

**Geeniteknologian hyväksikäyttö-
mahdollisuudet kotieläinjalostuksessa**

Sampo Sirkkomaa ja Matti Ojala
Kotieläinten jalostustieteen laitos

Helsinki 1988

Julkaisijat:

Kotieläinten jalostustieteen laitos, Helsingin Yliopisto, Viikki
Kotieläinjalostuslaitos, Maatalouden Tutkimuskeskus, Jokioinen

**GEENITEKNOLOGIAN HYVÄSIKÄYTTÖ-
MAHDOLLISUUDET KOTIELÄINJALOSTUKSESSA**

**Sampo Sirkkomaa
ja Matti Ojala**

Helmikuu 1988

Tiivistelmä

Tässä kirjallisuuskatsauksessa selvitettiin niitä yhdistelmä-DNA -tekniikkaan perustuvia menetelmiä, joilla voidaan tutkia kotieläinten perinnöllistä vaihtelua sekä kartoittaa ja muuntaa niiden genomia.

Vieraan geeniaineksen siirtämiseksi hedelmöityneen munasolun (tsygootin) tai kudosisolun genomien osaksi on olemassa useita menetelmiä. Onnistuneen siirron seurauksena tsygotista on mahdollista kasvattaa transgeeninen yksilö, jonka jokainen solu sisältää vieraan DNA:n genomissaan. On luultavaa, että geeninsiirtojen merkitys kotieläinjalostuksessa tulee olemaan suurin nk. radikaaleissa sovelluksissa (uusien aineenvaihduntapolkujen luominen eläimiin ja uusien tuotteiden kehittäminen).

DNA:n muuntelua voidaan tutkia restriktioentsyymien ja DNA-koettimien avulla. Tuloksia voidaan käyttää hyväksi populaation sisäisen perinnöllisen muuntelun selvittämisessä, merkkigeeniavusteisissa valintamenetelmissä sekä polveutumistutkimuksissa ja yksilöiden tunnistamisessa.

Geenikartoituksen alueella vallitsee uusi aikakausi, kun DNA-tekniikan avulla pystytään havaitsemaan suuri määrä muuntelevia merkkilokuksia. Nämä lokukset kyetään paikantamaan kromosomeihin nk. somaattisilla menetelmillä, minkä jälkeen mielivaltaisen muuntelevan lokuksen geneettiset etäisyydet merkkilokuksista voidaan määrittää perhetutkimuksilla.

Tutkimusten kohdistaminen DNA-tekniikalla löydettyjen merkkigeenien sekä kotieläintuotteiden laatuominaisuuksien ja eläinten tautiresistenssin välisten yhteyksien (kytkentöjen) selvittämiseen on perusteltua. Kotieläinten geenikartoituksesta kertyvät tulokset ovat tällöin avainasemassa. Valmiudet tältä alueelta kertyvien tutkimustulosten hyödyntämiseksi paranisivat huomattavasti, mikäli selvitettäisiin ensin olemassa olevien aineistojen pohjalta kotieläinten veriryhmien sekä veren proteiini- ja entsyymityyppien mahdolliset yhteydet tuotteiden laatuun sekä eläinten tautiresistenssiin, hedelmällisyyteen ja tuotantokykyyn.

S I S Ä L L Y S

JOHDANTO	1
1. Tausta	2
1.1. Perinnöllinen informaatio	2
1.2. Yhdistelmä-DNA -tekniikka	3
2. Geeninsiirtomenetelmiä	8
2.1. Somaattisten solujen yhtyminen	8
2.2. Kromosomivälitteinen geeninsiirto	9
2.3. Säteililytetyn sperman käyttö	9
2.4. Puhtaan DNA:n siirto	10
2.4.1. Transfektio	10
2.4.2. Transposonit	11
2.4.3. Virukset	13
2.4.4. Mikroinjektio	15
2.5. Geeninsiirron merkitys kotieläinjalostuksessa	20
3. DNA:n muuntelu ja merkkigeenit	27
3.1. Muuntelun havaitseminen	27
3.2. Merkitys kotieläinjalostuksessa	34
4. Geenikartoitus	38
4.1. Perhetutkimukset	38
4.2. Somaattiset menetelmät	40
YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	43
KIRJALLISUUSLUETTELO	45

JOHDANTO

Molekyyli­genetiikan ja sen tuloksia soveltavan geeniteknologian nopea kehitys viimeisten 10-15 vuoden aikana on asettanut kaikki eläin- ja kasvintuotantoon liittyvät alat uusien haasteiden eteen. Miten käyttää hyväksi ne mahdollisuudet, joita uudet tekniikat suovat esim. eläingenomin tutkimiseen ja muuttamiseen? Kotieläinjalostustieteessä on perinteisesti pyritty kehittämään valinta- ja risteytysmenetelmiä kotieläinten tuotantokyvyn parantamiseksi. Tässä onkin päästy erittäin hyviin tuloksiin. Nämä kvantitatiiviseen genetiikkaan perustuvat menetelmät hallitaan jo melko hyvin, ja niitä käytettäessä pystytään ennustamaan lähes minkä tahansa ominaisuuden muutos populaatiossa. On syytä korostaa, että valinta on toistaiseksi ainoa keino, jolla kvantitatiivisia ominaisuuksia ja koko genomia voidaan kehittää tasapainoisesti.

Tällä hetkellä on vielä epäselvää, miten kotieläinjalostuksen alalla pystytään hyödyntämään uusia geeniteknologisia menetelmiä varsinkin, kun kotieläinjalostuksessa tutkimusperinteet ovat lähes kokonaan kvantitatiivisen genetiikan alueella. Tämän katsauksen tavoitteena on kartoittaa geeniteknologian tähänastisia saavutuksia ja niitä osa-alueita, jotka kotieläinjalostuksen kehittämisen näkökulmasta vaikuttavat sovellutuskelpoisimmilta.

Katsauksessa käsitellään kotieläintuotannon bioteknologian osa-alueista vain geeniteknologiaa. Menetelmien yksityiskohdat on myös jätetty katsauksen ulkopuolelle, sillä alkuperäisartikkelit löytyvät helposti kirjallisuusviitteiden perusteella. Asettetusta tavoitteesta johtuen katsaus on lähinnä tiivistelmä geeniteknologian laajasta kentästä.

1. Tausta

1.1. Perinnöllinen informaatio

Eliöiden perinnöllinen informaatio sisältyy kromosomien DNA (deoksiribonukleiinihappo) -molekyylien rakenteeseen (esim. Lewin 1987). Kromosomin DNA on nukleotidiparien muodostama pitkä ketju. Kukin nukleotidi koostuu emäksestä, pentoosisokerista ja fosfaattiryhmästä. Jälkimmäiset kaksi ovat samanlaiset kaikissa nukleotideissa, joten niillä ei ole mitään tekemistä informaation kanssa. Emäksiä sen sijaan on neljä erilaista: adeniini (A), guaniini (G), sytosiini (C) ja tyymiini (T). Mahdolliset emäsparit ovat AT ja CG. Näin ollen jonkin DNA-molekyylin rakenne voidaan ilmaista sen emäsparien järjestyksenä, esim.:

GTACCTAGAC DNA-kaksoisketju (todellisuudessa kierremuodossa).
CATGGATCTG

DNA:n sisältämä informaatio on tallentunut emäsparien järjestykseen. Kussakin kromosomissa on yksi DNA-kaksoisketju, jonka pituus on tyypillisesti kymmenistä satoihin miljooniin emäspareihin. Esim. ihmissolussa on 46 kromosomia, joiden DNA-molekyylien yhteispituus on n. kuusi miljardia emäsparia. Geenit ovat DNA-molekyylin vyöhykkeitä, joiden pituus on keskimäärin muutama tuhat emäsparia (vaihtelu on suuri), ja joita nisäkkäillä arvioidaan olevan 50000-100000 kpl. Tällaisen vyöhykkeen paikkaa kromosomissa kutsutaan lokukseksi. Korkeammilla eliöillä (eukaryootit eli aitotumalliset) geeni jakautuu informatiivisiin DNA-jaksoihin (eksonit), joita ei-informatiiviset DNA-jaksot (intronit) erottavat. Lisäksi geenien välisillä kromosomialueilla on ei-informatiivista DNA:ta ja informatiivisen säätely-DNA:n vyöhykkeitä (geenien toiminnan säätely). Geenin toimiessa sen toisessa ketjussa oleva informaatio siirtyy RNA (ribonukleiinihappo) -mole-

kyyliin, joka on yksiketjuisen DNA:n kaltaista. Eräistä geneeistä kopioituja RNA-ketjuja (ribosomi-RNA ja siirtäjä-RNA) käytetään proteiinisynteesin mekanismeissa. Useimpien geenien tapauksessa RNA-ketju kuitenkin sisältää informaation jonkin proteiinin rakenteesta. Säättely-DNA:n sisältämän informaation tunnistavat tietyt molekyylit sellaisenaan. Geenit ja säättely-DNA yhdessä muodostavat perinnöllisen informaation, joka ohjaa solujen aineenvaihduntaa ja yksilönkehitystä olosuhteiden asettamissa rajoissa.

Informaatioteorian (Shannon 1948) käsitteillä ilmaistuna DNA sisältää sanoman, joka on koodattu neljällä merkillä (A,C,G,T). Esim., jos geenissä on 10000 emäsparia, olisi todennäköisyys oikean järjestyksen muodostumiselle satunnaisesti $(1/4)^{10000}$ (olettaen kaikki neljä merkkiä yhtä todennäköisiksi). Täten maksimi-informaatio olisi $-\log_2(1/4)^{10000}$ bittiä = 20000 bittiä. Todellisuudessa kyseisen geenin sisältämä informaatio on pienempi, koska geneeissä on usein paljon ei-informatiivisia jaksoja ja proteiinien koodi on ns. degeneroitunut. Koodin degeneroituneisuus tarkoittaa sitä, että useat eri emäsjärjestykset sisältävät informaation täsmälleen saman proteiinin rakenteesta. Jos tarkastellaan koko genomia, niin kaikkien geenien ja säättelyjaksojen yhteinen informaatio sisältö on luonnollisesti valtava.

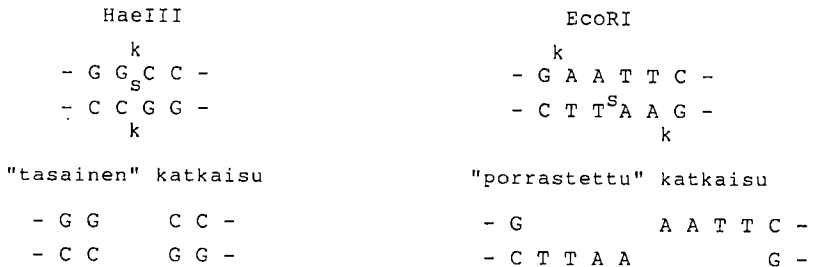
1.2. Yhdistelmä-DNA-tekniikka

DNA:n analyysin ja hallitun muuttamisen päätyökaluja ovat restriktioendonukleasit. Ne ovat entsyymejä, joista jokainen pystyy tunnistamaan tietyn lyhyen emäsjärjestyksen DNA-kaksoisketjussa ja katkaisemaan molemmat ketjut (esim. Smith 1979). Restriktioentsyymejä esiintyy monilla bakteereilla. Niiden teh-

tävänä on tuhota vieraat DNA-molekyylit pilkkomalla ne kappaleiksi. Bakterisolun oma DNA ei pilkkoudu, koska restriktioentsyymin tunnistamat kohdat siinä on metyloitu.

Yleensä restriktioentsyymin tunnistama järjestys käsittää 4-6 emäsparia, ja se katkaisee kummankin ketjun tällä alueella. Tunnistamiskohdassa on usein kaksinkertainen kiertosymmetria eli emäsparien järjestys on palindrominen, mikä havainnollistuu seuraavasta (s=symmetria-akseli, k=katkaisukohta):

restriktioentsyymin



Nykyisin tunnetaan yli 250 erilaista restriktioentsyyimiä. On selvää, että niitä käytetään pilkkomaan DNA-molekyyliä katkelmiksi, joita on helpompi käsitellä ja analysoida kuin alkuperäistä molekyyliä. Esim. HaeIII-entsyymin tunnistaman neljän emäsparin jakson esiintymistodennäköisyys DNA:ssa on $(1/4)^4 = 1/256$, jos kaikki emäkset ovat yhtä yleisiä. Entsyymin tunnistamien kohtien jakauma on satunnainen tarkasteltaessa koko genomia. Täten entsyymin käsittelemästä DNA:sta muodostuu pituuden suhteen jatkuva sarja katkelmia.

Yhdistelmä-DNA on molekyyli, joka sisältää osia aivan eri alkuperää olevista DNA-molekyyleistä. Koska kaikkien solujen geeniaines on DNA:ta, voidaan yhdistelmiä muodostaa minkä tahansa kahden tai useamman eliölajin geeniaineksestä. Yhdistelmä-DNA -tekniikka on perusta geeniteknologialle, jossa sitä soveltamalla pyritään kaupallisten tuotteiden kehittämiseen.

Yhdistelmä-DNA -tekniikassa (esim. Lewin 1987) jokin DNA-katkelma liitetään nk. vektorin eli siirtäjän genomiin. Vektorina käytetään plasmidia tai bakteriofaagia. Plasmidit ovat DNA-renkaita, jotka kykenevät replikoitumaan (lisääntymään) itsenäisesti bakteerisolussa. Jotkin plasmidit esiintyvät solussa 1-20 genomina, kun taas on olemassa plasmideja, joiden replikaation säätelymekanismi sallii niiden lisääntyä jopa 1000 genomiin solua kohti. Faagit ovat viruksia, jotka kykenevät tunkeutumaan bakteerisolun ja lisääntymään siellä. Faagin genomi on tavallisesti lineaarinen DNA-molekyyli.

Kuten aiemmin esitettiin, EcoRI:n katkaistessa DNA-molekyylin saadaan molekyyille yksiketjuiset päät. Lisäksi ne ovat komplementaariset, koska päiden emäsjärjestykset pystyvät pariutumaan täydellisesti (AT-emäsparit). Jos EcoRI:n tunnistamat alueet sijaitsevat sopivilla paikoilla vektoriin liitettävässä vierassa DNA:ssa, tapahtuu yhdistelmä-DNA:n muodostaminen seuraavasti (E = vieraan DNA:n ei-liitettäviä emäksiä, L = vieraan DNA:n liitettävät emäkset, V = tunnistamiskohdan ulkopuolisia emäksiä vektori-DNA:ssa):

vektori-DNA

-VGAATTCV-
-VCTTAAGV-

vieras DNA

-EGAATCLLLLLGAATTCE-
-ECTTAAGLLLLLCTTAAGE-

katkaisu EcoRI:llä

-VG
-VCTTAA

AATTCV-
GV-

-EG
-ECTTAA

AATCLLLLLG
GLLLLLCTTAA

AATTCE-
GE-

vektori-DNA:n ja liitettävän DNA:n pariutuminen
ja ketjujen yhdistäminen entsyymillä (DNA-ligaasi)

-VGAATCLLLLLGAATTCV-
-VCTTAAGLLLLLCTTAAGV-

yhdistelmä-DNA -molekyyli

Tämän menetelmän haittapuolena on, että jotkin vektorit palautuvat ennalleen komplementaarisella reaktiolla liittämättä itseensä vierasta DNA:ta (LLLLL). Toisaalta voi käydä niin, että joihinkin vektoreihin liittyy jono vieraan DNA:n katkelmia. Täten on välttämätöntä pystyä valitsemaan ne vektorigenomit, joissa on vain yksi kappale liitettävää DNA:ta. Menetelmän eräs hyvä puoli on, että vieraan DNA:n sisältävissä vektoreissa on valmiina EcoRI-kohdat liitetyn osan kummallakin puolella.

Eräessä toisessa menetelmässä sekä vektori-DNA:n että liitettävän DNA:n toisen ketjun päähän lisätään nukleotideja komplementaaristen päiden muodostamiseksi. Jos vektori-DNA on rengasmaisen, se on luonnollisesti ensin katkaistava jollain restriktioentsyymillä.

vektori-DNA	liitettävä DNA
-VVVVV	LLLLL-
-VVVVV	LLLLL-

adeniini- ja tyymiinukleotidien lisääminen terminaalitransferaasi-entsyymillä

<u>poly-A</u>	
-VVVVVAAAAAA	LLLLL-
-VVVVV	TTTTTTLLLLL-
	poly-T

vektori-DNA:n ja liitettävän DNA:n pariutumisen ja ketjujen yhdistäminen DNA-ligaasilla

-VVVVVAAAAAALLLLL-
-VVVVVTTTTTTLLLLL-
yhdistelmä-DNA -molekyyli

Terminaalitransferaasi on siis entsyymi, joka kykenee lisäämään samaa nukleotidia DNA-ketjun päähän. Vastaavasti voidaan käyttää guaniini- ja sytosiininukleotideja. Menetelmän etuna on, että mitkä tahansa DNA-päät kelpaavat. Sitä paitsi nukleotidien lisäämisen jälkeen on olemassa vain yksi mahdollinen pariutumis-

tapa: yhden liitettävän DNA-katkelman yhdistyminen vektori-DNA -molekyyliin. Plasmidivektorissa liitettävän DNA:n kummallakin puolella on pariutunut poly-A:poly-T -alue, koska plasmidin DNA on rengasmainen.

Kolmannessa menetelmässä DNA-molekyylien kytkemiseksi käytetään kemiallisesti syntetisoituja yhdistäjiä (linker), jotka ovat lyhyitä DNA-kaksoisketjuja. Yhdistäjä on yleensä 6-10 emäsparin pituinen ja se sisältää jonkin restriktioentsyymin tunnistaman emäsjärjestyksen. Yhdistäjä kytketään vektori-DNA:n tai liitettävän DNA:n kumpaankin päähän käyttämällä T4 ligaasi -entsyymiä, joka pystyy muodostamaan sidokset kahden tylppäpäisen (blunt-ended) DNA-kaksoisketjun välille. Seuraavassa esimerkissä on 10-emäsparinen yhdistäjämolekyyli, joka sisältää EcoRI:n tunnistaman emäsjärjestyksen:

liitettävä DNA

LLLLL
LLLLL

yhdistäjän lisääminen kummallekin puolelle T4 ligaasilla

yhdistäjä	yhdistäjä
CCGAATTCGG	LLLLLCCGAATTCGG
GGCTTAAGCC	LLLLLGGCTTAAGCC
EcoRI- kohta	EcoRI- kohta

katkaisu EcoRI:llä

AATTCGGLLLLLCCG
GCLLLLLGGCTTAA

EcoRI-komplementaaristen päiden
ympäröimä liitettävä DNA

Täten jotakin restriktioentsyymiä vastaavat komplementaariset päät voidaan kytkeä mihin tahansa DNA-molekyyliin. Tämä DNA liitetään sopivaan vektoriin kuten ensimmäisen menetelmän yhteydessä on selitetty. Kyseisellä restriktioentsyymillä on mahdollista eristää liitetty DNA-katkelma takaisin vektorista.

Faagivektorien tapauksessa viruksen omasta genomista usein poistetaan sellainen osa, joka ei ole välttämätön lisääntymiselle solussa, ja liitettävä DNA asetetaan sen tilalle.

Geeniteknologian olennainen osa on kloonauus, jolla muodostettu yhdistelmä-DNA -molekyyli (plasmidi- tai faagimuodossa) voidaan monistaa lähes rajattomasti. Plasmidivektorin tapauksessa bakteerisolun voi ottaa plasmidin transformaatioissa (DNA:n ottaminen väliaineesta solun sisälle). Faagivektorin tapauksessa bakteerisolut luonnollisesti infektoidaan faageilla. Sopivilla koejärjestelyillä voidaan tunnistaa ne solut, jotka sisältävät kimeerisiä plasmideja (yhdistelmä-DNA -genomi). Vastaavasti voidaan tunnistaa ne faagit, joilla on kimeerinen genomi ja jotka pystyvät lisääntymään bakteerisoluihin. Näiden toimenpiteiden jälkeen kloonauus on pelkästään viljelykysymys.

2. Geeninsiirtomenetelmiä

2.1. Somaattisten solujen yhtyminen

Kahden geneettisesti erilaisen solun yhtyminen soluviljelmässä (esim. nauta x hiiri) saa aikaan hybridisoluja, joissa on aluksi kaikki kromosomit kummastakin alkuperäisestä solusta (Ephrussi 1972). Lajien välisistä hybridisoluista häviää vähitellen suurin osa toisen alkuperäisen solun kromosomistosta. Täten solujen hybridisaatiolla voidaan siirtää kromosomeja vastaanottajasoluun (vastaanottajaksi määritellään se alkuperäinen solu, jonka kaikki kromosomit säilyvät hybridisolussa). Viljelyllä voidaan muodostaa hybridisoluklooneja, joista jokainen sisältää erilaisen valikoiman luovuttajasolun kromosomeja vastaanottajasolun diploidin kromosomiston lisäksi.

Luovuttajasoluja voidaan käsitellä siten, että niiden kromosomit sulkeutuvat nk. mikrosoluihin, joissa on yhdestä muuta-

maan kromosomia. Nämä solut voivat yhtyä vastaanottajasoluihin ja pystyvät siten siirtämään niihin yhden tai useampia luovuttajan kromosomeja (Fournier ja Ruddle 1977). Mikrosolumenetelmän etuna on, että vastaanottajasoluun jäävät kromosomit voidaan tietyissä määrin valita etukäteen.

2.2. Kromosomivälitteinen geeninsiirto

Metafaasivaiheessa olevia kromosomeja voidaan soluviljelmässä siirtää vastaanottajasoluihin (McBride ja Ozer 1973; Klobutcher ja Ruddle 1981). Kromosomit eristetään metafaasisoluihin ja erotellaan. Halutut kromosomit pannaan vastaanottajasolujen viljelyväliaineeseen. Ilmeisesti useimmat nisäkässolut pystyvät ottamaan kromosomeja sisään endosytoosilla (mekanismi, jolla vieras aines "nielaistaan" solukalvon läpi). Siirrettävä kromosomi paloittuu yleensä pieniksi katkelmiksi, joista suurimmat voi vielä havaita valomikroskoopilla vastaanottajasolun sisällä (Miller ja Ruddle 1978). Pienet katkelmat voivat liittyä vastaanottajasolun kromosomeihin, mikä luonnollisesti merkitsee useiden geenien siirtymistä.

2.3. Säteilytetyn sperman käyttö

Kasveilla suoritetuissa kokeissa hedelmöityvän solun transformaatio (tiettyjen merkkiominaisuuksien siirtyminen) on saatu aikaan käyttämällä säteilytettyjä siitepölyhiukkasia (esim. Jinks ym. 1981). Pandey ja Patchell (1982) päättelivät, että jos säteilytetyt siittiöt pystyvät pääsemään munasoluun aiheuttamatta solukalvossa niitä muutoksia, jotka estävät lisä-sperman sisäänpääsyn (nk. pseudofertilisaatio), niin siittiöt ja osa säteilytetystä spermasta tulevasta DNA-katkelmista voi liittyä yhdistyneisiin koiraan ja naaraan esitumiin. Käyt-

tämällä kanalla höyhenten ja munan väriä merkkiominaisuuksina saatiin jälkeläistössä aikaan 3.5 % transformoituneita yksilöitä (Pandey ja Patchell 1982). Menetelmä on teknisesti yksinkertainen, mutta transformoivat DNA-katkelmat ovat täysin satunnainen otos genomista.

2.4. Puhtaan DNA:n siirto

Mahdollisesti ensimmäisen yrityksen muuttaa eläingenomia ulkoisella DNA:lla teki Munro (1968) siipikarjalla. Kokeessa injektoitiin bantam-kanasta eristettyä DNA:ta valkoisen leghorn -rodun yksilöiden munasarjoihin ja kiveksiin. Injektoitujen yksilöiden muutamille jälkeläisille todellakin kehittyi tummia höyhenläikkiä ja bantam-tyyppinen kynsirakenne. Geenien siirtymisen toteamiseksi ei ollut vielä olemassa molekyylibiologisia tekniikoita. Eihän siirtyvää geeniaainesta pystytty mitenkään edes valikoimaan.

2.4.1. Transfektio

Transfektiossa eukaryoottisolun ottaa vastaan lisättyä DNA:ta, mikä vastaa transformaatioilmiötä bakteereilla. Graham ja van der Eb (1973) havaitsivat, että erään adenoviruksen DNA:n tunkeutumiskyky ihmisen kudosisoluihin lisääntyi huomattavasti saostamalla DNA kalsiumfosfaatilla. Käyttämällä transfektiota Wigler ym. (1977) kykenivät siirtämään tymidiinikinaasin geenin sisältävää DNA:ta sellaisiin hiiren kudosisoluihin, jotka eivät pystyneet muodostamaan tymidiinikinaasia. Saadut solukloonit sisälsivät tymidiinikinaasia, ja ne säilyivät satojen solusukupolvien ajan.

Transfektio toteutetaan pipetoimalla asianmukainen DNA-kalsiumfosfaatti -seos kudosisolujemälän solujen päälle.

Optimaalisissa olosuhteissa tietyillä solutyypeillä (esim. hiiren L-solut) 0.1-1.0 % soluista liittää vieraan DNA:n genomiinsa ja geenit ilmenevät. Tyypillinen onnistumisfrekvenssi on kuitenkin vain 10^{-7} - 10^{-5} . Vastaanottaneet solukloonit eristetään viljelmästä käyttämällä olosuhteita, jotka ehkäisevät lisättyä DNA:ta sisältämättömien solujen kasvun.

Geeninsiirron transfektiomenetelmät ovat melko helppoja ja halpoja, eivätkä ne vaadi erityistä laitteistoa. Ilmeisiä huonoja puolia ovat lisätyn DNA:n alhainen liittymisaste solun genomiin ja heikko ilmeneminen. Lisäksi siirrettävästä katkelmasta yhdistyy usein jono kopioita vastaanottajasolun johonkin kromosomiin. Eräs melko uusi fysikaalinen menetelmä geenien siirtämiseksi soluun on nk. elektroporaatio, jossa sähkövirta kuljettaa DNA:n suoraan solukalvon läpi (Neumann ym. 1982). Sillä on siirretty mm. ihmisen immunoglobuliini-kappa -geeni hiiren B-soluihin (Potter ym. 1984).

2.4.2. Transposonit

Transponoituvat elementit eli transposonit ovat DNA-jaksoja, jotka kykenevät liikkumaan uusiin paikkoihin genomissa (esim. Lewin 1987). Banaanikärpäsellä on genomissaan mm. P-elementtejä, joiden maksimipituus on 2900 emäsparia. P-elementin kummassakin päässä on sama 31 emäsparin jakso, mutta eri suuntiin. O'Hare ja Rubin (1983) eristivät P-elementin DNA:n. P-elementit transponoituvat tehokkaasti tietyissä olosuhteissa.

Spradling ja Rubin (1982) injektoivat P-elementin sisältävää yhdistelmä-DNA:ta Drosophila -alkioihin, joiden kannasta P-elementit puuttuivat. Osalla eloonjääneiden yksilöiden jäl-

keläistöstä näkyi P-elementin aiheuttamia mutaatioita. Näiden mutanttikantojen DNA:n analysointi osoitti, että P-elementtejä (1-5 kpl) oli asettunut vaihteleviin paikkoihin kromosomeissa. P-elementin ulkopuoliset jaksot yhdistelmä-DNA:ssa eivät olleet siirtyneet. Täten P-elementit olivat pystyneet siirtymään tehokkaasti yhdistelmä-DNA:sta ituradan kromosomeihin. Toisessa kokeessaan Rubin ja Spradling (1982) injektoivat silmänväriltään puutteellisen Drosophila -kannan alkioihin yhdistelmä-DNA:ta, jonka P-elementin sisään oli liitetty villityypin rosygeeni (eräs silmänvärialleeli). Tuloksena oli, että monien käsiteltyjen yksilöiden genomissa oli P-elementistä 1-2 kopiota, jotka periytyivät vakaasti seuraaviin sukupolviin. Muuntuneilla karpäsillä oli rosy-tyyppiset silmät, mikä osoitti geeninsiirron korjanneen täysin ja pysyvästi mutanttikannan vajavuuden. Scholnick ym. (1983) siirsivät P-elementtiä käyttäen dopadekarboksylaasin geenin Drosophila -genomiin. Vastaavasti saatiin siirtymään alkoholidehydrogenaasin geeni (Goldberg ym. 1983). Kummassakin tapauksessa geenit ilmenivät sopivissa kehitysvaiheissa, ja ilmeneminen rajoittui niihin kudoksiin, joissa nämä geenit normaalistikin toimivat.

Ei vielä tiedetä, voidaanko transposoneja käyttää tehokkaasti kuljettamaan haluttuja DNA-katkelmia nisäkässoluihin. Pitkällä tähtäyksellä transposonien käyttö voi osoittautua merkittäväksi keinoksi eläingenomin muokkaamisessa. Puhtaassa transfektiossa lisätyn DNA:n kohtalo ja sen myötä onnistuminen geeninsiirrosta on täysin solun rekombinaatiomekanismien armoilla. Transposonien käyttö DNA:n kuljettimina tekisi geeninsiirron tehokkaaksi ja tuloksen vakaaksi.

2.4.3. Virukset

Virusinfektio on eräs luonnollinen keino viedä geneettistä informaatiota soluihin, joten viruksia on käytetty kuljettimina geeninsiirtokokeissa. Jaenisch ja Mintz (1974) injektoivat SV40 -viruksen (simian virus) DNA:ta hiirialkioiden blastoseeliin. Tutkittaessa 25 hiirtä löydettiin 10 yksilön genomista SV40:n DNA. Jaenisch (1976) sekä Jähner ja Jaenisch (1980) osoittivat moloney-leukemiaviruksella, että on mahdollista liittää yksi kopio viruksen DNA:sta hiiritsygotin genomiin. Virus-DNA siirtyi jälkeläisiin kuten mendelistinen dominantti ominaisuus. On kehitetty useita hiirikantoja, joissa on tällainen virus-DNA (Mov-lokukset). Kantojen välillä on huomattavaa vaihtelua taudin puhkeamisajankohdan suhteen (Jähner ja Jaenisch 1980). Erään kannan yksilöiden verestä löytyy viruksia muutama viikko syntymän jälkeen ja ne saavat myöhemmin leukemian, kun taas erään toisen kannan yksilöiden verestä ei tavata viruksia. Ero ilmenemisessä ei johdu virus-DNA:n tilasta, joka pysyy muuttumattomana kummassakin kannassa. Vaihtelu aiheutuu todennäköisesti siitä, että virus-DNA ei liity samaan genomien kohtaan eri kannoissa (Jähner ym. 1980).

Moloney-virus on esimerkki nk. retroviruksista, joiden genomi on itse asiassa RNA:ta. Retrovirus tunkeutuu soluun, missä sen yksiketjuisen RNA:n sisältämä geneettinen informaatio kopioituu DNA-kaksoisketjun muotoon (esim. Lewin 1987). Tämä DNA pystyy liittymään yhtenä kopiona johonkin umpimähkäiseen kohtaan isäntäsolun genomissa, jolloin sitä kutsutaan provirukseksi. Provirus voi muuntua takaisin RNA-muotoon solun normaalissa transkriptiomekanismeissa, minkä jälkeen se pystyy muodostamaan uusia viruksia, jotka purkautuvat solusta

infektoimaan muita soluja. Onneksi on mahdollista käyttää nk. vajavaisia retroviruksia kuljettimina geeniaineksen siirtämisessä soluihin (esim. Joyner ym. 1983; Tabin ym. 1982). Virus tulee vajavaiseksi, kun sen rakennegeenit poistetaan. Vajavaisten virus ei pysty muodostamaan uusia viruksia. Kuljettimen tekemiseksi provirus-DNA eristetään ja liitetään sopivaan plasmidiin. Tämän jälkeen viruksen rakennegeenit korvataan siirrettävillä geneeillä käyttämällä yhdistelmä-DNA -tekniikkaa. Tietyllä menetelmällä (ns. auttajavirusten käyttö) saadaan muodostetuksi infektiivisiä viruksia, joissa on kyseinen yhdistelmä-DNA. Solun infektio näillä viruksilla sujuu normaalisti, koska ne sisältävät entsyymin (käänteinen transkriptaasi), jonka avulla virus pystyy tekemään DNA-kopion RNA-genomistaan ja liittämään sen solun genomiin.

Retrovirus kykenee infektoimaan useita solutyyppejä ja liittyminen kromosomeihin on pysyvä. Lähes 100 % soluista infektoituu ja ilmaisee virusvektoriin liitetyt vieraat geenit, mikä on huomattavasti parempi tulos kuin puhtaassa, passiivisessa transfektiossa. Soluja voidaan samanaikaisesti infektoida lähes rajaton määrä. Retrovirusta käytettäessä sopivissa olosuhteissa vektori-DNA liittyy ainoastaan yhtenä kopiona solun genomiin, kun taas esim. puhtaassa transfektiossa vieras DNA liittyy usein monistuneena jonona. Lisäksi, infektio ja vektori-DNA:n oleskelu kromosomissa ei yleensä vahingoita solua. Haittapuolena on, että vektori-DNA:n koko ei voi olla kovin suuri (< 8000 emäsparia) ja että virus voi rekombinoitua jonkin genomissa jo olevan proviruksen kanssa, jolloin siirrettävät geenit voivat jäädä ilmenemättä. Lisäksi, jotkin retrovirukset ovat kasvainviruksia, joten on olemassa pieni toden-

näköisyys, että ne saavat poistetut kasvaingeenit takaisin isäntäsolun genomista.

Infektoimalla varhaisia hiirialkioita retrovirustekniikkaa ovat käyttäneet menestyksellisesti Jaenisch (1976) ja Van der Putten ym. (1985) siirtämään geneettistä informaatiota hiiren iturataan. Salter ym. (1986) infektoivat varhaisia kana-alkioita retroviruksilla ja siirsivät viruksen geneettisen informaation kanan iturataan.

2.4.4. Mikroinjektio

Koska transfektiossa vieraan DNA:n liittyminen solun genomiin on melko tehotonta, alettiin tutkia suoran injektioin mahdollisuuksia. Capecchi (1980) osoitti, että liittymisastetta voidaan lisätä käyttämällä DNA:n injektiota viljeltyihin nisäkässoluihin. Anderson ym. (1980) siirsivät injektioilla tymidiinikinaasin geenin ja ihmisen globiinin geenin hiiren fibroblastisolun.

Mikroinjektiotekniikkaa käytetään pääasiassa kuljetta-
maan yhdistelmä-DNA:ta yksisoluisiin alkioihin. Jos DNA liittyy tällaisen alkion genomiin, se saadaan luonnollisesti siir-
retyksi yksilön kaikkiin soluihin. Näin saatua yksilöä kutsu-
taan transgeeniseksi.

Colman (1975) injektoi DNA:ta Xenopus laevis -sammakon munasoluihin ja oosyytteihin (munasolun kantasoluihin). Molem-
missa solutyypeissä esiintyi kyseisen DNA:n transkriptiota. Mertz ja Gurdon (1977) osoittivat, että Xenopus -oosyytissä lisätyn DNA:n transkriptio on vilkasta, jos DNA injektoidaan germinaalirakkulaan (oosyytin tumaan). Rusconi ja Schaffner (1981) injektoivat kaniinin beta-globiinin geenin hedelmöity-

neisiin Xenopus -munasoluihin. Geeni liittyi genomiin pitkinä toistuvien jaksojen sarjoina.

Hiiren munasolun mikroinjektiotekniikan kuvaili ensimmäisenä Lin (1966). Geeninsiirrossa vieras DNA mikroinjektoidaan useana satana lineaarisena kopiona tsygootin (hedelmöityneen munasolun) isänpuoleiseen eli siittiöstä tulleeseen esitumaan. Injektoidut tsygootit siirretään valeraskaiden naaraiden munanjohtimiin alkionkehityksen alkamista varten. Tsygootin isänpuoleinen esituma on melko suuri, joten oli luonnollista valita se injektion kohteeksi. Lisäksi tietyt tutkimukset olivat antaneet viitteitä, että varhainen isänpuoleinen esituma tsygootissa voisi olla suotuisa ympäristö lisätyn DNA:n liittymiselle genomiin (esim. Longo ja Kunkle 1977; Wagner ja Yun 1979, 1981; Laskey ym. 1977, 1978).

Kyseisessä vaiheessa siittiön kromosomit menettävät protamiinin säätelemän rakenteen ja saavat histoniproteiineihin sitoutuneen rakenteen. Samalla esiintyy runsaasti DNA:n rekombinaatiota ja korjaamista sekä vapaata kromosomaalista DNA:ta. Näin ollen esituman olosuhteet ovat suotuisat injektoidun DNA:n liittymiselle kromosomeihin.

Vieraiden geenien liittäminen hiiren iturataan mikroinjektiomenetelmällä onnistui lähes samanaikaisesti viidessä laboratoriossa (Gordon ym. 1980; E.F. Wagner ym. 1981; T.E. Wagner ym. 1981; Constantini ja Lacy 1981; Brinster ym. 1981). Näiden ja myöhempien kokeiden (esim. Gordon ja Ruddle 1981; Palmiter ym. 1982; Constantini ym. 1983; McKnight ym. 1983) tuloksena on olemassa hiirilinjvoja, jotka sisältävät genomeihinsa liittyneinä seuraavien yhdisteiden geenit: Herpes simplex -viruksen tymidiinikinaasi, kaniinin beta-globiini, ihmisen beta-globiini, ihmisen valkosolun interferoni, metal-

lotioneiini/rotan kasvuhormoni, metallotioneiini/Herpes -viruksen tymidiinikinaasi, kanan transferrini. Näistä kokeista herätti eniten huomiota se, jossa kehitettiin "jättiläishiiriä" injektioimalla eräs yhdistelmä-DNA (hiiren metallotioneiini-I -geenin promoottoriosaa + rotan kasvuhormonin geenin rakenneosaa) hiiritsygoottien esitumiin (Palmiter ym. 1982).

(Jonkin geenin promoottoriosaa liittyy sen rakenneosan transkription säätelyyn, ts. rakenneosaa vastaavan RNA:n synteessin säätelyyn.) Kokeissa on myös tutkittu siirrettyjen geenien kopioiden lukumäärää genomissa, liittymisen pysyvyyttä, siirtymistä seuraaviin sukupolviin ja ilmenemistä. Constantini ym. (1983) osoittivat, että kaniinin beta-globiinin geeni oli liittynyt peräkkäisinä kopioina useaan eri kohtaan hiiren kromosomistossa, kuten transfektiossakin usein tapahtuu.

Mikroinjektio menetelmän eräs haittapuoli on, että vain yksi solu kerrallaan voidaan käsitellä. Lisäksi injektio usein vahingoittaa tsygoottia. Injektoiduista ja siirretyistä hiiritsygooteista 10-20 % jää eloon, ja eloonjääneistä n. 20 % kehittyy transgeenisiksi yksilöiksi (Brinster ym. 1985). Transgeeniset hiirikannat eivät aina ole täysin onnistuneita. Eräässä transgeenisessä kannassa vieras geeni ei siirtynyt koiraiden kautta viiden tutkitun sukupolven aikana. Geeni oli ehkä liittynyt sellaiseen kohtaan genomissa, että se häiritsi jonkin spermatogeneesille tärkeän geenin toimintaa (Palmiter ym. 1984). Samassa tutkimuksessa havaittiin myös, että siirretyn geenin ilmenemisessä oli vaihtelua usean sukupolven aikana. Siirrettyjen geenien ilmenemiseen johtavista mekanismeista tiedetään erittäin vähän, ja toisinaan geeni ei ilmene lainkaan (esim. Gordon 1983). Wagner ym. (1984) havaitsivat yrittäessään homotsygoidia kuutta transgeenistä hiirikantaa siirre-

tyn geenin suhteen, että kaksi kantaa ei tuottanut lainkaan homotsygotteja, luultavasti sikiökuolemien johdosta. Transgeenisiin hiirikantoihin liittyy usein steriliteettiä ja muita fysiologisia ongelmia (esim. Gordon 1983; Church ym. 1985). Toisaalta hiiri toimii erinomaisena koe-eläimenä transgeenisten nisäkkäiden kehittämisessä, koska sen alkionkehityksen biologia, genetiikka ja molekyylibiologia tunnetaan paremmin kuin muilla nisäkäslajeilla.

Hiirellä ja kaniinilla tsygootin sytoplasma on läpikuultava, joten mikroinjektio esitumiin ei ole kovinkaan vaikeaa. Sen sijaan lampaalla, naudalla ja sialla tsygootin sytoplasma on läpikuultamaton siinä olevien lukuisten rakkuloiden johdosta, mikä vaikeuttaa mikroinjektiota esitumiin. Wall ym. (1985) ratkaisivat tämän ongelman sian osalta tsygootin sentrifugoinnilla, mikä saa esitumat näkyviin, mutta ei vahingoita tsygoottia. Myös nautatsygootin esitumat saadaan näkyviin sentrifugoimalla.

Käyttämällä pelkästään interferenssikontrastimikroskopiaa tai sitä ja sentrifugointia, Hammer ym. (1985a) onnistuivat ensimmäisinä muodostamaan transgeenisia kotieläimiä (Taulukko 1). Lampaalla vieraan geenin liittymisaste oli erityisen alhainen (1.3 %). Brem ym. (1985) saivat muodostetuksi transgeenisia kaniineja ja sikoja samankaltaisilla menetelmillä kuin Hammer ym. (1985a), ja liittymisasteetkin olivat samaa suuruusluokkaa (Taulukko 2). Clark ym. (1987) raportoivat ennakkotietoja kokeesta, jossa syntyneistä lampaista 8 % oli transgeenisia. Church (1987) raportoi kokeesta, jossa käytettiin kolmea erilaista yhdistelmä-DNA:ta mikroinjektioon naudalla. Siirretyistä 641 alkioista syntyi 126 elävää vasikkaa, joista seitsemän oli transgeenisia.

Taulukko 1. Tulokset ensimmäisestä onnistuneesta geeninsirrosta kotieläimillä (Hammer ym. 1985a).

Eläinlaji	Injektoitujen ja istutettujen tsg-goottien lukumäärä	Vastaanottaja-naaraiden lukumäärä	Siirrettyjen geenien liittymisasaste *)	Ilmenemisasaste **)	MT-hGH mRNA	plasman hGH
Kaniini	1907	73	28/218 = 12.8%	4/16	1/1	
Sika	2035	64	20/192 = 10.4%	11/20	11/18	
Lammis	1032	192	1/73 = 1.3%	em	em	

*) transgeenisten yksilöiden lukumäärä / injektoiduista tsggooteista kehittyneiden yksilöiden kokonaismäärä (yksilöt = sikiöt + elävinä ja kuolleina syntyneet)

**) positiivisten yksilöiden lukumäärä / testattujen yksilöiden lukumäärä

MT-hGH -yhdistelmä-DNA: hiiren metallotioneiini-I -geenin promottorisäätelyosa + ihmisen kasvuhormonin rakennegeeni

em: ei määritetty

Taulukko 2. Tulokset toisesta onnistuneesta geeninsirrosta kotieläimillä (Brem ym. 1985).

Eläinlaji	Injektoitujen ja istutettujen tsg-goottien lukumäärä	Vastaanottaja-naaraiden lukumäärä	Siirrettyjen geenien liittymisasaste *)	3/17 = 17.6%	1/15 = 6.7%
Kaniini	316	26			
Sika	268	10			

*) transgeenisten yksilöiden lukumäärä / syntyneiden yksilöiden kokonaismäärä (MT-hGH -yhdistelmä-DNA)

Geeninsiirtojen heikompi onnistumisaste kotieläimillä hiireen verrattuna ei todennäköisesti johdu niistä eroista, joita vääjäämättä on eläinlajien välillä. Kysymys on pikemminkin alkionkehitykseen ja molekyyli-tason fysiologiaan liittyvän tietämyksen vajavuudesta, epäonnistuneista alkion käsittelymenetelmistä sekä sopimattomista yhdistelmä-DNA -rakennelmista (Church 1987). Siirrettävän vieraan DNA:n (eksogeenisen DNA:n) toiminnan säätelystä solussa täytyisi tietää huomattavasti enemmän, esimerkiksi kuinka geenien säätelyosat (nk. regulaattorit, promoottorit ja enhancerit) muuttavat niiden ilmenemistä eli transkriptiota. Siirrettävän geenin transkriptio täytyisi lisäksi saada aikaan oikeassa kudoksessa oikeana ajankohtana. Eläintuotannon kannalta keskeisiä toimintoja säätelevät geenit täytyisi pystyä eristämään, ja ylipäänsä tietää enemmän kotieläinlajien genomien rakenteesta (esim. geenikartoitus). Kukin transgeeninen yksilö edustaa potentiaalisesti uutta eläinkantaa, koska siirretyn geenin sijainti kromosomistossa vaihtelee vastaanottajayksilöiden välillä. Sijainnin vaikutus geenin pysyvyyteen ja toimintaan saattaa olla suuri etenkin silloin, kun genomista ei poisteta mitään, vaan ainoastaan lisätään eksogeenista DNA:ta.

2,5. Geeninsiirron merkitys kotieläinjalostuksessa

Esitettyjen menetelmien hajanaisuudesta huolimatta niillä on selkeä, yhteinen päämäärä: siirrettävän DNA:n pysyvä liittäminen solun genomiin. Solu voi olla joko erilaistunut kudosiseläin tai hedelmöitynyt munasolu (tsygootti). Taivotteena on luonnollisesti saada aikaan transgeenisia eläimiä, joilla jokainen solu sisältää siirretyt, oikeassa kudoksessa oikeaan aikaan ilmenevät geenit. Perimmäinen syy geeninsiirto-

hin on, että halutaan luoda eläinkantoja, jotka tiettyjen ominaisuuksien puolesta ovat huomattavasti parempia kuin muut kannat ja joiden kehittäminen olisi hidasta tai ehkä mahdotonta perinteisillä jalostusmenetelmillä.

Kudosviljelmäsoluja voidaan ehkä käyttää kimeeritekniikassa, jossa muodostetaan alkioita yhdistämällä soluja eri lähteistä. Kimeerisiä kotieläimiä on pystytty kehittämään (esim. Fehilly ym. 1984; Butler ym. 1985). Transgeenisia soluja voitaisiin injektoida alkioiden blastokysteihin kimeeristen yksilöiden muodostamiseksi. Tapauksista, joissa injektoiduista soluista kehittyy iturata, saataisiin mahdollisesti aikaan transgeeninen eläinkanta. Kimeerisessä yksilössä olevien eri genomien osallisuus iturataan määräytyy vasta alkionkehityksen aikana, joten ei voida tietää etukäteen, kehittyvätkö itusolut injektoiduista soluista. Evans ja Kaufman (1981) kehittivät tekniikan, jolla voidaan viljellä hiirialkioista saatuja "pluripotentteja" soluja. Nämä nk. EK-solut ovat peräisin alkion siitä osasta, josta ituradan solut kehittyvät. Bradley ym. (1984) osoittivat, että injektoimalla EK-soluja alkion blastokystiin saadaan aikaan kimeerisiä yksilöitä. Jos EK-solulinjoja saataisiin muodostetuksi kotieläimistä, viljelmän soluihin voitaisiin tehdä geeninsiirtoja ja injektoida monipuolisesti testatut solut alkioihin. Täten olisi mahdollista päästä transgeenisiin eläinkantoihin kudosviljelmäsolujen avulla, tarvitsematta turvautua seurauksiltaan arvaamattomampaan tsygootin mikroinjektioon.

Smith ym. (1987) pohtivat transgeenisten eläinkantojen käyttöä jalostuksessa keskittyen taloudellisten ominaisuuksien kvantitatiivisiin muutoksiin nykyisissä tuotantojärjestelmissä. Hyödyllisiä transgeenejä (transgeeni = vastaanottajagenomin yh-

teen kohtaan liittynyt DNA) voisivat olla (1) suurivaikutukset tunnetut geenit, (2) aineenvaihduntapolkuja rajoittavat geenit ja (3) vierailta säätelyosilla varustetut geenit (ovat normaalin takaisinkytkentäsäätelyn ulkopuolella). Jos transgeenien liittymiskohtia ja lukumääriä genomissa ei voida säädellä, on kukin transgeeninen yksilö ja siitä peräisin oleva kanta ainoa laatuaan. Transgeenin periytymisen, pysyvyyden ja ilmenemisen sekä kysymyksessä olevan ominaisuuden ja koko kannan taloudellisen arvon määrittämiseksi tarvitaan laajoja testejä, ensin hemiotsygoottisessa (ilman vastingeeniä olevassa) ja sitten homotsygoottisessa muodossa.

Transgeeniset eläimet olisi syytä tuottaa nykyisistä jalostuksen ydinkannoista (nucleus) niiden arvon hyödyntämiseksi. Suurivaikutuksisen transgeenin tapauksessa nopein geneettinen edistyminen saattaisi seurata sen monistamisesta ja fiksoimisesta ydinkannassa. Jos transgeenejä on useita, ne voitaisiin koota yhteen transgeenilinjaan ja valita linjassa kokonaistaloudellisuusarvon perusteella. Tämä soisi uusien transgeenien jatkuvan tuonnin ja valinnan myös transgeeniyhdistelmien osalta sekä johtaisi nopeampaan geneettiseen edistymiseen kuin yksittäisten transgeenien tapauksessa. Mahdollisten ongelmien riskiä kannattaisi pienentää jättämällä pakastettuja alkioita ja pakastesiementä alkuperäisistä ydinkannoista tai ylläpitämällä kahta valintakantaa (alkuperäinen ja transgeeninen). Smith ym. (1987) korostavat, että onnistuneiden transgeenisten kantojen kehittäminen nopeuttaisi huomattavasti geneettistä edistymistä, mutta vaatisi paljon lisää testaus- ja arvostelutyötä eikä olisi täysin riskitöntä.

Ward ym. (1986) selvittivät geeninsiirron mahdollisia kohteita kotieläimillä. Solun rakenteiden ja organellien muodostu-

misesta vastaavat morfogeneettiset lokukset vaikuttavat ilmeisesti yhdistelminä, joten niiden geenistön muuttaminen aiheuttaisi todennäköisesti kauaskantoisia ja arvaamattomia seurauksia. Samoin geenimanipulaation ulkopuolelle voidaan jättää useimmissa soluissa ilmenevät "talousgeenit", (housekeeping), jotka koodaavat perusaineenvaihdunnan entsyymejä. On olemassa neljä aluetta, joilla tehtävillä geeninsiirroilla voitaisiin mahdollisesti tehostaa kotieläintuotantoa:

a. Hormonit ja kasvutekijät

Lukuisten peptidikasvutekijöiden ilmenemisen tason ja ajoituksen muuttaminen on tärkeä kohde geeniteknologiassa, jos jonkin ominaisuuden määrä on hormonien säätelemä. Tehtävissä täytyisi eristää joko hormonia koodaava geeni tai hormonin määrää säätelevää tekijää koodaava geeni, muuttaa kyseisen geenin säätelyosaa ja liittää geeni valitun eläinlajin genomiin. Hormonitason muuttamisen eräs etu on, että kudskohtainen ilmeneminen ei ole välttämätöntä verenkiertojärjestelmän kuljettaessa geenin tuotteen kohdekudokseen tuotantopaikasta riippumatta. Hiirellähän kasvuun on pystytty vaikuttamaan hormonin tuotannon säätelyllä (Palmiter ym. 1982; Hammer ym. 1985b). Kotieläimillä ruumiin koon kasvattaminen sinänsä ei ole ehkä tärkeää, mutta luuston kasvuun vaikuttavat selvästi kasvuhormoni ja sitä vapauttava tekijä sekä insuliininkaltainen kasvutekijä I. Maidontuotanto riippuu prolaktiini-induktiosta ja sitä voidaan lisätä huomattavasti kohottamalla kasvuhormonipitoisuutta. Hedelmällisyys on mutkikkaan hormonijärjestelmän säätelemä, mutta sitä voitaisiin ehkä lisätä muuttamalla yhden tai useamman osallisen hormonin pitoisuutta.

Hormoneilla ja kasvutekijöillä ei näytä olevan mitään entsyymaattista tehtävää, vaan ne ovat viestejä, jotka toimivat

kiinnittymällä solun aineenvaihduntaa laukaiseviin reseptoreihin. Hormonitasoihin vaikuttaminen on melko karkea työkalu ruumiin koostumuksen ja kudosten toiminnan muuttamiseksi, mikä voitaisiin toteuttaa paljon joustavammin, jos reseptorien tiheyteen ja jakaumaan pystyttäisiin vaikuttamaan suoraan.

b. Rakenneproteiinien muuntaminen

Tähän luokkaan kuuluvat ne geenit, jotka koodaavat tiettyjä erityisiä eläintuotteita. Esimerkiksi muuttamalla yhden tai useamman villan keratiinin geenin säätelyä, olisi mahdollista lisätä villan tuotantoa lampaalla. Maidon tuotantoon voitaisiin vaikuttaa muuntamalla kaseiinin geeniä. Tällaisiin toimenpiteisiin liittyy kuitenkin vaikeuksia. Ensinnäkin, useimmissa tapauksissa olisi välttämätöntä säilyttää muunnetun geenin kudokset ilmeneminen. Esimerkiksi villan keratiinin geenin ilmeneminen transgeenisen eläimen maksassa tai munuaisissa aiheuttaisi melko varmasti kuoleman. Geenin säätelyosa täytyisi pystyä tunnistamaan, ja sen säätelymekanismi täytyisi ymmärtää yksityiskohtaisesti. Säätelyosan muuntamisessa kudokset ilmeneminen pitäisi säilyttää, kun taas transkriptionopeus pitäisi muuttaa. Toiseksi, jos päämääränä on lisätä tietyn tuotteen määrää, on välttämätöntä, että geenin transkription taso on tuotantoa rajoittava tekijä. Näin ei aina ole, esimerkiksi villan tuotantoa rajoittaa lähtöaineen (substraatin) saatavuus. Havaintojen mukaan villarakkuloissa on ylenmäärin keratiinin lähetti-RNA:ta, joten transkriptio ei ole rajoittava tekijä.

c. Tautien vastustuskyky

Histokompatibiliteettilokuksen alleelien tiedetään liittyvän vastustuskykyyn tai alttiuteen tiettyihin sairauksiin. Sen vuoksi tämä lokuskompleksi on sovelias kohde geeninsiirrolle tai

geenimanipulaatiolle. Toinen mahdollisuus on kehittää transgeeninen eläinkanta, jolla on synnynnäinen vastustuskyky tiettyä sairautta kohtaan. Tautiresistenssiä koodaava toimiva immunoglobuliinigeeni voitaisiin eristää ja siirtää vastaanottajalajiin. Yleisesti ottaen tautien vastustuskyky voisi olla sovelias kohde geeninsiirroille, koska resistenssigeeneillä ei ehkä ole kovin mutkikkaita vuorovaikutuksia muiden geenien kanssa.

d. Uudet aineenvaihduntapolut

Geeninsiirron tärkein kohde on ehkä uusien entsyymaattisten polkujen kehittäminen johonkin kotieläinlajiin. Esimerkiksi voitaisiin yrittää palauttaa tietty useimmilla nisäkäslajeilla toimiva polku jollekin lajille, jolla se on tullut toimimattomaksi mutaation johdosta. Toisaalta jollekin lajille voitaisiin yrittää saada aikaan sellainen aineenvaihduntapolku, jota ei ole kyseisessä evoluutiolinjassa koskaan ollutkaan. Tässä tapauksessa polkua koodaavat geenit täytyisi eristää sopivasta eläinlajista, muuntaa ilmenemään valitussa kotieläinlajissa ja tehdä geeninsiirrot kyseiseen lajiin. Eräs konkreettinen kohde olisi kehittää lampaalle biosynteesipolku seriinistä kysteiiniin villan tuotannon lisäämiseksi. Kysteiinin pitoisuus veressä on villan kasvua rajoittava tekijä monissa ruokintajärjestelmissä. Yritykset lisätä kysteiinipitoisuutta ruokinnalla eivät kuitenkaan onnistu, koska bakteerit hajottavat pääosan lisätyistä kysteiinistä lampaan pötsissä. Kaikkien nisäkkäiden on saatava kysteiiniä ravinnossa, koska niiltä puuttuu sen synteesin polku. Tässä polussa seriinistä, asetyylikoentsyymi-A:sta ja rikkivedystä muodostuu kahden entsyymin (seriinitransasetyylaasi ja O-asetyyliiseriinisulfydrylaasi) toimesta kysteiiniä ja ase- taattia. Hypoteesina on, että näitä kahta entsyymiä koodaavat

geenit, siirrettyinä ja toimiessaan pötsin epiteelisoluissa, pystyvät katalysoimaan biosynteesipolun seriinistä kysteiiniin, joka sitten absorboituu ja kulkeutuu lampaan villarakkuloihin.

Samaan tapaan pitäisi olla mahdollista lisätä lysiinin saantia sialla kasvunopeuden parantamiseksi, tai naudalla maidon tuotannon parantamiseksi. Tiettyjen ravinteiden (esim. jotkin vitamiinit) tarve ravitsemuksessa voitaisiin poistaa kehittämällä niiden biosynteesipolut kotieläinlajeihin. Useimmat ravinnepolut ovat kuitenkin mutkikkaita sisältäen monia entsyymivaiheita, ja ne ovat usein tuotteiden ja välituotteiden monimutkaisesti säätelemiä, joten eläimen biokemian muuttaminen geeninsiirroilla ei ole mitenkään yksinkertaista.

Geeninsiirtojen mahdollisuuksia ei ole pohdittu pelkästään perinteisen kotieläintuotannon kannalta. Clark ym. (1987) tutkivat mahdollisuutta tuottaa ihmisen terapeuttisia proteiineja kotieläimillä. Kysymys on lähinnä ihmisproteiinien saamisesta transgeenisten nautojen maidosta. Onkin mahdollista, että geeninsiirto radikaalina menetelmänä tulee näyttämään voimansa radikaaleissa sovelluksissa (esim. uudet aineenvaihduntapolut, täysin uudet tuotteet). Toisaalta ei liene mielekäästä tuoda kotieläimiin luonnonvaraisista eläimistä sellaisia ominaisuuksia, joita voidaan hyödyntää suoraan alkuperäislajeista.

Kvantitatiivisten ominaisuuksien osalta on mahdollista, että niiden muuntelua sääteleviin lokuksiin tehtävien geeninsiirtojen merkitys jonkinlaisena ominaisuuksien määrällisenä lisääjänä jää vähäisemmäksi kuin usein kuvitellaan. Geeninsiirroista mahdollisesti saatava etu perinteisten jalostusmenetelmien suhteen on joka tapauksessa punnittava perusteellisesti (esim. monen lokuksen säätelemät ominaisuudet). Kvantitatiivisten ominaisuuksien muuntelua säätelevien lokusten lukumäärää,

sijaintia kromosomistossa, vaikutustapoja ja tuotteita ei yleensä tunneta. Tällaisia tuotanto-ominaisuuksia on pystytty jalostamaan menestyksellisesti perinteisillä menetelmillä, joiden tehokkuutta on mahdollista edelleenkin kehittää. Valinnalla voidaan muuttaa koko genomia tasapainoisesti tiettyyn tuotannollisesti edulliseen suuntaan, vaikka jalostajalla ei olisi aavistustakaan DNA-tason säätelymekanismeista.

3. DNA:n muuntelu ja merkkigeenit

3.1. Muuntelun havaitseminen

Restriktioentsyymien käyttö DNA:n pilkkomisessa (luku 1.2) toi mukanaan uuden menetelmän DNA:n muuntelun tutkimiseksi. Tässä menetelmässä DNA:n emäsparien järjestyksen muuntelu havaitaan muodostuvien DNA-katkelmien pituuden vaihteluna, jota kutsutaan RFLP:ksi (Restriction Fragment Length Polymorphism). Polymorfismilla tarkoitetaan, että populaatiossa on muuntelua tietyn kromosomijakson emäsjärjestyksen suhteen (esim. jonkin lokuksen eri alleelit). Aikaisemmissa menetelmissä, kuten entsyymipolymorfismien tutkimisessa, DNA:n muuntelu tietyssä lokuksessa pääteltiin proteiinien liikkuvuuden muuntelusta geeli-elektroforeesissa. Lähes samanaikaisesti Lewontin ja Hubby (1966) (Drosophila -tutkimus) ja Harris (1966) (ihmistutkimus) totesivat, että menetelmällä havaittavia proteiineja koodaavista lokuksista n. 1/3 oli polymorfisia tutkituissa populaatioissa. Lisäksi täytyy ottaa huomioon, että vain n. 30 % yhden emäsparimuutoksen aiheuttamista aminohappovaihdoksista näkyy liikkuvuuserona elektroforeesissa. Käyttämällä RFLP-menetelmää Jeffreys (1979) arvioi, että ihmisgenomissa keskimäärin joka sadas emäspari on polymorfinen ja että n. 1/100 näistä polymorfismeista voidaan havaita. Täten ihmispopulaatioissa

olisi n. 3×10^5 havaittavaa polymorfismia, koska ihmisen haploidissa genomissa on n. 3×10^9 emäsparia (nisäkäslajeilla yleensäkin kahdesta kolmeen miljardia emäsparia).

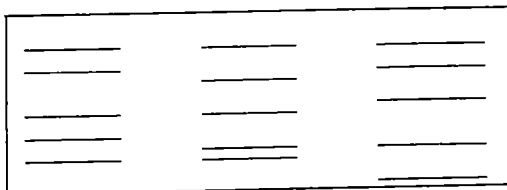
RFLP-menetelmää ryhdyttiin aluksi käyttämään ihmistutkimuksessa (esim. Grodzicker ym. 1974; Solomon ja Bodmer 1979; Botstein ym. 1980). Sitä on käytetty ihmissikiödiagnoseissa paljastamaan DNA:n emäsjärjestyksen muutoksia sairauden aiheuttavassa geenissä, kuten sirppisoluanemian diagnosoinnissa (Geever ym. 1981). Lisäksi RFLP-menetelmää voidaan käyttää välillisellä tavalla havaitsemaan geenejä, jotka ovat läheisesti kytkeytyneitä mutanttigeeniin ja joiden avulla voidaan seurata sen siirtymistä vanhemmista jälkeläisiin, kuten beta-talasseemian sikiödiagnosissa (Kazazian ym. 1980; Little ym. 1980). Täsmälleen samalla tavalla RFLP-menetelmää voidaan käyttää tunnistamaan kvantitatiivisiin ominaisuuksiin vaikuttavia polymorfisia lokuksia, tai tunnistamaan kvantitatiivisten ominaisuuksien lokuksiin (QTL, Quantitative Trait Locus) kytkeytyneitä polymorfisia lokuksia.

Restriktioentsyymien tekemän pilkkomisen seurauksena DNA:sta muodostuu pituuden suhteen jatkuva sarja katkelmia (luku 1.2). DNA-katkelmat voidaan erotella geelielektroforeesilla, koska katkelman pituus vaikuttaa siihen nopeuteen, jolla se kulkeutuu geelin huokosten läpi (esim. Lewin 1987). Tiedyt erityiset katkelmat voidaan havaita tästä sarjasta käyttämällä sopivaa koetinta (probe), joka kykenee pariutumaan vain tietyn emäsjärjestyksen kanssa. Koetin on siis DNA-pätkä, joka suotuisissa olosuhteissa kiinnittyy geelissä komplementaariseen DNA-katkelmaan tai katkelman osaan (emästen pariutumissääntö luvussa 1.1). Tätä varten geelin DNA-katkelmat siirretään kiinteälle nitroselluloosasuodattimelle säilyttäen katkelmien kulkeutumis-

etäisyydet (Southern 1975), ja suodatin käsitellään radioaktiivisesti leimatuilla koetinmolekyyleillä. Pariutumattomat koettimet huuhdellaan pois, suodatin kuivataan ja asetetaan valokuvausfilmiä vasten radioaktiivisuuden näkemiseksi. Kehitetyssä filmissä näkyvät vain ne katkelmat, joiden kanssa koetinmolekyylit ovat pariutuneet:

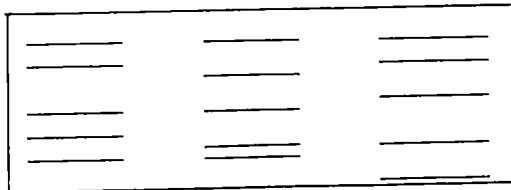
	Eläin 1	Eläin 2	Eläin 3
eristäminen			
	DNA	DNA	DNA
pilkkominen			
	katkelmat	katkelmat	katkelmat
elektroforeesi			

geelilevy, jossa
katkelmien
juovat



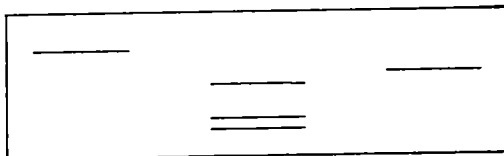
siirto

suodatin-
kalvo



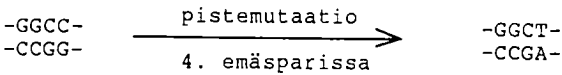
koettimen lisäys
ja suodatin
filmiä vasten

filmi, jossa näkyvät
vain ne katkelmat,
joihin koetin
kiinnittyi



Käytettävien DNA-koettimien ei tarvitse vastata minkään tunnetun geenin emäsjärjestystä. Mikä tahansa koettimen emäsjärjestys käy, jos se vain vastaa jonkin katkelman jotakin osaa ja kykenee täten pariutumaan sen kanssa. Työn yksinkertaistamiseksi nykyisin tutkitaan tekniikkaa, jossa koettimen merkitsemisessä ei tarvita radioaktiivisuutta.

Mutaatioiden johdosta DNA:sta voi hävitä tai siihen voi tulla restriktioentsyymien tunnistamia alueita. Esimerkiksi HaeIII (luku 1.2) tunnistaa seuraavan emäsparijärjestyksen, joka voi muuttua mutaatiossa mm. kuvatulla tavalla:



Jälkimmäistä emäsparijärjestystä HaeIII ei pysty tunnistamaan, joten siltä kohdalta DNA-ketju jää katkaisematta. Täten restriktioentsyymi ei aina katkaise tietyn kromosomin DNA:ta samoissa kohdissa, vaan kromosomien välillä on vaihtelua katkaisukohtien suhteen. Esimerkiksi tarkastellaan jotakin erityistä kromosomiparia. N yksilön suuruisessa populaatiossa näitä kromosomeja on $2N$ kpl, ja populaatiota sanotaan tietyn restriktiokohdan suhteen polymorfiseksi, jos kohta puuttuu 1:stä ($2N-1$):een kromosomista. Yksilö puolestaan voi olla kohdan suhteen homo- tai heterotsygootti, mikä ilmenee analyysissä seuraavasti (k = tietyn restriktioentsyymin katkaisukohta, A = koettimen kanssa pariutuva alue):

alueilla ja geenien introneissa (näillä DNA-vyöhykkeillä on keskimääräistä korkeampi mutaatiotaajuus niiden ei-informatiivisesta luonteesta johtuen), näiltä polymorfismeilta voi usein puuttua toissijaiset pleiotrooppiset vaikutukset kvantitatiivisiin ominaisuuksiin. Lisäksi RFL-polymorfismeilla voidaan odottaa olevan ns. kodominantti ilmenemismuoto (heterotsygootissa alleeleilla on toisistaan riippumattomat vaikutukset), mikä onkin havaittu (esim. Botstein ym. 1980). Eräs tärkeä RFL-polymorfismien etu biokemiallisiin ja muihin merkkigeeneihin nähden on, että ei ole välttämätöntä käyttää elävää kudosta analyysissä. Pelkät varastoidut DNA-näytteet riittävät.

Hyödyllisten RFL-polymorfismien (alleelifrekvenssit välillä 0.1-0.9, Soller ja Beckmann 1985) havaitsemiseksi tarvitaan useita restriktioentsyymejä ja koettimia siitä huolimatta, että havaittavien nukleotidiparipolymorfismien lukumäärä esim. ihmispopulaatioissa on suuruusluokkaa 3×10^5 (Jeffreys 1979; Murray ym. 1984). Jeffreys (1979) havaitsi ihmisellä yhden harvinaisen ja kaksi hyödyllistä polymorfismia käyttämällä beta-globiinin geenin koetinta ja kahdeksaa entsyymiä. Murray ym. (1984) löysivät ihmisgenomista kahdeksan polymorfista kohtaa käyttämällä kolmea koetinta ja 27 entsyymiä. Soller ja Beckmann (1985) arvioivat, että yhden hyödyllisen RFL-polymorfismin löytämiseksi täytyy testata 10-20 koetin x entsyymi - yhdistelmää.

Geneettistä analyysiä ja jalostustarkoituksia varten kvantitatiiviseen ominaisuuteen vaikuttava lokus saisi olla korkeintaan 20 cM:n (centiMorgan) etäisyydellä jostakin merkikilokuksesta (Soller ym. 1976). Lange ja Boehnke (1982) johtivat lausekkeen tarvittavalle merkkilokusten lukumäärälle, jotta jokainen genomien kohta olisi tietyn etäisyyden sisäpuolella

jostakin merkkilokuksesta. Lausekkeen avulla voidaan laskea, että 20 cm:n etäisyydelle (80 % genomista katettu) 2500 cm:n pituisessa genomissa tarvittava satunnaisesti sijoittuvien polymorfisten merkkilokusten lukumäärä on 128. Simulointitutkimuksessa (Kashi ym. 1986) vastaavilla arvoilla tarvittava merkkilokusten lukumäärä oli jonkin verran pienempi. Genomin kokonaisäkkäillä on 2000-3000 cm:n suuruusluokkaa, joten monilla kotieläinlajeilla genomin kattaminen RFLP-merkkilokuksilla 80 %:sti edellyttäisi n. 2000 koetin x entsyymi -yhdistelmän käyttöä (esim. 300 koetinta ja seitsemän entsyymiä).

Jeffreys ym. (1985) löysivät koetinluokan, jolla havaitaan erittäin muuntelevia toistuvia jaksoja ihmisen DNA:ssa. Kukin muunteleva alue eli minisatelliitti sisältää lyhyen emäsparijärjestyksen (ydinjärjestys) peräkkäin toistuneena, ja polymorfismi johtuu toistuvien yksikköjen lukumäärän erosta alleelien välillä. Minisatelliitin pituuden vaihtelu voidaan havaita käyttämällä mitä tahansa restriktioentsyymiä, joka ei katkaise toistuvaa yksikköä. Toistuvista ydinjärjestyksistä koostuvat koettimet paljastavat samanaikaisesti monia hypermuuntelevia minisatelliitteja ihmisen genomissa. Kukin elektroforesissa näkyvä nauha edustaa eripituista DNA-aluetta, joka on pariutunut ydinjärjestystä vastaavan koettimen kanssa. Nämä nauhat ovat täysin yksilökohtaisia ("DNA-sormenjälki"), ja ne paljastuvat sekä somaattisista että ituradan soluista. Koska minisatelliittilokukset ovat hajallaan kromosomistossa ja monialleelisia, niitä voidaan käyttää erinomaisesti geneetiseen analyysiin korkeiden heterotsygotia-asteiden ansiosta (esim. yksilön tunnistaminen). Useimmat RFLP-polymorfismit ovat vain kaksialleelisia (restriktioentsyymien katkaisukohdan olemassaolo), ja ne ovat täysin hyödyttömiä polveutumistutkimuk-

nessa, jos avainyksilöt ovat homotsygootteja. Hypermuuntelevia minisatelliittilokuksia on myös kotieläinlajeilla, joten niitä voitaisiin käyttää kuten ihmisellä. Kustannukset hyödyllisten merkkigeenien löytämiseksi minisatelliittimenetelmän avulla olisivat RFLP-analyysejä vähäisemmät.

3.2. Merkitys kotieläinjalostuksessa

Beckmann ja Sollier (1987) pohtivat DNA-tekniikan menetelmien havaittavan muuntelun merkitystä kotieläinjalostukselle. Heidän mukaansa lopullinen päämäärä on kvantitatiivisten ominaisuuksien muuntelun saaminen mendelistisen genetiikan piiriin, jolloin yksilön arvo näiden ominaisuuksien suhteen voitaisiin nähdä suoraan sen DNA:sta. Täten genotyypistä arvoa ei tarvitsisi estimoida biometrinen menetelmien avulla. Tavoite on todella kunnianhimoinen ja vaikea saavuttaa, mutta osittain onnistuminen merkkigeeniavusteisessa valinnassa saattaa hyvinkin osoittautua DNA-tekniikan pääanniksi kotieläinjalostukselle (Womack 1987).

Jonkin RFLP-lokukseen välitön vaikutus johonkin kvantitatiiviseen ominaisuuteen (QT) voitaisiin havaita vertaamalla RFLP-genotyyppien fenotyyppisiä keskiarvoja populaatiossa tai RFLP-alleelien frekvenssejä hyvien ja huonojen fenotyyppiryhmien välillä (Beckmann ja Sollier 1987). Koska jonkin QT-lokukseen positiivisten ja negatiivisten alleelien vaikutukset ovat todennäköisesti pieniä verrattuna muihin muuntelua aiheuttaviin tekijöihin, olisi välttämätöntä mitata suuret määrät yksilöitä välittömien vaikutusten havaitsemiseksi. Merkittävästi vaikuttavia QT-lokuksia, joissa on segregoituvia positiivisia ja negatiivisia alleeleja, on todennäköisesti melko vähän (10-20 yhdelle ominaisuudelle, 100-200 kaikille tuotanto-ominaisuuksil-

le yhteensä). Sama pätee niille QT-lokuksille, joiden suhteen kahden populaation välillä on alleelieroja. Koska ns. korkeampien eukaryoottien (esim. nisäkkäät) genomissa arvioidaan olevan 50000-100000 koodaavaa geeniä ja koska useimmat QT-geenien toimintaan vaikuttavat pistemutaatiot eivät muuta restriktio-kohtia, on selvää, että umpimähkäinen koetin erittäin todennäköisesti ei havaitse jotakin välitönvaikutuksista RFL-polymorfismia. Tätä todennäköisyyttä voidaan lisätä käyttämällä koettimina niitä kloonattuja geenejä, joilla on tärkeitä fysiologisia tehtäviä (esim. MHC-glykoproteiinien, interferonien ja erilaisten proteiinihormonien geenit). Beckmann ym. (1986) havaitsivat RFLP:n kasvuhormonin geenin lokuksessa naudalla. Lisäksi naudalla on löydetty RFL-polymorfismeja käytettäessä koettimina interferonien, fibronektiinin ja krystalliinien geenejä (Womack 1987). Tällaiset RFL-polymorfismit ovat tärkeitä ehdokkaita etsittäessä välittömiä vaikutuksia QT-ominaisuuksiin.

Kun jollakin RFLP-alleelilla tai -haplotyypillä (useiden rajoitetulla kromosomialueella olevien alleelien yhteenliittymä) on havaittu olevan välitön vaikutus johonkin taloudellisesti tärkeään ominaisuuteen, jo muutaman sukupolven valinta riittää sen frekvenssin huomattavaan nostamiseen. Lisäksi tällainen alleeli tai haplotyyppi voidaan helposti viedä populaatiosta toiseen sopivilla risteytyksillä (introgressio). Välittömien, suurien RFLP-vaikutusten löytäminen saattaa olla hankalaa, mutta niiden taloudellinen merkitys olisi huomattava.

Useilla RFL-polymorfismeilla voidaan odottaa olevan välillisiä, kytkennästä johtuvia vaikutuksia QT-ominaisuuksiin. RFLP-QTL -kytkentä voidaan havaita tutkimalla RFLP-genotyypin keskimääräisten fenotyyppi-arvojen välisiä eroja kahden toisistaan sekä RFLP-lokuksissa että ominaisuuden määrässä eroavan populaation välisen risteytyksen F_2 -polvessa. Tällaisten tut-

kimusten avulla voidaan määrittää, eroavatko populaatiot QTL-lokusten sisällön suhteen ja voiko niitä täten käyttää hyödyllisten alleelien lähteinä yksi- tai kaksisuuntaisissa introgressio-ohjelmissa. Haluttuihin QTL-alleleihin kytkeytyneitä RFLP-alleleja voidaan käyttää seuraamaan edellisten introgressiota luovuttajapopulaatiosta vastaanottajapopulaatioon. Jokaisessa takaisinristeytyskuvopolvessa valittaisiin haluttuihin QTL-alleleihin liittyneiden (coupling) RFLP-alleelien perusteella, säilyttäen tällä tavalla haluttujen luovuttajapopulaation alleelien korkeat frekvenssit. Valitsemalla samaan aikaan niitä RFLP-alleleja vastaan, jotka eivät ole liittyneitä haluttuihin QTL-alleleihin, saataisiin nopeasti poistetuksi ei-halutut osat luovuttajagenomista.

Merkkigeeniavusteisen introgression eräs sovellus olisi tilanne, jossa luovuttajarotu (esim. jokin luonnonvarainen rotu) on hyvä jonkin ominaisuuden suhteen, kun taas vastaanottajarotu on muutoin taloudelliselta arvoltaan ylivertainen. Esimerkiksi FAO tutkii nykyään RFLP-avusteisen introgression mahdollisuutta eräänä keinona tuoda trypanotoleranssin geenit vastustuskykyisestä Länsi-Afrikan N'dama-nautarodusta tartunta-alttiisiin seebupopulaatioihin. Merkkigeeniavusteista introgressiota voitaisiin käyttää myös paljastamaan piilevää, hyödyllistä geneettistä muuntelua. Esimerkiksi siipikarjatuotannossa kaikki jalostetut ja kaupalliset munijakanat ovat linjantai roturisteymiä, joiden vanhemmat otetaan puhdaslinjaisista tai -rotuisista, keskenään lähes yhtä korkeatuottoisista populaatioista. Kuitenkin nämä populaatiot voivat olla erilaisia geneettiseltä koostumukseltaan. RFLP-QTL -kytkentäanalyysia käyttämällä saattaa olla mahdollista tunnistaa linjantai rotukohtaisia hyödyllisiä alleleja vanhempaispopulaatioissa ja

kaksisuuntaisella introgressiolla parantaa kummankin vanhempais-
tyypin taloudellista arvoa, ja seurauksena myös risteymän arvoa.

Populaatiossa, jossa segregoituu alleeleja sekä RFLP-lo-
kuksessa että siihen kytkeytyneessä QT-lokuksessa, vallitsee
ns. kytkentätasapaino, jos kaksilokuksisten genotyyppien frek-
venssit määräytyvät satunnaisesti kummankin lokuksen alleeli-
frekvenssien perusteella. Täten RFLP-lokuksen genotyyppien kes-
kimääräisten fenotyyppi-arvojen ei voida odottaa eroavan toisis-
taan. Kuitenkin missä tahansa kyseisen kromosomin edustajassa
tässä populaatiossa tietty RFLP-alleeli on liittynyt tiettyyn
QTL-alleeliin, joko positiiviseen tai negatiiviseen. Näin ollen
tiettyjä RFLP-alleeleja sisältävät kromosomit eroavat arvoltaan
ominaisuuden suhteen, jos niissä on eri alleelit QT-lokuksessa.
Tätä voitaisiin tutkia tuottamalla keinosiemennyksen avulla
suuri määrä jälkeläisiä esim. jollekin sonnille. Isän hetero-
otsygoottisista RFLP-lokuksista eri alleelit saaneet jälkeläiset
eroavat toisistaan RFLP-lokusten läheisten kromosomialueiden
osalta, mutta muutoin niillä on rekombinaation johdosta yhtei-
nen geneettinen tausta. Jos jonkin RFLP-lokuksen läheisyydessä
on segregoituva QTL, eroavat RFLP-alleeliltaan erilaiset jäl-
keläisryhmät fenotyyppi-arvoltaan toisinaan enemmän kuin mikä
selittyy pelkällä otantamuuntelulla. Täten tällaisten jälke-
läisryhmien keskiarvojen vertailu voisi toimia testinä segre-
goituvan QT-lokuksen olemassaololle kyseisen RFLP-lokuksen vä-
littömässä läheisyydessä (Beckmann ja Soller 1987).

Eräs mahdollinen RFLP-QTL -kytkennän sovellus olisi nuor-
sonnien valinta naudanjalostuksessa. Ehdotetussa ohjelmassa
(Beckmann ja Soller 1987) nuorsonnien tuottamiseen käytettäviltä
jälkeläisarvostelluilta valiosonneilta tutkittaisiin seg-
regoituviin QT-lokuksiin kytkeytyneiksi tiedetyt merkkilokuk-

set. Isältä tutkittaisiin suuri joukko tyttäriä sen heterotsygoottisiksi todettujen merkkilokusten osalta ja määritettäisiin, ovatko merkkilokusten eri alleelit yhteydessä positiivisiin tai negatiivisiin alleeleihin QT-lokuksissa. Jos tällaisia yhteyksiä löydettäisiin, voitaisiin merkkigeenien suhteen arvosteltujen valiosonnien pojat valita niiden isiltään saamisen merkkialleelien perusteella.

Merkkigeeniperusteiset valintamenetelmät vaikuttavat mutkikkailta ja työläiltä. Lisäksi ne tulisivat kalliiksi, sillä riittävä RFLP-testaus jalostusohjelmissa maksaisi nykyisin useita miljoonia markkoja. Kuten Beckmann ja Soller (1987) toteavat, merkkigeeniperusteinen valinta on hyödyllistä ainoastaan, jos biometrisillä menetelmillä saavutetaan vain heikkoa edistymistä, yksittäiseltä eläimeltä voidaan tuottaa suuri määrä jälkeläisiä ja tuotteen kokonaisarvo pystyy kattamaan RFLP-arvosteiluista aiheutuvat lisäkustannukset. Tulevaisuudessa minisatelliitti- ja oligonukleotidikoettimilla pystytään ehkä alentamaan kustannuksia. Nähtäväksi jää, muodostuuko tällaisesta "kiertoiteitse" suoritettavasta valinnasta merkittävä tekijä käytännön kotieläinjalostukseen vai jääkö se mahdollisia yksittäissovelluksia lukuunottamatta vain tutkimuskohteeksi.

4. Geenikartoitus

4.1. Perhetutkimukset

1960-luvun lopulle saakka perhetutkimukset olivat ainoa keino geenien välisen kytkennän osoittamiseksi ja niiden paikantamiseksi tiettyyn kromosomiin. Kahden lokuksen kytkennän määrittämiseksi lokusten välinen meioosin rekombinaatiofrekvenssi mitataan nk. informatiivisissa perheissä, joissa toinen van-

hemmista on heterotsygootti kummankin lokuksen suhteen. Jos rekombinaatiofrekvenssi on alle 0.5 ja jos lokuksissa voidaan olettaa olevan satunnainen segregatio, pystytään tilastollisesti päättelemään, että lokukset sijaitsevat samassa kromosomissa (Morton 1955; Wald 1947). Geenin paikantamisessa tiettyyn kromosomiin käytetään jotakin heterotsygoottisena olevaa kromosomimuunnosta yhtenä lokuksena kytkentätestissä (esim. Donahue ym. 1968).

Perhetutkimusten eräs huono puoli geenikartoituksessa on, että jokin lokus voidaan paikantaa tiettyyn kromosomiin ainoastaan seuraavien edellytysten vallitessa (Ruddle ja Fries 1986):

a. Jokin jo paikannettu polymorfinen merkkilokus tai polymorfinen sytogeneettinen lokus sijaitsee paikannettavasta lokuksesta enintään 20 cM:n etäisyydellä. Kytkentä voidaan havaita kohtuullisilla eläinmäärillä ainoastaan, jos rekombinaatiofrekvenssi ei ole kovin paljon suurempi kuin 20 %.

b. Kartoitettavassa lokuksessa täytyy olla ainakin kaksi alleelia segregoitumassa ja niiden täytyy segregoitua merkkilokuksen alleelien kanssa informatiivisissa perheissä. Nämä vaatimukset ovat voimassa vain harvojen geenien tapauksessa, pääasiassa koska polymorfisia klassisia merkkilokuksia ei ole riittävästi. Nisäkäsgenomien pituus rekombinaatioyksiköissä on 2500 cM:n suuruusluokkaa (luku 3.1), joten tarvittaisiin ainakin 65 tasavälein sijaitsevaa merkkilokusta, jotta mikä tahansa uusi lokus sijaitsisi alle 20 cM:n etäisyydellä jostakin merkkilokuksesta. Jos merkkilokukset jakautuvat genomiin umpimähkäisesti, niitä tarvitaan huomattavasti enemmän (luku 3.1).

Nykyisin paras tapa hankkia tarvittavat polymorfismit on RFLP-menetelmän käyttö, koska siihen on kehitetty melko yksinkertainen tekniikka ja riittävän polymorfisia kohtia voidaan odottaa olevan runsaasti genomissa (luku 3.1). Niiden paikat voidaan määrittää somaattisilla menetelmillä, minkä jälkeen mikä tahansa lokus voidaan kartoittaa tähän RFLP-lokusten verkostoon.

4.2. Somaattiset menetelmät

Somaattisten solujen yhtymisessä (luku 2.1) suurin osa toisen alkuperäisen solun kromosomistosta vähitellen häviää hybridisolusta. Onneksi kotieläin x jyrsijä -hybridisolujen tapauksessa häviävät kromosomit ovat peräisin kotieläinisolusta (Weiss ja Green 1967), joten saadaan muodostetuksi sopivia hybridisoluklooneja, joista kussakin on eri valikoima kyseisen kotieläinlajin kromosomeja tai vain yksi kromosomi jyrsijäsolun kromosomien lisäksi.

Geenien kytkennästä tai lokusten sijainnista tietyssä kromosomissa voidaan vetää johtopäätöksiä tutkimalla useiden hybridisolukloonien kromosomivalikoima ja määrittämällä soluisissa olevat geenituotteet. Jos jonkin geenin koetin on käytettävissä, saadaan geenin läsnäolo todetuksi suoraan restriktiokatkelma-analyyseillä (Ruddle 1981). Tarvittavan informaation sisältävää hybridisolulinjojen tai -kloonien kokoelmaa kutsutaan hybridipaneeliksi (Ruddle ja Fries 1986). Kun geenin on osoitettu olevan tietyssä kromosomissa, seuraava vaihe on paikantaa se jollekin kromosomialueelle. Kromosomin sisäinen kartoituspaneeli voidaan muodostaa käyttämällä somaattisia hybridisoluja, joissa on kyseistä kromosomia koskevia deletioita tai translokaatioita. Hybriditekniikalla voidaan lopulta kehittää solulinjoja, joissa on tietyistä kromosomeista joko normaalikopiot tai

vain niiden osia. Hybridisolulinjojen sarjaa, joka käsittää eri osat halutusta kromosomista, voidaan sitten käyttää määrittämään geenin sijainti. Sopivalla kromosomin sisäisellä kartoituspaneelilla pystytään saavuttamaan 5-10 cm:n eli $5 \times 10^6 - 10^7$ emäsparin erotuskyky, jos työssä käytetään korkean erotuskyvyn kromosomijuovatekniikkaa (Ruddle 1981) (nisäkäsgenomissa 1 cm vastaa suunnilleen 10^6 emäsparia).

In situ -hybridisaatio on kartoitustekniikka, jossa radioaktiivisesti leimattujen DNA-koettimien annetaan pariuutua metafaasivaiheen kromosomien kanssa, minkä jälkeen pariuutumiskohdat saadaan näkyviin autoradiografiafilmiille (Gall ja Pardue 1969; John ym. 1969). Nykyisin tällä menetelmällä pystytään kartoittamaan myös yksikopioisia geenejä. Olennainen edellytys in situ -kartoituksen onnistumiselle on kromosomien ja niiden juovien yksikäsitteinen tunnistaminen. Kartoituksen erotuskyky on samaa luokkaa kuin kromosomin sisäisillä paneeleilla (5-10 cm), koska kummallakin se riippuu kromosomijuovien erotuskyvystä (Ruddle 1981).

Yhdistelmä-DNA -menetelmillä kartoitustietoa voidaan saada yksittäisen emäsparin tasolta 10^5 emäspariin saakka (Ruddle ja Fries 1986). Tämän erotuskyvyn ja 5×10^6 emäsparin erotuskyvyn (paneelikartoitus tai in situ -hybridisaatio) välisen kuilun ylittämiseksi käytetään kromosomivälitteiseen geeninsiirtoon perustuvaa tekniikkaa (luku 2.2), jolla voidaan siirtää 10^6-10^7 emäsparin pituisia katkelmia luovuttajasolun kromosomeista sopiviin vastaanottajasoluihin (Klobutcher ja Ruddle 1981).

Geenien paikantaminen kromosomeihin ja kytkentäryhmien määrittäminen perhetutkimusten avulla on kotieläimillä mahdollista vain harvoissa tapauksissa, joten on tärkeää saada muodos-

tetuksi hybridisolupaneelit kaikille kotieläinlajeille (Ruddle ja Fries 1986). On kuitenkin otettava huomioon, että geenien paikat määritettyinä somaattisilla menetelmillä (paneelikartoit-
tus ja in situ -hybridisaatio) muodostavat nk. fysikaalisen gee-
nikartan, joten ne eivät täysin kuvaa geneettisiä etäisyyksiä. Emäspareina mitattavan fysikaalisen etäisyyden ja centiMorgan-
yksikköinä ilmaistavan rekombinaatioetäisyyden välinen suhde ei
ole suoraviivainen, koska tekijäinvaihduntafrekvenssi (crossing
over -frekvenssistä riippuva) ei ole sama genomissa kaikissa osis-
sa. Fysikaalisten karttojen täydentyessä perhetutkimukset tule-
vat jälleen tärkeiksi geneettisten etäisyyksien mittaamisessa.

Somaattisia menetelmiä ei voida käyttää, jos geenillä ei
ole tunnettua fenotyyppiä viljelmän soluissa tai sille ei ole
saatavissa kloonattua DNA-koetinta. Tällaisen geenin paikka kar-
talla voidaan määrittää tutkimalla sen ja jonkin jo paikannetun
merkkigeenin välistä kytkentää. Restriktioentsyymeillä ja DNA-
koettimilla havaittavat polymorfismit ovat mitä todennäköisim-
min erittäin yleisiä myös kotieläimillä (luku 3), joten RFL-po-
lymorfismien käytöstä tulee tärkeä geenikartoituksen osa. Ha-
vaitut RFLP-lokukset voidaan paikantaa kromosomeihin somaatti-
silla menetelmillä, minkä jälkeen niitä pystytään käyttämään
merkkilokuksina kartoitettaessa esim. kvantitatiivisiin ominai-
suuksiin vaikuttavia tuntemattomia lokuksia. Sijainnin selvittä-
misen jälkeen tällaisten ominaisuuksien geenejä kyettäisiin
eristämään yhdistelmä-DNA -tekniikalla (Ruddle ja Fries 1986).
Kytkeäsuhteiden tuntemisen välitön sovellus olisi luonnolli-
sesti merkkigeeniperusteinen valinta.

YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTUKSET

Yhdistelmä-DNA -tekniikkaa ja muita DNA:n tutkimiseen ja käsittelyyn liittyviä menetelmiä voidaan käyttää kotieläinjalostuksessa kahdella päätävällä:

1. DNA:n muuntelun selvittäminen (populaation sisäinen ja populaatoiden välinen perinnöllinen muuntelu), geenikartoitus sekä geenien ilmenemisen ja geenitoiminnan säätelyn tutkiminen. Tämän perustutkimuksen välittömiä sovellutuksia olisivat merkkigeeniavusteinen valinta sekä polveutumisselvitykset ja yksilöiden tunnistaminen.
2. DNA:n tarkoituksellinen muuttaminen joko lisäämällä vierasta DNA:ta solun genomiin (geeninsiirto) tai ehkä muuttamalla solun omaa DNA:ta. Geeninsiirron tavoitteena on saada aikaan transgeenisia eläimiä, joilla on jokin haluttu uusi ominaisuus tai jotka ovat jonkin ominaisuuden suhteen huomattavasti parempia.

Tutkimus 1. kohdan alueella on välttämätöntä, jotta geeniteknologian menetelmin pystyttäisiin hallitusti muuttamaan genomia (kohta 2). Onnistuminen geeninsiirroissa on nykyisin melkoisen sattumanvaraista, eikä toistaiseksi ole edes kunnolla suunniteltu, millaiset geeninsiirrot olisivat mielekkäitä. Kohdan 1 tutkimusalueella on vielä useita ratkaisemattomia ongelmia. Vaikka kysymyksessä onkin eläingenomin perustutkimus, voidaan tämän alueen tutkimustuloksia hyödyntää välittömästi myös kotieläinjalostuksessa, lähinnä merkkigeeniavusteisessa valinnassa.

Tutkimusten kohdistaminen DNA-tekniikalla löydettyjen merkkigeenien sekä kotieläintuotteiden laatuominaisuuksien ja eläinten tautiresistenssin välisten yhteyksien (kytkentöjen) selvittämiseen on perusteltua. Kotieläinten geenikartoituksesta kertyvät tulokset

ovat tällöin avainasemassa. Valmiudet tältä alueelta kertyvien tutkimustulosten hyödyntämiseksi paranisivat huomattavasti, mikäli selvitettäisiin ensin olemassa olevien aineistojen pohjalta kotieläinten veriryhmien sekä veren proteiini- ja entsyymityyppien mahdolliset yhteydet tuotteiden laatuun sekä eläinten tautiresistenssiin, hedelmällisyyteen ja tuotantokykyyn.

KIRJALLISUUSLUETTELO

- Anderson, W.F., Killoos, L., Sanders-Haigh, L., Kretschmer, P.J. & Diacumakos, E.G. 1980. Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5399-5403.
- Beckmann, J.S. & Soller, M. 1987. Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. Bio/Technology 5: 573-576.
- Beckmann, J.S., Kashi, Y., Hallerman, E.M., Nave, A. & Soller, M. 1986. Restriction fragment length polymorphism among Israeli Holstein-Friesian dairy bulls. Anim. Genet. 17: 25-38.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.K. & Robertson, E. 1984. Formation of germ line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 309: 255-256.
- Brem, G., Brenig, B., Goodman, H.M., Selden, R.C., Graf, F., Kruff, B., Springman, K., Hondele, J., Meyer, J., Winnacker, E.-L. & Kräusslich, H. 1985. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. Zucht-hygiene 20: 251-252.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senechal, A.W., Warren, R. & Palmiter, R.D. 1981. Somatic expression of Herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. Cell 27: 223-231.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K. & Palmiter, R.D. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442.
- Butler, J.E., Anderson, G.B., BonDurant, R.H. & Pashen, R.L. 1985. Production of ovine chimeras. Theriogenology 23: 183.
- Capecchi, M.R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell 22: 479-488.
- Church, R.B. 1987. Embryo manipulation and gene transfer in domestic animals. Trends in Biotechnology 5: 13-19.

- Church, R.B., Schaufele, F.J. & Meckling, K. 1985. Embryo manipulation and gene transfer in livestock. *Can. J. Anim. Sci.* 65: 527-538.
- Clark, A.J., Simons, P., Wilmut, I. & Lathe, R. 1987. Pharmaceuticals from transgenic livestock. *Trends in Biotechnology* 5: 20-24.
- Colman, A. 1975. Transcription of DNA's of known sequence after injection into the eggs and oocytes of Xenopus laevis. *Eur. J. Biochem.* 57: 85-96.
- Constantini, F. & Lacy, E. 1981. Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature* 294: 92-94.
- Constantini, F., Lacy, E., Roberts, S., Evans, E. & Burtenshaw, M. 1983. A foreign β -globin gene in transgenic mice: integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues. *Cell* 34: 343-358.
- Donahue, R.P., Bias, W.B., Renwick, J.H. & McKusick, V.A. 1968. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 949-955.
- Ephrussi, B. 1972. Hybridization of somatic cells. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.K. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Fehilly, C.B., Willadsen, S.M. & Tucker, E.M. 1984. Inter-specific chimaerism between sheep and goat. *Nature* 307: 634-636.
- Fournier, R.E.K. & Ruddle, F.H. 1977. Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 319-323.
- Gall, J.G. & Pardue, M.L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 378-383.
- Geever, R.F., Wilson, L.B., Nallaseth, F.S., Milner, P.F., Bittner, M. & Wilson, J.T. 1981. Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5081-5085.
- Goldberg, D.A., Posakony, J.W. & Maniatis, T. 1983. Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the Drosophila germ line. *Cell* 34: 59-73.

- Gordon, J.W. 1983. Transgenic mice: a new and powerful experimental tool in mammalian developmental genetics. *Devel. Genet.* 4: 1-20.
- Gordon, J.W. & Ruddle, F.H. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214: 1244-1246.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. & Ruddle, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384.
- Graham, F.L. & van der Eb, A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.
- Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P. & Sambrook, J. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 439-446.
- Hammer, R.E., Brinster, R.L., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. & Mayo, K.E. 1985b. Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature* 315: 413-416.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. 1985a. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315: 680-683.
- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphism in man. *Proc. Roy. Soc. B* 164: 298-310.
- Jaenisch, R. 1976. Germ line integration and Mendelian transmission of exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1260-1264.
- Jaenisch, R. & Mintz, B. 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1250-1254.
- Jeffreys, A.J. 1979. DNA sequence variants in the γ -, α -, δ - and β -globin genes of man. *Cell* 18: 1-10.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Jinks, J.L., Caligari, P.D.S. & Ingram, N.R. 1981. Gene transfer in Nicotiana rustica using irradiated pollen. *Nature* 291: 586-588.

- John, H.A., Birnstein, M.L. & Jones, K.W. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-587.
- Joyner, A., Keller, G., Phillips, R.A. & Bernstein, A. 1983. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* 305: 556-558.
- Jähner, D. & Jaenisch, R. 1980. Integration of Moloney leukemia virus into the germ line of mice: correlation between site of integration and virus activation. *Nature* 287: 456-458.
- Jähner, D., Stuhlmann, H. & Jaenisch, R. 1980. Conformation of free and of integrated Moloney leukemia virus proviral DNA in preleukemic and leukemic Balb/Mo mice. *Virology* 101: 111-123.
- Kashi, Y., Soller, M., Hallerman, E. & Beckmann, J.S. 1986. Restriction fragment length polymorphisms in dairy cattle genetic improvement. In: Dickerson, G.E. & Johnson, R.K. (Eds.) 3rd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. XII. University of Nebraska, Lincoln, pp. 57-63.
- Kazazian, H.H., Phillips, J.A., Boehm, C.D., Vik, T.A., Mahoney, M.J. & Ritchey, A.K. 1980. Prenatal diagnosis of β -Thalassemias by amniocentesis: linkage analysis using multiple polymorphic restriction endonuclease sites. *Blood* 56: 926-930.
- Klobutcher, L.A. & Ruddle, F.H. 1981. Chromosome mediated gene transfer. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 533-554.
- Lange, K. & Boehnke, M. 1982. How many polymorphic marker genes will it take to span the human genome. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 842-845.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D. & Finch, J.T. 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275: 416-420.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., Morris, N.R., Wyllie, A.H., Mertz, J.E., DeRoberts, E.M. & Gurdon, J.D. 1977. Chromatin assembly and transcription in eggs and oocytes of Xenopus laevis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 171-178.
- Lewin, B. 1987. *Genes*. 3rd Ed. John Wiley & Sons, New York.
- Lewontin, R.C. & Hubby, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura. *Genetics* 54: 595-609.

- Lin, T.P. 1966. Microinjection of mouse eggs. *Science* 151: 333-337.
- Little, P.F.R., Annison, G., Darling, S., Williamson, R., Camba, L. & Modell, B. 1980. Model for antenatal diagnosis of β -thalassemia and other monogenic disorders by molecular analysis of linked DNA polymorphisms. *Nature* 285: 144-147.
- Longo, F.J. & Kunkle, M. 1977. Synthesis of RNA by male pronuclei of fertilized sea urchin eggs. *J. Exp. Zool.* 201: 431-438.
- McBride, W.O. & Ozer, H.L. 1973. Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1258-1262.
- McKnight, G.S., Hammer, R.E., Kuenzel, E.A. & Brinster, R.L. 1983. Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice. *Cell* 34: 335-341.
- Mertz, J.E. & Gurdon, J.B. 1977. Purified DNAs are transcribed after microinjection into Xenopus oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1502-1506.
- Miller, C.L. & Ruddle, F.H. 1978. Co-transfer of human X-linked markers into murine somatic cells via isolated metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3346-3350.
- Morton, N.E. 1955. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7: 277-318.
- Munro, S. 1968. Transformation of Leghorn chickens with Bantam DNA injection in gonadal tissue. In: *Monograph. Basic Research Laboratory, Hy-Line Poultry Farms, Johnston, Iowa.* (Ref. Church ym. 1985)
- Murray, J.C., Mills, K.A., Demopoulos, C.M., Hornung, S. & Motulsky, A.G. 1984. Linkage disequilibrium and evolutionary relationships of DNA variants (restriction enzyme fragment length polymorphisms) at the serum albumin locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3486-3490.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P.H. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1: 841-845.
- O'Hare, K. & Rubin, G.M. 1983. Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the Drosophila melanogaster genome. *Cell* 34: 25-35.

- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. & Evans, R.M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.
- Palmiter, R.D., Wilkie, T.M., Chen, H.Y. & Brinster, R.L. 1984. Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree. *Cell* 36: 869-877.
- Pandey, K.K. & Patchell, M.R. 1982. Genetic transformation in chicken by the use of irradiated male gametes. *Mol. Gen. Genet.* 186: 305-308.
- Potter, H., Weir, L. & Leder, P. 1984. Enhancer-dependent expression of human K immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7161-7165.
- Rubin, G.M. & Spradling, A.C. 1982. Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. *Science* 218: 348-353.
- Ruddle, F.H. 1981. A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies. *Nature* 294: 115-120.
- Ruddle, F.H. & Fries, R. 1986. Mapping genes in domesticated animals. In: Evans, J.W. & Hollaender, A. (Eds.) *Genetic engineering of animals. An agricultural perspective.* Plenum Press, New York, pp. 39-57.
- Rusconi, S. & Schaffner, W. 1981. Transformation of frog embryos with a rabbit β -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5051-5055.
- Salter, D.W., Smith, E.J., Hughes, S.H., Wright, S.E. & Crittenden, L.B. 1986. Retroviruses as vectors for germ line insertion in the chicken. In: Dickerson, G.E. & Johnson, R.K. (Eds.) *3rd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. XII.* University of Nebraska, Lincoln, pp. 51-56.
- Scholnick, S.B., Morgan, B.A. & Hirsh, J. 1983. The cloned Dopa decarboxylase gene is developmentally regulated when re-integrated into the Drosophila genome. *Cell* 34: 37-45.
- Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Tech. J.* 27: 379-423, 623-656.
- Smith, C., Meuwissen, T.H.E. & Gibson, J.P. 1987. On the use of transgenes in livestock improvement. *Anim. Breed. Abstr.* 55: 1-10.

- Smith, H.O. 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science* 205: 455-462.
- Soller, M. & Beckmann, J.S. 1985. Restriction fragment length polymorphisms and animal genetic improvement. *Rev. Rur. Sci.* 6: 10-18.
- Soller, M., Genizi, A. & Brody, T. 1976. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 47: 35-39.
- Solomon, E. & Bodmer, W.F. 1979. Evolution of sickle variant gene. *Lancet* I 8122: 923.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spradling, A.C. & Rubin, G.M. 1982. Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. *Science* 218: 341-347.
- Tabin, C.J., Hoffmann, J.W., Goff, S.P. & Weinberg, R.A. 1982. Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 2: 426-436.
- Van der Putten, H., Botteri, F.M., Miller, A.D., Rosenfeld, M.G., Fan, H., Evans, R.M. & Verma, I.M. 1985. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6148-6152.
- Wagner, E.F., Covarrubias, L., Stewart, T.A. & Mintz, B. 1984. Prenatal lethalties in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated into the germ line. *Cell* 35: 647-655.
- Wagner, E.F., Stewart, T.A. & Mintz, B. 1981. The human β -globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5016-5020.
- Wagner, T.E., Hoppe, P.C., Jollick, J.D., Scholl, D.R., Hodinka, R.L. & Gault, J.B. 1981. Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6376-6380.
- Wagner, T.E. & Yun, J.S. 1979. Fine structure of human sperm chromatin. *Arch. Androl.* 2: 291-294.

- Wagner, T.E. & Yun, J.S. 1981. Human sperm chromatin has a nucleosomal structure. *Arch. Androl.* 7: 251-258.
- Wald, A. 1947. *Sequential analysis*. Dover Publications, Inc., New York.
- Wall, R.J., Pursel, V.G., Hammer, R.E. & Brinster, R.L. 1985. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol. Reprod.* 32: 645-651.
- Ward, K.A., Franklin, I.R., Murray, J.D., Nancarrow, C.D., Raphael, K.A., Rigby, N.W., Byrne, C.R., Wilson, B.W. & Hunt, C.L. 1986. The direct transfer of DNA by embryo microinjection. In: Dickerson, G.E. & Johnson, R.K. (Eds.) 3rd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. XII. University of Nebraska, Lincoln, pp. 6-21.
- Weiss, M.C. & Green, H. 1967. Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 1104-1111.
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, Y.C. & Axel, R. 1977. Transfer of purified herpes simplex virus thymidine kinase genes to cultured mouse cells. *Cell* 11: 223-232.
- Womack, J.E. 1987. Genetic engineering in agriculture: animal genetics and development. *Trends in Genetics* 3: 65-68.

KOTIELÄINJALOSTUKSEN TIEDOTE-SARJASSA ILMESTYNYT:

1. UUSITALO, H., 1975. Valintaindeksien rakentaminen kanojen jalostusarvostelua varten. Lisensiaattityö, 119 s.
2. RUOHOMÄKI, H., 1975. Nuoren lihanaudan teurasominaisuuksien arvioimisesta. Lisensiaattityö, 197 s.
3. MAIJALA, K., 1975. Kotieläinjalostus ja sen tutkimus. Esitelmä maataloustutkimuksen päivillä, 26 s.
4. HELLMAN, T., 1975. Maidon lysosyymiaktiivisuudesta ja utaretulehduksesta Viikin karjassa. Pro gradu -työ, 77 s.
5. MAIJALA, K., 1975. Pohjoismaiden maataloustuotanto tulevaisuuden resurssi-tilanteessa. Esitelmä Pohjoismaiden Maataloustutkijain Yhdistyksen 15. kongressissa Reykjavikissa, 36 s.
6. MAIJALA, K., 1975. 50 vuotta kotieläinten jalostustutkimusta Suomessa - tutkimus tänään ja huomenna. Esitelmä Maa- ja kotitalouden Erikois-yhdistysten Liiton luentopäivillä Helsingissä 28.11.1974, 21 s.
7. NIEMINEN, P., 1975. Ultraäänikuvauksella arvioidun lihakuuden yhteys sonnien kasvukoetoloksiin. Pro gradu -työ, 95 s.
8. MAIJALA, K., 1975. Yleisiä näkökohtia kotieläinten jalostustavoitteiden määrittelyssä. Esitelmä Pohjoismaiden Maataloustutkijain Yhdistyksen 15. kongressissa Reykjavikissa 3.7.1975, 18 s.
9. OJALA, M., PUNTILO, M.-L., VARO, M. ja LAAKSO, P., 1976. Sonnien mittauksia yksilötestausasemilla. 45 s.
10. HELLMAN, T., OJALA, M. ja VARO, M., 1976. Ultraäänikuvauksen käyttö pässien yksilöarvostelussa. 15 s.
11. LINDSTRÖM, U., 1976. Voidaanko jalostuksella vaikuttaa utaretulehdusalttiuteen? 19 s.
12. RUOHOMÄKI, H. ja HAKKOLA, H., 1976. Lihantuotantokokeiden tuloksia. 15 s.
13. Lammaspäivä 2.2.1977. 21 s.
14. JOKINEN, L. ja LINDSTRÖM, U., 1977. Pillereiden ei-uusintatulokset 4 vuoden säilytyksen jälkeen verrattuna tuloksiin 1 vuoden säilytyksen jälkeen. 12 s.
15. LINTUKANGAS, S., 1977. Eriolaisten virhelähteiden ja erityisesti tuotostason ja maantieteellisen alueen vaikutus Ay-sonnien jälkeläisarvosteluun. Pro gradu -työ, 114 s.
16. MAIJALA, K. ja SYVÄJÄRVI, J., 1977. Mahdollisuudesta kehittää monisyynyttävää nautakarjaa valinnan avulla. 23 s.
- 17a.-d. Rehuhyötysuhdetta käsittelevät esitelmät. Suomen Maataloustieteellisen Seuran kokous 26.1.1977.
18. RUOHOMÄKI, H., 1977. Erirotuisten lihanautojen elopainot ja iät 160 kilon teuraspainossa. 12 s.
19. Nauta- ja sikapäivä 14.11.1977. 23 s.
20. LINDSTRÖM, U., 1978. Maidon valkuainen. 13 s.
21. HELLMAN, T. ja OJALA, M., 1978. Karjujen ultraäänikuvaukset. 23 s.
22. LINDSTRÖM, U., 1978. Jalostuksella terveempiä eläimiä. 21 s.
23. RUOHOMÄKI, H., 1978. Nuorten lihanautojen mittojen ja painojen välisistä yhteyksistä kasvukauden aikana sekä mittojen merkityksestä elopainon arvioimisessa. 39 s.
24. LINDSTRÖM, U., 1978. Ravintohuolto meillä ja muualla. 10 s.
25. LINDSTRÖM, U., 1978. Matkakertomus Euroopan Kotieläintuotantoliiton (EAAP) 29. vuosikokouksesta Tukholmassa 5.-7.6.1978. 16 s.
26. HAAPA, M., 1978. Kasvatusasematoiminnasta Tanskassa. Matkakertomus, 27 s.
27. RUOHOMÄKI, H., 1978. Lihanautakokeiden tuloksia II. 19 s.
28. LINDSTRÖM, U., 1978. Pihvisonnien käyttö lypsykarjoissa. 14 s.

29. LAMPINEN, K., 1978. Poikimaväli ja/tai siemennysten määrä tiineyttä kohti lehmien hedelmällisyyden mittoina sonnien jälkeläisarvostelussa. Pro gradu -työ, 86 s.
30. MROUÉ, B., 1979. Pässien yksilökokeen käyttöarvo kasvuominaisuuksien arvostelussa. Lisensiaattityö, 150 s.
31. BONSDORFF, M. von, NÄSI, M., SEPPÄLÄ, J., HELLMAN, T. ja KENTTÄMIES, H., 1979. Selostus nautakarjatalouden jatkokoulutuskursseista "The Management and Breeding of Cattle", Edinburgh - Aberdeen 7.-20.5.1978. 79 s.
32. RUOHOMÄKI, H., 1979. Lihanutakokeiden tuloksia III. 26 s.
33. KALLIO, M., 1979. Sperman määrän ja laadun perinnöllisyydestä Salpausselän Keinosiemennysyhdistyksen sonneilla. Laudaturtyö, 110 s.
34. KATAJAMÄKI, U., 1979. Yksilöarvostelun mahdollisuudet suomenlampaan lihan tuotantokyvyn jalostamisessa. Pro gradu -työ, 83 s.
35. LAHDENRANTA, M., 1979. Emien vaikutus oriiden juoksijajälkeläisarvosteluun suomenhevosella. Pro gradu -työ, 145 s.
36. LINDSTRÖM, U., 1979. Kohti pehmeämpää teknologiaa ruoantuotannossa. 11 s.
37. LINDHOLM, S., 1979. Suomalaisen lehmien lypsettävyys ja siihen vaikuttavat tekijät. Laudaturtyö, 51 s.
38. LEUKKUNEN, A., 1979. Pahnuekoko ja porsimiväli emakon hedelmällisyyden kuvaajina keinosiemennyskarjujen jälkeläisarvostelussa kenttäaineiston perusteella arvioituna. Pro gradu -työ, 72 s.
39. PUNTIKA, M.-L., 1979. Ultraäänimittaukset nuorten sonnien teuraslaatua arvioitaessa. Pro gradu -työ, 97 s.
40. RUOHOMÄKI, H., 1980. Lihakarjakokeiden tuloksia IV. 29 s.
41. Jalostuspäivä 9.4.1980. 43 s.
42. Lammaspäivä 24.4.1980. 33 s.
43. SIRKKOMAA, S., 1980. Simulointitutkimus sukusiitoksen ja voimakkaan valinnan käytöstä munijakanojen jalostuksessa. Pro gradu -työ, 90 s.
44. RUOHOMÄKI, H., 1980. Eri rotuisten lihanautojen elopainot ja iät 160, 180, 210 ja 250 kilon teuraspainossa. 13 s.
45. MAIJALA, K., 1981. Kotieläinten perinnöllisen muuntelun säilyttäminen. 52 s.
46. RUOHOMÄKI, H., 1981. Lihakarjakokeet vuosina 1960-1980. 30 s.
47. Jälkeläisarvostelusemiaari 12.5.1981. 44 s.
48. MAIJALA, K., 1981. Jalostus ja lisääntyminen vaikuttavina tekijöinä lihanautannon tuotannossa. 20 s.
49. SYRJÄLÄ-QVIST, L., BOMAN, M. ja MOISIO, S., 1981. Lammastalouden rakenne ja merkitys elinkeinona Suomessa. 25 s.
50. LEUKKUNEN, A., 1982. Keinosiemennyskarjujen jälkeläisarvostelu tyttärien porsimistulosten perusteella. Lisensiaattityö, 88 s.
51. LAURILA, T., 1982. Kilpailutulosten käyttö ratsuhevosten suorituskyvyn mittaamisessa. Pro gradu -työ, 84 s.
52. LINDSTRÖM, U., 1982. Merkkigeenien ja -aineiden käyttöarvosta kotieläinjalostuksessa. 13 s.
53. LEUKKUNEN, A., 1982. Heikkolaatuisen rehun hyväksikäytön geneettinen edistäminen. 24 s.
54. OJALA, M., 1982. Eri kudoslajien kasvurytmi nautaloilla. 22 s.
55. OJALA, M., 1982. Vanhempien tuotantotietojen ja eräiden ympäristötekijöiden yhteys sonnien kasvukoetuloksiin. Laudaturtyö, 54 s.
56. OJALA, M., 1982. Kilpailutulosten käyttöarvosta ravihevosten jalostuksessa. Lisensiaattityö, 16 s.
57. KENTTÄMIES, H., 1982. Naudanlihantuotantoon vaikuttavista geneettisistä tekijöistä ja ympäristötekijöistä sekä kasvun mittaamisesta kenttäkokeissa. Lisensiaattityö, 104 s.
58. HUHTANEN, P., 1982. Suomenkarjan kokonaistaloudellisuus muihin rotuihin verrattuna. Laudaturtyö, 82 s.

59. KUOSMANEN, S., 1983. 305-pv:n maitotuotoksen ennustaminen osatuotostietojen perusteella. Pro gradu -työ, 100 s.
60. HEISKANEN, M.-L., 1983. Hevosen keinosiemennys tuore- ja pakastespermalla. Pro gradu -työ, 63 s.
61. MARKKULA, M., 1984. Kanojen yleiseen sairaudenvastustuskykyyn liittyviä tekijöitä. 24 s.
62. MÄNTYSAARI, E., 1984. Valintaindeksi jälkeläisarvosteltujen keinosiemennyssonnien kokonaisjalostusarvon kuvaajana. Pro gradu -työ, 86 s.
63. LAUKKANEN, H., 1984. Maidon sähköjohtokykyyn vaikuttavat tekijät ja johtokyvyn käyttömahdollisuuksista utaretulehduksen vastustamisessa. Pro gradu -työ, 68 s.
64. SYVÄJÄRVI, J., 1984. Tutkimuksia maitorotuisten sonnien jälkeläisarvostelun varmistamiseksi ja monipuolistamiseksi. Lisensiaattityö, 14 s. LIITE: Tarkkailulehmien maidon solupitoisuuden vaihtelu ja yhteys maidon tuotantoon. 78 s.
65. MAIJALA, K., 1984. Ulkomaisia kokemuksia suomenlampaasta ja sen risteytyksistä. 27 s.
66. ARONEN, P., 1985. Liharotuisten nautojen painoihin vaikuttavista tekijöistä ja painojen korjaamisesta. Pro gradu -työ, 80 s.
67. JUGA, J., 1985. Karjansisäinen lehmien arvostelu. Pro gradu -työ, 93 s.
68. HIMANEN, A., 1985. Tilatason jalostussuunnitelmien toteutuminen. Pro gradu -työ, 45 s.
69. SEVON-AIMONEN, M.-L., 1985. Risteytysvaikutus sikojen tuotanto-ominaisuuksissa. Pro gradu -työ, 89 s.
70. SAASTAMOINEN, M., 1985. Lypsylehmän karkearehun syönti- ja hyväksikäyttökäytön jalostusmahdollisuudet. Pro gradu -työ, 76 s.
71. FALCK-BILLANY, H., 1985. Celltalets samt vissa polymorfa proteiner användbarhet vid avel för mastiresistens. Pro gradu -työ, 54 s.
72. FALCK-BILLANY, H. ja MAIJALA, K., 1985. Jalostusvalinnan mahdollisuudet muuttaa maidon rasva- ja valkuaiskoostumusta. 38 s.
- 73a. OJALA, M., 1986. Use of race records for breeding evaluation of trotters in Finland. Väitöskirja, 18 s., 4 liitettä.
- 73b. OJALA, M., 1986. Use of race records for breeding evaluation of trotters in Finland. Väitöskirjan lyhennelmä, 18 s.
74. SÄYNÄJÄRVI, M., 1986. Sukusiitoskertoimet suomalaisessa ayrshirepopulaatiossa ja sukusiitoksen vaikutukset eri ominaisuuksiin. Pro gradu -työ, 59 s.
75. PYLVÄNÄINEN, H., 1987. Ravikilpailuominaisuuksien perinnölliset tunnusluvut eri ikävuosina ja ikävuosien välillä. Pro gradu -työ, 87 s.
76. LAMPINEN, A., 1987. Maitorotuisten keinosiemennyssonnien kasvukyky ja sen arvostelu. Pro gradu -työ, 79 s.
77. ALASUUTARI, T., 1987. Maitorotuisten sonnien tyttären karsiintuminen ja sonnien jalostusarvojen toistuvuus. Pro gradu -työ, 127 s.
78. TIKKANEN, S., 1987. Minkin pentuekoon periytyvyys. Pro gradu -työ, 46 s.
79. TUORI, M., 1987. Lypsykäyrän muotoa kuvaavien tunnuslukujen ja lypsykauden tuotosten toistuvuus Viikin karjassa. Laudaturtyö, 65 s.
80. MÄNTYAHO, M., 1988. Maidon rasvahappokoostumukseen vaikuttavista tekijöistä. Pro gradu -työ, 82 s.
- 81a. SIRKKOMAA, S., 1988. Use of inbreeding to increase the response to selection. Väitöskirja, 29 s., 5 liitettä.
- 81b. SIRKKOMAA, S., 1988. Use of inbreeding to increase the response to selection. Väitöskirjan lyhennelmä, 29 s.
82. SIRKKOMAA, S. ja OJALA, M., 1988. Geeniteknologian hyväksikäyttömahdollisuudet kotieläinjalostuksessa. 52 s.

ISBN 951-45-4667-9
ISSN 0356-1429
Helsinki 1988
Yliopistopaino