5'. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 26–35.