

04.12.95

# Metsäntutkimus uusissa puissa: monistusta ja molekyylejä

Puuvartisten kasvien bioteknologia -kokous  
Punkaharjulla 1995

Esko Oksa (toim.)



Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

01.10.2014

Kannen kuva: Jouko Lehto

04.12.95

**Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyylejä**

**Puuvartisten kasvien bioteknologia -kokous  
Punkaharjulla 1995**

Esko Oksa (toim.)

Metsäntutkimuslaitos, Punkaharjun tutkimusasema 1995

---

Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

**METSÄNTUTKIMUSLAITOS**  
Kirjasto

Oksa, E. (toim.). 1995. Metsäntutkimus uusissa puissa: monistusta ja molekyyilejä  
Puuvarmisten kasvien bioteknologia -kokous Punkaharjulla.  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574. 126 s. ISBN 951-40-1475-8, ISSN  
0358-4283.

Toimittajan yhteystiedot: Metsäntutkimuslaitos, Punkaharjun tutkimusasema,  
Finlandiantie 18, 58450 Punkaharju 2 (Puh. 957-644241, telefax 644333).

Julkaisija: Metsäntutkimuslaitos, Punkaharjun tutkimusasema. Hyväksynyt: Matti  
Kärkkäinen, tutkimusjohtaja, 31.10.1995.

Jakaja: Metsäntutkimuslaitos, Punkaharjun tutkimusasema, Finlandiantie 18, 58450  
Punkaharju 2.

Hinta: 50,00 mk

# Sisällys

<b>Lukijalle</b> .....	5
 <i>Puiden mikrolisäys ja perintöaineksen säilyttäminen</i>	
 <b>Hohtola Anja</b>	
Ruskettuminen tammen meristeemilisäyksen ongelmana .....	7
 <b>Uosukainen Marjatta</b>	
Mikrolisäys taimitarhakasvien emokasvihuollossa .....	15
 <b>Poteri Marja ja Ryytänen Leena</b>	
Eri koivuruostekantojen aiheuttaman infektion alkuvaiheen SEM-tarkastelu koivuklooneilla .....	21
 <b>Ryytänen Leena</b>	
Geenipankki pakkasessa: esimerkkinä koivun kryopreservatio .....	27
 <b>Laukkanen Hanna ja Hohtola Anja</b>	
Typpiravinteet puuvartisten kasvien solukkoiljelmässä .....	35
 <b>Häggman Hely</b>	
Mikrolisätyt männyntaimet - varhaiskypsiä kukkijoita jalostuksen käyttöön .....	43
 <i>Markkeritekniikat metsänjalostuksen ja tutkimuksen käytössä</i>	
 <b>Hurme Päivi, Karhu Auli ja Sayolainen Outi</b>	
DNA merkit tutkimuksessa ja jalostuksessa .....	51
 <b>Harju Anni</b>	
Isoentsyymien käyttö perinnöllisinä merkiosuuksina .....	57
 <b>Boije Maria</b>	
Pihtalajien tunnistus RAPD-tekniikalla .....	67
 <b>Regina Mikko ja Lapinjoki Seppo</b>	
DNA-markkerien käyttö rauduskoivulla .....	75

***Puut geeninsiirtojen ja molekyylibiologisen tutkimuksen kohteena***

**Aronen Tuija**

Agrobakteeri-välitteinen geeninsiirto mäntyyn  
- puun ja bakteerin vuorovaikutus ..... 83

**Lemmetyinen Juha, Elo Annakaisa ja Sapanen Tuomas**

Kukkimattomien koivujen kehittäminen kukintospesifisten geenien avulla ..... 93

**Kangasjärvi Jaakko, Kiiskinen Markus, Pellinen Riikka ja Tuomainen Jaana**

Koivun otsonivaurioiden mekanismeista ..... 103

**Ylönen Anne ja Nygren Markku**

Männyn genomien koon määrittäminen virtaussytometrillä ..... 115

**Junttila Olavi**

Puuvartisten kasvien biotekniikkatutkimus Norjassa ..... 123

## Lukijalle

Eräiden arvioiden mukaan Yhdysvalloissa on reaalin elintason nousu ollut pysähdyksissä 1970-luvun alusta alkaen. Yhdeksi syyksi on nähty teollinen kilpailu, jonka voittajiksi ovat tulleet Japani, Taiwan, Etelä-Korea ja osin muutkin Kaakkois-Aasian maat. Huomiota on kiinnitetty siihen, että vaikka innovatiivisuus on Yhdysvalloissa edelleen maailman huippuluokkaa, kuten voidaan päätellä mm. eri tieteenalojen Nobel-palkinnoista, ideoiden jalostaminen talouselämän käyttöön ei ole onnistunut samalla tavalla kuin kilpailijamaissa.

Jotkut arvioijat ovat kiinnittäneet huomiota siihen, että Yhdysvalloissa eletään yksityisen elinkeinoelämän markkinataloudessa, jossa sijoittajat seuraavat yhtiöitä neljännesvuosiraporttien pohjalta. On epäilty, että heikon liikkeenjohdon yrityksissä maksimoidaan liian paljon neljännesvuosivoittoja ja samalla johdon bonuksia sen sijaan että maltettaisiin panostaa pitkäaikaisiin kehityshankkeisiin. On esitetty esimerkkejä erityisesti auto- ja kulutuselektronikkateollisuudesta, että neljännesvuosivoittopohjainen ajattelu voi nopeasti murentaa yrityspohjaa.

Entisen papin saarnan tavoin edellä esitetty vertaus sovelletaan maalliseen arkeen, tässä tapauksessa metsäntutkimukseen. Tutkimuksessa on visusti varottava, ettei sinänsä oikeutettu pyrkimys saada aikaan nopeasti hyödynnettäviä tuloksia vaikuta kielteisesti halukkuuteen panostaa pitkäjänteiseen tutkimukseen, jossa tulokset ovat kauempana kuin neljännesvuosiraportin päässä.

Olen halunnut itse tulla tämän tilaisuuden avaajaksi voidakseni lausua sekä oman talon tutkijoille että yleisesti tiedeyhteisölle Metsäntutkimuslaitoksen tavoitteen olevan tasapainoinen tilanne, jossa tilaa annetaan sekä nopeasti sovellettavalle että pidemmän ajan panostusta vaativalle tutkimukselle.

Tasapainoinen metsäntutkimuksen perusteiden ja sovellusten tutkiminen on tärkeää sikäli, että pelkkä panostus sovelluksiin tulee nopeasti tiensä päähän, ellei vahvasta pohjasta huolehdi. Siksi myös rahoituksellisesti vaikeina aikoina kuten nykyisin aiotaan ylläpitää myös perusteiden osaamista. On myös ilmeistä, ettei nykyaikana voida kysyä tieteen eturintamassa muuten kuin olemalla itse mukana kärjen tuntumassa: kaikki oppikirjatietous on jo syntyessään vanhentunutta, ja jotta voisi saada alan huippujen osaamisen käyttöönsä, merkittävin keino on vaihtokauppa, jossa vaihdettavana on erilainen tekninen osaaminen, viimeisimmät löydöt ja koko ajat-

telutapa. Vain ne pääsevät vaihtokaupan markkinoille, joilla on jotakin annettavaa. Siksi Metsäntutkimuslaitos aikoo panostaa myös jatkossa omaan perusteiden osaamiseensa ja perusteiden tutkimiseen.

Näillä sanoilla toivotan kaikille kokouksen osanottajille kiintoisaa kokemusten vaihtoa ja antoisaa yhdessäoloa.

Matti Kärkkäinen

"Puuvartisten kasvien bioteknologia" -kokous pidettiin Punkaharjulla 17-18.8.1995. Kokouksen järjestäjät (Metlan tutkimushankkeen "Metsäpuiden jalostus biotekniikan keinoin" henkilöstö) haluavat kiittää kokouksen osanottajia tieteellisesti kiinnostavista ja innostavista esityksistä ja keskusteluista. Lisäksi lämpimät kiitoksemme kaikille kokouksen järjestelyihin osallistuneille, ja sen onnistumiseen myötävaikuttaneille tahoille.

Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyilejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## Ruskettuminen tammen meristeemilisäyksen ongelmana

Anja Hohtola

Oulun yliopisto, biologian laitos

### Johdanto

Tammi on yksi tärkeimmistä puulajeista Keski-Euroopassa. Tammimetsiköiden uudistaminen ei kuitenkaan ole ongelmatonta. Siementen tuottoa rajoittaa epäsäännöllinen hedelmöityminen ja haittana on lisäksi siementen heikko säilyvyys (esim. Meier-Dinkel 1987). Myös tammen vegetatiivinen lisääminen on hankalaa. On havaittu, että jo 3-5 vuotiaasta emopuusta otetut pistokkaat saattavat jäädä juurettomiksi (San-Jose ym. 1990). Monet tutkimusryhmät ovat pyrkineet kehittämään tammelle soveltuvan solukkoviljelymenetelmän (Chalupa 1984, Vieitez ym. 1985, Favre ja Juncker 1987, Marks ja Simpson 1993, Tóth ym. 1994). Rutiininomaiseen lisääkseen soveltuvaa menetelmää ei kuitenkaan ole monen vuoden työn jälkeen vielä löydetty. Tammi muistuttaa tässä suhteessa mäntyä ja on luokiteltu solukkoviljelyssä "uppiniskaisesti" käyttäytyväksi lajiksi.

Tämä nyt esiteltävä mikrolisäykseen liittyvä tutkimustyö sai alkunsa havainnosta, että tammen (*Quercus robur*, *Q. petraea*) esiinpreparoidut meristeemit ja niitä ympäröivä solukko samoin kuin siemenalkio ruskettuu ja mustuu hyvin nopeasti. Usein aloituskappale oli jo hyvää vauhtia tummumassa matkalla mikroskoopin alta koeputkeen. Ruskettuminen solukkoviljelmissä on yleinen ongelma ja sitä on havaittu tapahtuvan sekä lisäys-, pitenemis- että juurrutusvaiheessa (Scalbert ym. 1988). Yleensä syynä pidetään soluissa olevien fenolisten yhdisteiden hapettumista. Tässä työssä, kuten myös muiden tutkijoiden töissä, havaittiin selvä yhteys voimakkaan ruskettumisen ja heikon regeneraatiokyvyn välillä (Sha ym. 1985).

Tutkimus on tehty yhteistyössä unkarilaisen Falco Facombinat in kanssa. Tämä puunjalosteollisuutta harjoittava suurehko liikelaitos vastaa Suomessa esim. Enso-Gutzeitia: sillä on oma puuntuotanto ja -jalostus. Falco Facombinatilla on omat metsäalueensa, siemenviljelykset, taimiviljelmät sekä mikrolisäyslaboratorio. Tuotannossa on huonekaluja, parkettia, paneleja, taloelementtejä jne, jotka valmistetaan pääasiassa tammesta. Mikrolisäyslaboratoriossa käytettiin lähtömateriaalina

lähes pelkästään täysikasvuisen tammen silmuja eli tarkoituksena on ollut saada lisättyä tunnettuja “eliittiyksilöitä”.

### **Kokeet ruskettumisen ehkäisemiseksi**

Viljelmien aloitukseen käytettiin tammen silmuja, jotka olivat peräisin joko Suomesta (Loppi, Turku, Oulu) tai Unkarista (Szombathely). Emopuiden ikä vaihteli 5-90 vuoteen, osa oli vartteita. Jonkin verran viljelmiä aloitettiin myös unkarilaista alkuperää olevista siemenalkioista.

Ruskettumisongelmaa pyrittiin estämään tai lieventämään erilaisilla esikäsitelyillä. Silmujen steriloinnin jälkeen kärkimeristeemit preparoitiin esiin mikroskoopin alla ja leikattiin irti silmusta siten, että mukaan tuli noin millimetrin pituinen pala alapuolella olevaa solukkoa. Palaset siirrettiin sen jälkeen steriiliin tislattuun veteen, johon oli lisätty joko liukoista PVP:ta (polyvinyylipyrrolidoni, PVP 90) (5 g/l), askorbiinihappoa (100 mg/l), sitruunahappoa (100 mg/l) tai kysteiniä (10 mg/l). Kasvimateriaalin annettiin olla liuoksessa 30-60 min, jonka jälkeen se siirrettiin kasvatusalustoille pieniin koeputkiin.

Kasvualustana kokeiltiin eri tutkijoiden kehittämiä alustareseptejä (Murashige ja Skoog 1962, Schenk ja Hildebrandt 1972, Lloyd ja McCown 1980) yhdistettynä erilaisiin hormonikombinaatioihin ja -konsentraatioihin. Parhaimman tuloksen antoi WPM-alusta (Lloyd ja McCown 1980). Aloituslustoissa paras yhdistelmä kasvun sääteitä oli BAP 1 mg/l, NAA 0.01 mg/l ja adeniinisulfaatti 20 mg/l. Runsain versojenmuodostus saatiin kinetiinillä (2 mg/l) ja NAA:lla (0.02 mg/l). Juuria kehittyi hormonittomalla 1/2 MS-alustalla (Murashige ja Skoog 1962).

### **Tulokset**

Kontrolleihin verrattuna ruskettumista saatiin ehkäistyä kaikilla käytetyillä esikäsitelyaineilla (Taulukko 1). Askorbiinihappo antoi parhaan ja pitkäaikaisimman tuloksen. Sitruunahappokäsittely oli yhtä tehokas siirännäisen mustumisen ehkäisijänä, mutta vaikutus oli lyhytaikaisempi. Kysteini ja PVP ehkäisivät ruskettumista huomattavasti huonommin ja vaikutus hävisi nopeasti. Yleensä näin käsitellyt siirännäiset kasvoivat huonosti. PVP:n onkin havaittu ehkäisevän tehokkaasti ruskettumista, mutta samalla myös kasvua (Hilderbrandt ja Harney 1989).

Taulukko 1. Meristeemien elinkyky (%) 3, 4, 8 ja 10 viikon kuluttua viljelyn aloittamisesta. Mitä suurempi luku sitä suurempi osa materiaalista pysyi vihreänä ja kasvoi jonkin verran. *Q.r.* = *Quercus robur*, *Q.p.* = *Q. petraea*, 25-v, 80-v jne = emopuun ikä, HUN = Unkari, FIN = Suomi, a.a. = askorbiinihappo, c.a. = sitruunahappo, cys = kysteini, PVP = polyvinyylipyrrolidoni. n = 25.

Laji/ikä alkuperä	käsittely	3 viikkoa	4 viikkoa	8 viikkoa	10 viikkoa
<b>Silmut</b>					
<i>Q.r.</i> , kontrollit		70	0		
80-v, HUN	PVP	80	0		
80-v, HUN	c.a.	80	20	0	
80-v, HUN	cys	70	45	10	0
25-v, HUN	a.a.	70	55	50	50
80-v, HUN	a.a.	75	60	55	50
75-v, FIN	a.a.	95	80	65	60
<i>Q.p.</i> , kontrollit	-	10	0		
25-v, FIN	cys	80	50	25	0
25-v, FIN	PVP	80	70	35	0
25-v, FIN	c.a.	100	90	80	30
25-v, FIN	a.a.	100	100	95	75
25-v, HUN	a.a.	100	100	90	85
<b>Alkiot</b>					
<i>Q.r.</i> , control	-	50	40	30	30
<i>Q.r.</i>	cys	65	45	45	45
<i>Q.r.</i>	PVP	65	55	45	45
<i>Q.r.</i>	c.a.	75	75	75	75
<i>Q.r.</i>	a.a.	75	75	70	70
<i>Q.p.</i>	a.a.	80	80	80	80

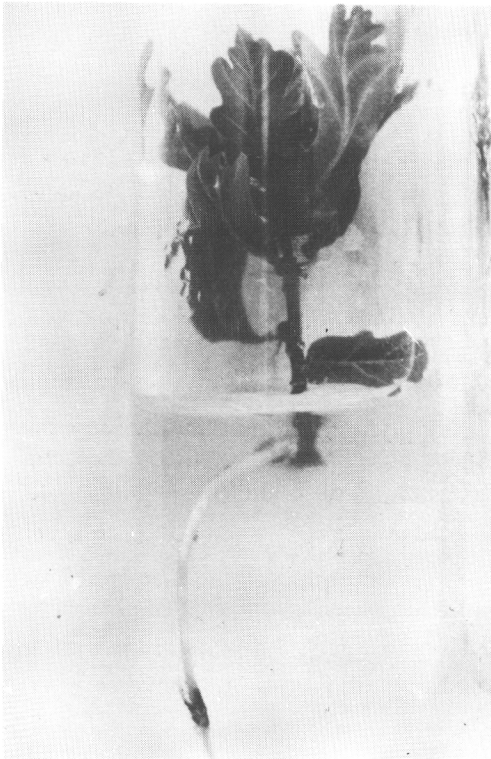
Siemenalkioihin eivät esikäsitteletyt vaikuttaneet yhtä paljon, koska ruskettuminen oli niillä pienempi ongelma ja alkiot kasvoivat muutenkin paremmin kuin silmuista aloitetut viljelmät. Koska koko alkio laitettiin kasvatusalustalle, sitä myös tarvitsi leikata ja haavoittaa vähemmän kuin silmua. Suurin hyöty esikäsitteleyistä alkiolle saatiin saastumisen alentumisen myötä.

Jo kasvamassa olevien ruskettuvien taimien uudelleen huuhtelu jollakin ruskettumista ehkäisevällä aineella oli haitallista kasvun kannalta. Tulos viittaisi siihen, että haavoittuneen solukon ruskettumismekanismi on erilainen kuin kokonaisen verson (Tóth ym. 1994).

PVP:n on todettu absorboivan fenoleja muodostamalla vetysidoksia ehkäisten siten fenolien hapettumisen. Askorbiinihappo, sitruunahappo ja kysteiini ovat pelkistäviä aineita (Loomis ja Battaile 1966). Ruskettumisen vähentymiseen vaikuttaa myös alhainen pH. Polyfenolioksidaasin toiminta on maksimaalisinta pH 6.5:ssa (Kurkdjian ja Guern 1989). Tässä työssä käytetyn askorbiinihappoliuoksen pH oli 2.9, sitruunahappoliuoksen 2.5, kysteiiniliuoksen 3.1 ja PVP:n 4.7.

Esikäsittelyaineet näyttivät siis ehkäisevän myös viljelmien saastumista. Esikäsittelemättömistä meristeemeistä saastui 40%, käsitellyistä 15%. Siemenalkioista saastui ilman käsittelyä 90%, käsitellyistä 50%. Askorbiinihappo, sitruunahappo ja kysteiini alensivat saastumista n. 30%, PVP n. 10%. Myös muut tutkijat ovat havainneet pH:n (pH 2.0-2.2) alentamisen ehkäisevän bakteerien kasvua (Gibbons ja Westby 1988).

Uusia versoja saatiin kaikenikäisestä materiaalista, mutta vain alkioista saadut versot pystyttiin juurruttamaan ja siirtämään turpeeseen (Kuva 1). Täysikasvuisista puista peräisin olevat aloituskappaleet tuottivat maksimissaan 5 versoa, alkiot 10-20 versoa noin 15 viikossa.



*Kuva 1. Juurtunut mikrolisätty tammen taimi. Aloituskappaleena käytetty siemenalkiota.*

## Fenolit

Fenolipitoisuus yleensä nousee kasveissa haavoittumisen tai infektioiden seurauksena. Fenolien hapettuminen on joko ei-entsyymaattista tai entsyymaattista. Katalysoivia entsyymejä ovat fenolioksidaasit tai peroksidaasit. Polyfenolioksidaasipitoisuus nousee nopeasti hapettavissa olosuhteissa, kuten haavoittamisen yhteydessä. On myös havaittu, että voimakas ruskettuminen on selvästi yhteydessä fenolien määrään (Amiot ym. 1992).

Myös tämän työn yhteydessä tehtiin jonkin verran kokonaisfenolimäärytyksiä, jotta voitaisiin selvittää fenoleiden ja huonon regeneraatiokyvyn välinen mahdollinen yhteys. Määrytykset tehtiin oksankappaleista, joissa oli mukana myös silmu. Kokonaisfenolit uutettiin kuivatusta ja jauhetusta materiaalista 50% metanolilla +80 °C:ssa. Määrytys tehtiin Folin-Denis-testillä käyttäen tanniinihappoa referenssinä (Burns 1963).

Eri alkuperien väliset kokonaisfenolipitoisuudet vaihtelivat 2-8.3% kuivapainosta. Vertailuna mainittakoon, että tammen (*Quercus robur*) kuoresta, sydänpuusta ja lehdistä on löydetty 3.5-8.7% pitoisuuksia (Scalbert ym. 1988) ja terhoista on määritetty 0.5-6% pitoisuuksia (Basden ja Dalvi 1987).

Mitään selkeää yhteyttä mikrolisäyksen onnistumisen ja alhaisemman fenolipitoisuuden välillä ei kuitenkaan havaittu. Esim. alkuperä, jonka fenolipitoisuus oli 5%, saatiin hyvin lisääntymään solukkoviljelmissä, mutta juurrutus ei onnistunut. Toisaalta 7%:n fenolipitoisuuden omaava emoyksilö lisääntyi huonosti viljelmissä, mutta oli helppo juurruttaa turpeessa.

Tutkimuksessa saatiin ratkaisevasti lievennettyä ruskettumisongelmaa, mutta tammen massalisäykseen ei päästy. Tällä hetkellä tammi ei kuulu unkarilaisen laboratorion lajivalikoimaan. Kaupallisessa yrityksessä ei ole mahdollisuutta uhrata työtä ilmeisen kannattamattomaan tutkimukseen. Tammitutkimuksen aikana saatiin tuotettua 10 kpl ulkona talvehtinutta *Q. robur*-tainta. Tätä nykyä Falco Fakombinatissa mikrolisätään ja markkinoidaan mm. tuhkapensasta (10 000 kpl/v), alppirusua (10 000 kpl/v) ja pensasmustikkaa (25 000 kpl/v).

## Solukkoviljely ja täysi-ikäiset puut

Täysikasvuisen puun ruutininomaiseen lisäämiseen soveltuva menetelmä on siis edelleen tammen, kuten myös useimpien muiden puulajien kohdalla kehittämättä. Viimeaikaisimmista täysi-ikäisten puiden lisäykseen liittyvistä solukkoviljelyjulkaisuista voisi mainita muutamia. Jättiläispunapuun (*Sequoia sempervirens*) 90-vuotiaan puun mikropistokkaita on saatu juurrutettua 2 vuoden *in vitro*-kasvatuksen jälkeen. Kasvatuksen aikana mikropistokkaat siirrettiin tuoreelle alustalle (1/2 MS + aktiivihiili) 2 kk:n välein. Tutkimuksessa havaittiin myös, että puun alaosasta otetut tyvivesapistokkaat juurtuivat helpommin kuin puun yläosasta otetut pistokkaat (Bon ym. 1994).

Euroopanlehtikuusella (*Larix decidua*) 140-vuotiaan puun silmuja saatiin lisättyä esikäsitellyn (hormoniton alusta) jälkeen. Mitä pidempään kasvi oli *in vitro*-viljelyssä ja mitä useammalla alustalla se oli kasvanut, sitä helpommin juurtuminen tapahtui. Jos käsittelyaika kasvoi yhdestä vuodesta kahteen, juurtumisprosentti kasvoi nollasta sataan. (Kretzschmar ja Ewald 1994).

Plataanin (*Platanus acerifolia*) mikrolisäystutkimuksessa käytetyt emopuut olivat 4-50 vuotiaita. Kaksikymmentä prosenttia 50-vuotiaiden puiden mikropistokkaista teki uusia versoja, 4 versoa/siirrännäinen. Nelivuotiailla vastaava luku oli 90% ja 10 versoa/siirrännäinen. Genotyypillä oli suuri vaikutus versonmuodostukseen (Gjuleva ja Atanasov 1994).

Tammen (*Quercus robur*) 70-300-vuotiaista emopuista otetut oksat pidettiin kasvihuoneessa, kunnes silmut puhkesivat ja uudet versot muodostivat silmun. Näin saaduista siirrännäisistä 5-30% tuotti n. 30 uutta versoa kukin. Mitä kauemmin kasvit olivat solukkoviljelyolosuhteissa, eli mitä useampia alustanvaihtoja, sitä tehokkaampi versojen tuotto saavutettiin. Käytetyllä kloonilla oli myös suuri vaikutus tulokseen. Juurtumisprosentti oli 15-40. (Vieitez ym. 1994).

Yhteisenä piirteenä kaikille edellisille menetelmille ovat suhteellisen pitkäaikaiset käsittelyajat ja useimmiten varsin alhaiseksi jäävä onnistumisprosentti. Versoja muodostui 2-10/siirrännäinen ja juurtumisprosentti vaihteli 15-100 %.

## Kirjallisuus

- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S. & Nicolas, J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food. Sci.* 57:958-962.
- Basden, K.W. & Dalvi, R.R. 1987. Determination of total phenolics in acorns from different species of oak trees in conjunction with acorn poisoning in cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 29:305-306.
- Bon, M.-C., Riccardi, F. & Monteuis, O. 1994. Influence of phase change within a 90-year-old *Sequoia sempervirens* on its *in vitro* organogenic capacity and protein patterns. *Trees* 8:283-287.
- Burns, R.E. 1963. Methods of tannin analysis for forage crop evaluation. *Georgia Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* 32:4-14.
- Chalupa, V. 1984. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* MILL.). *Biol. Plant.* 26:374-377.
- Favre, J.M. & Juncker, B. 1987. *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8:49-60.
- Gibbons, W.R. & Westby, C.A. 1988. Preventing contamination during diffusion fermentation of fodder beet cubes by pH control. *Biomass* 16:119-132.
- Gjuleva, V. & Atanasov, A. 1994. Micropropagation of *Platanus acerifolia* *in vitro*. *Silvae Genet.* 43:215-218.
- Hilderbrandt, V. & Harney, P.M. 1989. Identity of phenolic exudate inhibitor from *Geranium* explants. *Can. J. Plant Sci.* 69:569-575.
- Kretschmar, U. & Ewald, D. 1994. Vegetative propagation of 140-year-old *Larix decidua* trees by different *in vitro* techniques. *J. Plant Physiol.* 144:627-630.
- Kurkdjian, A. & Guern, J. 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:271-303.
- Lloyd, G. & McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30:421-427.
- Loomis, W.D. & Battaile, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5:423-438.
- Marks, T.R. & Simpson, S.E. 1993. Changes in the competence of *Quercus robur* 'Fastigiata' to grow *in vitro* as affected by seedling rootstocks and differential pruning. *J. Hort. Sci.* 68:815-824.
- Meier-Dinkel, von, A. 1987. *In vitro* Vermehrung und Weiterkultur von Stieleiche (*Quercus robur* L.) und Traubeneiche (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Allg. Forst- u. J.-Ztg.* 158:199-204.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:479-497.
- San-José, M.C., Vieitez, A.M. & Ballester, A. 1990. Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. *Silvae Genet.* 39:50-55.
- Scalbert, A., Monties, B. & Favre, J.-M. 1988. Polyphenols of *Quercus robur*: adult tree and *in vitro* grown calli and shoots. - *Phytochemistry* 27:3483-3488, 1988.
- Schenk, R.V. & Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Sha, L., McCown, B. H. & Peterson, L. A. 1985. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:631-634.

- Tóth, K., Haapala, T. & Hohtola, A. 1994. Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. *Biol. Plant.* 36:511-517.
- Vieitez, A.M., San-Jose, M.C. & Vieitez, E. 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. *J. Horticult. Sci.* 90:99-106.
- , Sánchez, M.C., Amo-Marco, J.B. & Ballester, A. 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37:287-295.

Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyilejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Mikrolisäys taimitarhakasvien emokasvihuollossa**

Marjatta Uosukainen  
MTT, Laukaan tutkimus -ja valiotaimiasema

### **Johdanto**

Vuosisadan alkupuoliskolla suomalaiset taimistot huolehtivat lisäysaineiston saataavuudesta ylläpitämällä varsin mittavia emotaimikokoelmia. Tämä perinne kuitenkin rikkoontui 1950-luvun lopussa ja 1960-luvun alussa. Voimakkaan rationalisoinnin ja kaupan vapautumisen seurauksena suomalainen taimituotanto ja taimikauppa siirtyi käyttämään etupäässä Keski-Euroopasta tuotua lisäysaineistoa siemeninä, jatkokasvatustaimina ja lopulta valmiina taimina (Uosukainen 1983). Tämän suuntauksen haittavaikutukset alkoivat näkyä 1970-luvun alussa varsinkin marjakasveilla, joilla ulkomailta tuotujen taimien mukana kulkeutuneet vaaralliset kasvitautit ja tuholaiset sekä toistuvat lajikkeiden sekaannukset aiheuttivat viljelyn kannattavuutta vaarantavia tekijöitä (Bremer 1983). Muilla taimitarhakasveilla tuonnin haittoina todettiin tuotujen kantojen heikko ilmastollinen sopeutuvuus, aineiston heikko soveltuvuus käyttötarkoituksiinsa ja lajiston suppeus (Alanko ja Tegel 1989).

### **Emokasvihuolto Suomessa**

Taimitarhakasvien emokasvihuolto käynnistyi Suomessa marjantuottajien painostuksesta. Marjakasvien taimien laadun parantamiseksi ja siten marjasatojen nostamiseksi aloitettiin vuonna 1973 SITRA:n rahoittamana tutkimusprojektina kokeilu laatuluokitellun taimituotannon, eli ns. tervetaimituotannon aikaansaamiseksi. Viranomaisten tarkastama taimituotanto vakiinnutettiin Suomessa 1976, ja on siitä lähtien toteutettu Maatalouden tutkimuskeskuksen (MTT) ja ns. tervetaimituotantoon erikoistuneiden yksityisten taimistojen yhteistyönä (Bremer 1983). Järjestelmä luotiin aluksi vain marjakasveja varten. Säädöstöjä muutettiin 1980-luvun alussa siten, että MTT:lle annettu emokasvihuolto käsitti taimitarhakasvit yleensä ja erikoistilauksesta myös muut puutarhakasvit. Laatuluokitellun aineiston tuotantoa valvoo Kasvintuotannon tarkastuskeskus.

Viherrakentamiskasveilla ja muilla puutarhakasveilla järjestelmää ei ole toistaiseksi ulotettu varsinaiseen käyttötaimituotantoon. Julkinen sektori on suurin viherrakentamiskasvien kuluttaja, sillä kunnallinen puistotoimi ja Tielaitos käyttävät vuosittain satoja miljoonia veromarkkoja viherrakentamiseen. Jokainen epäsovivasta kasvimateriaalista johtunut epäonnistuminen istutustyössä merkitsee työn uusimisenä ja pitkittyneenä istutuksen jälkeisenä hoitotyönä uuden taimen hinnan lisäksi 10-20 kertaista ylimääräistä kustannuserää. Tästä syystä kunnallinen viherrakentamiskasviaineisto ja sen saatavuus tulisi olla alan suurimmalle rahoittajalle tärkeä. Voidaankin syyllä sanoa, että järjestetyille emokasvihuollolle on selvä yhteiskunnallinen tilaus.

### **Mikrolisäys tauti- ja tuholaispuhdistuksessa**

Meristeemiviljelyä, versonkärkiviljelyä sekä niiden jatkona viljelmien mikrolisäystä käytettiin alusta asti emokasvihuollon kehittämistyössä (Bremer ja Korhonen 1978). Ensimmäiset sovellutukset olivat mansikan ja vadelman tauti- ja tuholaispuhdistus. Tervetaimituotannon vakiintuessa nimenomaan mansikka on ollut mikrolisäyksen hyödyntämisessä mallikasvina. Mikrolisäystä käytetään mansikalla nykyisin kautta koko laatuluokiteltujen taimien tuotantoketjun: ydinkasviehdokkaiden puhdistuksessa, ydinkasvien ylläpidossa ja uusimisessa, valiotaimituotannossa ja vähäisessä määrin myös tervetaimituotannossa (Uosukainen 1986, Uosukainen ja Kurppa 1988).

Meristeemiviljely yhdessä mikrolisäyksen kanssa on maailmanlaajuisesti hyväksytty yhtenä viruspuhdistusmenetelmänä laatuluokitellun taimituotannon perusaineiston puhdistamisessa. Meristeemiviljely on lisäksi todettu tehokkaaksi menetelmäksi varsiankerosten, punkkien ja yleensä myös sienitautien puhdistamiseksi perusaineistosta (Bremer 1983, Uusitalo ym. 1993). Kokemus on kuitenkin osoittanut, että meristeemiviljely ei ole riittävä toimenpide mykoplasman kaltaisten organismien (Uusitalo ja Uosukainen 1988) ja kasvien sisäisten bakteerien torjumisessa (Savela ja Uosukainen 1994). Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla on vuonna 1994 eristetty ulkomailta saadusta näennäisesti puhtaasta viljelmästä myös piilevänä pysynyt sieni, jota ei ole toistaiseksi pystytty tunnistamaan. Edellä mainituista syistä johtuen meristeemiviljelyä käytetäänkin nykyisin aina yhdistettynä muihin tauti- ja tuholaispuhdistusmenetelmiin, kuten lämpökäsittelyyn, lämmivesikäsittelyyn ja tarvittaessa myös kemoterapiaan (Uusitalo ym. 1993).

Tauti- ja tuholaispuhdistuksessa käytetyt menetelmät ovat pohjautuneet käytettävän emotaimiyksilön käsittelyihin *in vivo*. Meristeemiviljelyä ja mikrolisäystä on hyödynnetty vasta emotaimen lämpökäsittelyn jälkeen. Ollakseen tehokkaita, nämä käsittelyt saattavat kestää useita viikkoja, minä aikana puhdistettava kasvi usein kuolee. Lisäksi nämä käsittelyt onnistuvat yleensä vain alkukeväästä tehtyinä. Kustannusten alentamiseksi on nykyisin alettu kehittää mikrolisäysvaiheessa annettavia käsittelyjä, kuten lämpökäsittely, kemoterapia ja antibiootikkäsittelyt. Mikrolisäyksessä käsittelyt voidaan antaa pienemmille solukoille, ne vaativat lyhyemmän ajan ja epäonnistumisten sattuessa käsittely voidaan nopeasti toistaa vuodenajasta riippumatta. Nämä menetelmät vaativat tuekseen myös uusia herkempiä testausmenetelmiä.

### **Mikrolisäyksessä olevat taimitarhakasvit**

Mikrolisäys on omaksuttu suomalaisessa taimitarhatutkimuksessa ja -tuotannossa nopeasti. Vuodesta 1980 lähtien Helsingin yliopiston Kasvinjalostustieteen laitoksen alppirusujalostusohjelmassa alettiin soveltaa mikrolisäysmenetelmää puuvartisten kasvien jalostuksessa ja sen jälkeen uusien lajikkeiden taimilisäyksessä (Uosukainen ja Tigerstedt 1988). Nykyisin taimitarhakasvien emotaimihuollossa hyödynnetään mikrolisäystekniikkaa yleisesti sekä puhdistusvaiheessa että aineiston lisäyksessä. MTT:n Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla vuonna 1995 emotaimihuollossa olevilla kasveilla (Hokka ym. 1994) käytettiin mikrolisäystä kaikkiaan 32 kasvisukuun kuuluvan 92 kasvilajin lisäyksessä. Lisäyksessä oli kaikkiaan 189 lajiketta tai kantaa, joista 99 oli viherrakentamiseen käytettäviä pensaita, 67 marjakasvi- tai hedelmäpuulajiketta ja 23 perennalajiketta (taulukko 1). Laukaassa lisättyä emokasviaineistoa myydään kaikille halukkaille rekisteröidyille taimistoille joko emotaimiksi tai hankalimmin lisättäviä kasveja myös jatkokasvatustaimiksi.

Mikrolisäystä on tehokkaasti hyödynnetty myös Oulun yliopiston toimesta Pohjois-Suomesta kerättyjen kasvikantojen keräyksessä ja lisäyksessä Haapala ja Niskanen (1992) raportoivat 41 kasvin lisäysmenetelmät, jotka oli kehitetty Oulun yliopiston kasvitieteellisen puutarhan mikrolisäyslaboratoriossa. Yliopistolla kehitetyt menetelmät oli luovutettu Kempeleen ja Rovaniemen puutarha- ja maatalousoppilaitoksiin perustetuille mikrolisäyslaboratorioille, jotka tuottavat mikrolisättyjä taimia Pohjois-Suomen taimistoille. Kuopion yliopiston pensasmustikka- ja mesimarjatutkimuksissa ja ko. taimien tuotannossa mikrolisäyksestä on tullut vakiintunut osa taimituotantoa. (Paasisalo ym. 1993, Kokko ym. 1993). Mikrolisäyksellä saavutettu etu on ollut emokasviaineiston nopea leviäminen taimistoihin ja tuotetun emoineiston nuorentuminen ja siten parantunut lisääntymiskyky mikrolisäyksen seurauksena.

Taulukko 1. Maatalouden tutkimuskeskuksen Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla mikrolisäyksessä olevien kasvien suvut sekä lajien, lajikkeiden ja/tai kantojen lukumäärät.

Suku	Laji kpl	Lajike tai kanta kpl
<b>Viherrakentämiskasvi:</b>		
<i>Actinidia</i>	1	1
<i>Amelanchier</i>	2	2
<i>Andromeda</i>	1	1
<i>Betula</i>	2	2
<i>Diervilla</i>	1	1
<i>Forsythia</i>	3	4
<i>Fothergilla</i>	1	1
<i>Hydrangea</i>	4	9
<i>Kolkwitzia</i>	1	1
<i>Lonicera</i>	7	19
<i>Malus</i>	3	5
<i>Philadelphus</i>	3	9
<i>Pieris</i>	1	1
<i>Prunus</i>	6	13
<i>Ptelea</i>	1	1
<i>Rhododendron</i>	4	4
<i>Ribes</i>	1	1
<i>Rosa</i>	8	10
<i>Sorbus</i>	1	2
<i>Spiraea</i>	5	6
<i>Syringa</i>	2	2
<i>Viburnum</i>	1	1
<i>Weigela</i>	1	3
<b>Marjakasvit:</b>		
<i>Aronia</i>	1	1
<i>Fragaria</i>	2	17
<i>Hippophae</i>	1	2
<i>Ribes</i>	1	3
<i>Rubus</i>	3	14
<i>Vaccinium</i>	3	4
<b>Hedelmäpuut:</b>		
<i>Malus</i>	2	7
<i>Prunus</i>	3	16
<i>Pyrus</i>	1	3
<b>Perennakasvit:</b>		
<i>Dicentra</i>	1	1
<i>Hemerocallis</i>	1	1
<i>Phlox</i>	2	21
Yhteensä: 43 kpl	81 kpl	189 kpl

Mikrolisäyksen hyödyntämisen esteenä tavallisessa taimituotannossa on useimmiten taimien hinta. Varsinkin hyötykasvien, kuten mansikan, taimituotannossa mikrolisätyjen taimien hinta on harvoin kilpailukykyinen rönsytaimien hintaan verrattuna. Hankasilmujen kautta tapahtuvaan versojen lisäykseen pohjautuvassa mikrolisäyksessä taimen hinta on kasvilajista riippuen yleensä 1,5-3 mk/kpl. Täten lopputuotteen hinta ratkaisee, missä määrin mikrolisäystä halutaan käyttää kasvien taimituotannossa. Esimerkiksi vaikeasti lisättävien hedelmäpuiden lisäyksessä mikrolisäys on tuonut selvää etua. Luumuilla ja kirsikoilla mikrolisäys on selvästi halvempi menetelmä kuin perusrunkovarrennokseen perustunut lisäys, lisäksi mikrolisätyt taimet ovat kasvutavaltaan parempia sekä kehitykseltään nopeampia kuin varrennetut tai juurivesoista lisätyt taimet (Uosukainen 1992). Mikrolisäyksen edut ja haitat sekä tuotannon kannattavuus on aina tarkasteltava tapauskohtaisesti.

### **Mikrolisätyjen taimien laatu**

Mikrolisäystä käytettäessä keskeisin kysymys ei nykyisin ole kasvin mikrolisäysmenetelmän tunteminen. Kysymys on yhä useammin siitä, minkä laatuista versoja mikrolisäyksellä tuotetaan ja millainen on tuotetun aineiston kyky sopeutua mikrolisäysvaiheen jälkeiseen taimikasvatukseen. Lisätyn aineiston sisäiseen laatuun on tästä syystä kiinnitettävä huomiota. On todettu, että emotaimiaineiston lisäksi lisäystekniikka, viimeiset lisäysalustat ja olosuhteet ennen juurrutusta sekä juurrutustekniikka vaikuttavat lopputuotteen eli taimien lopulliseen laatuun ja jatkokasvuun. Tästä syystä kasvien mikrolisäystudkimus ei saisi rajoittua vain laboratoriovaiheeseen. Lisäysmenetelmän tehokkuutta tulisi tarkastella, ei pelkästään lisäykertoimina ja juurrutusprosentteina, vaan tuotettujen taimien laatuina *in vitro*-vaiheen jälkeen. Taimituottajan kannalta avainkysymyksiä ovat tuotettujen taimien kyky selviytyä siirrosta normaaliviljelyyn ja taimien jatkokasvatusominaisuudet.

Eräänä keskeisenä laatuongelmana on lisätyn aineiston aitous. Viljelijät ovat hyvin tietoisia mutaatoriskistä. Riskin suuruutta ei tarkkaan tunneta kovin monilla kasveilla. Ilmeistä kuitenkin on, että muuntelun riski ei ole yleinen ongelma, vaan riski on genotyypikohtainen. Mikrolisäyksen etuina mainitut nopeus ja tehokkuus ja siten myös tuotantokustannusten alentuminen voidaan saavuttaa vain menetelmillä, joilla mutaatoriski on suuri. Tästä syystä nopea ja luotettava menetelmä poikkeavien tyyppien paljastamiseksi jo mikrolisäysvaiheessa olisi tarpeen. Valitettavasti laadun testausmenetelmiä ei ole saatu käytännön sovellutustasolle.

**Kirjallisuus:**

- Alanko, P. & Tegel, S. 1989. Keskus-tutkimus. Kestäviä koristekasveja viherrakentamisen tarpeisiin. SITRA. Sarja B, n:o 98. 111 s. Helsinki.
- Bremer, K. 1983. Ydinkasvien tuottaminen kasvisolukkoviljelyn avulla. Maatalouden tutkimuskeskus Kasvitautilien tutkimuslaitoksen tiedote n:o 38. 63 s. Vantaa.
- , Korhonen, P. 1978. Kasvusolukkojen käyttö ydinkasvien tuotossa. Maatalouden tutkimuskeskus. Kasvitautilien tutkimuslaitoksen tiedote n:o 31. 45 s. Vantaa.
- Haapala, T. & Niskanen A.-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. VAPK-kustannus. Opetushallitus. 93 s. Helsinki.
- Hokka, H., Lahtonen, V. & Toivakka, R. 1994. Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla tuotannossa oleva emokasviaineisto. MTT, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema. Viljelijätiedote 5/95. Laukaa, 10 s.
- Kokko, H., Kärenlampi, S., Rissanen, E., Tammisola, J. & Kärenlampi, L. 1993. EY-markkinakelpoisten tuotteiden etsiminen ja kehittäminen: Mesimarjan uudet kannat. Raportti vuosina 1990-1992 suoritetuista tutkimuksista. 28 s. Kuopion Liikekirjapaino Ky., Kuopio.
- Paasisalo, S., Hiltunen, L., Kärenlampi, S. & Banttari, E. 1993. Puolikorkean pensasmustikan taimituotanto ja viljelykokeet Savossa vuosina 1986-1992. Kuopion yliopiston julkaisuja C. Luonnontieteet ja ympäristötieteet 10. 54 s. Kuopio.
- Savela, M.-L. & Uosukainen, M. 1994. Characterization of bacteria contaminating tissue cultures of apple rootstock 'YP'. J. Appl. Bacteriol. 76:368-376.
- Uosukainen, M. 1983. Ornamentals. Acta Agric. Scand. Suppl. 23:111.
- 1986. Bioteknologia terveen taimimateriaalin tuottamisessa. Maataloustieteen päivät. Suomen Maataloustieteellisen Seuran Tiedote 7:60-63.
- 1992. Mikrolisätyt luomupuut - maasta se pienikin ponnistaa. Puutarha 95:86-88.
- & Kurppa, A. 1988. Production of healthy planting material. Ann. Agric. Fenn. (Seria Phytopatologia, n:o 106) 27:209-218.
- & Tigerstedt, P.M.A. 1988. Breeding of frosthady rhododendrons. J. Agric. Sci. Finl. 60:235-254.
- Uusitalo, A. & Uosukainen M. 1988. Mansikan viherkukkaisuustauti. Puutarha 91:106-108 s.
- , Uosukainen, M. & Savela, M. 1993. Menettelyohjeet. Maatalouden tutkimuskeskus, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema. 19 s. Jokioinen.

Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyilejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## Eri koivuruostekantojen aiheuttaman infektion alkuvaiheen SEM-tarkastelu koivuklooneilla

Marja Poteri<sup>1</sup> ja Leena Ryynänen<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Helsingin yliopisto, Kasvibiologian laitos  
<sup>2</sup>Metla, Punkaharjun tutkimusasema

### Johdanto

Koivuruoste, *Melampsorium betulinum* (Fr.) Kleb., kellastuttaa loppukesällä koivun lehtiä. Ruosteinfektio on haitallinen lähinnä koivuntaimille, jotka varistavat lehtensä ennenaikaisesti, mistä voi seurata kasvutappioita sekä hallavauriota (Lilja 1973). Koivuruostetta esiintyy koko maassa kaikilla koivulajeilla, mutta ruosteesta on ilmeisesti syntynyt erilaisia kantoja, jotka aiheuttavat tietyllä koivulajilla voimakkaamman infektion kuin muilla koivulajeilla. Laboratoriossa tehdyissä saastutuskokeissa rauduskoivulta, *Betula pendula* Roth, kerättyjen ruostekantojen kyky infektoida hieskoivua, *B. pubescens* Ehrh., oli heikko (Poteri 1992).

Kasvien kestävydessä ruostesieniä vastaan voi olla suuria yksilöllisiä eroja, minkä vuoksi perimältään yhdenmukaisten koekasvien käyttö on suositeltavaa kokeellisessa tutkimuksessa. Koivun mikrolisäys (Ryynänen ja Ryynänen 1986) antaa mahdollisuuden testata koivuruosteen kestävyyttä sekä raudus- että hieskoivuklooneilla. Lisäksi ruostetestauksia voidaan tehdä jo *in vitro*-vaiheessa, jolloin säästetään versojen juurruttamiseen ja kloonitaimien kasvihuoneolosuhteisiin sopeuttamiseen kuluva aika.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli seurata pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (scanning electron microscope, SEM) tarttumaelimien (appressorioiden) muodostumista eri ruostekanta – koivulaji -vuorovaikutuksessa sekä kasvihuone- että *in vitro*-taimilla.

## Aineisto ja menetelmät

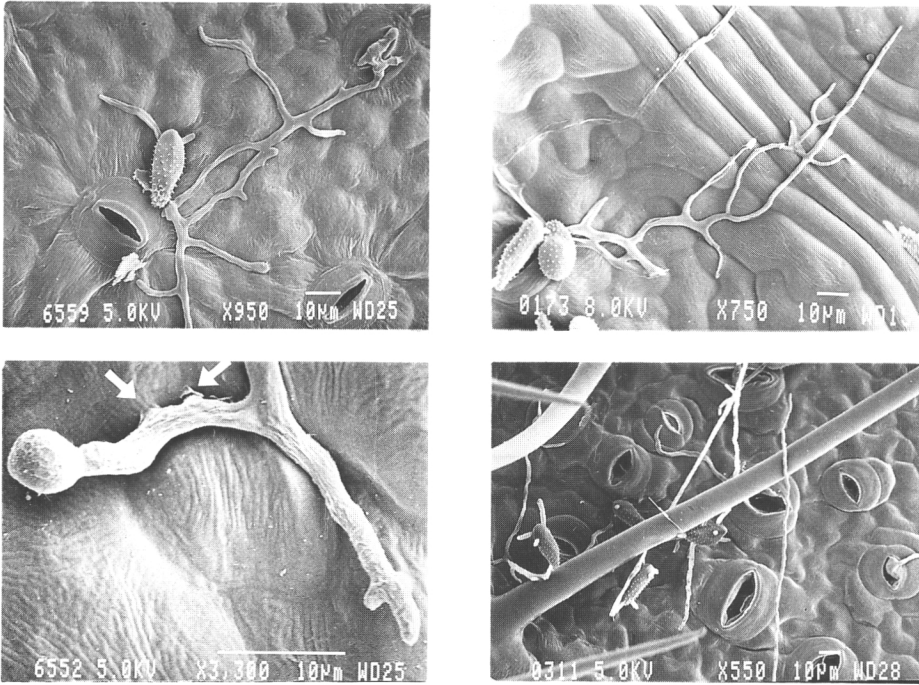
Tutkimuksessa käytettiin kolmea rauduskoivulta ja kolmea hieskoivulta luonnosta eristettyä ruostekantaa. Infektoitavana koivumateriaalina käytettiin kuuden raudus- ja kahden hieskoivun mikrolisäyksellä monistettuja (Ryynänen ja Ryynänen 1986) sekä *in vitro* -vaiheessa olevia että jo kasvihuoneessa kasvavia taimia. Kokonaiset *in vitro*-taimien lehdet ja kasvihuonetaimien lehdenpalaset saastutettiin levittämällä eri ruostekantojen kesäitiösuspensiota lehtien alapinnoille. Lehtiä inkuboitiin petri-maljoissa 18 – 20°C:een lämpötilassa 16/8 tunnin valo/pimeä-valaistuksessa. SEM-tutkimusta varten näytteet fiksoitiin glutaraldehydillä, dehydroitiin etanolilla ja kuivattiin kriittiseen pisteeseen ennen kultausta. Näytteet tutkittiin Helsingin yliopiston elektronimikroskopian laitoksella JEOL JSM-820 pyyhkäisyelektronimikroskoopilla käyttäen 4-8 kV:n jännitettä.

## Tulokset

Kesäitiöt itivät samanaikaisesti 2 – 4 ituhuokosesta, mutta yleensä vain yhdestä ituhuokosesta kehittyi pitkä iturihma, joka muodosti tarttumaelimiä (Kuva 1). Lehtisuonien päällä iturihmat kasvoivat kohtisuorasti suoniharjanteita vastaan (Kuva 2). Tarttumaelimen kehittyminen alkoi iturihman kärjen pullistumisella (Kuva 3). Seuraavaksi muodostui väliseinä, joka erotti syntyneen tarttumaelimen iturihmasta. Itävien kesäitiöiden pinnalta ja varsinkin kasvavien iturihmojen kärjistä erittyi mahdollisesti kiinnittymistä edistävää väliainetta (extracellular matrix, EM) (Kuva 3). Molemmilla tutkituilla taimityypeillä tarttumaelimiä muodostui ilmarakojen lisäksi runsaasti myös muualle lehtien pinnoille (Kuva 5).

Eri koivulajeilta kerätyt ruostekannat pystyivät itämään ja muodostamaan tarttumaelimiä molempien koivulajien kasvihuone- ja *in vitro* -taimilla. Myös raudusruosteisolaatit, jotka eivät saastuttaneet hieskoivuja, muodostivat tarttumaelimiä hieskoivun lehtien pinnalle ja ilmarakoihin.

Ilmarakoihin ja muualle lehden pinnalle muodostuneiden tarttumaelinten määrät erosivat toisistaan kasvihuonetaimilla. Rauduskoivukloonien lehdillä rauduskoivun ruosteisolaatit muodostivat tarttumaelimiä tilastollisesti merkitsevästi enemmän ilmarakoihin kuin muualle lehden pinnalle ( $G^2 = 21.698$ ,  $\chi^2_{0.001(1)} = 10.28$ ). Kasvihuoneessa kasvaneilla hieskoivuklooneilla oli tulos päinvastainen; hieskoivun ruosteisolaatit muodostivat tarttumaelimiä merkitsevästi enemmän muualle lehden pinnalle kuin ilmarakoihin ( $G^2 = 5.433$ ,  $\chi^2_{0.05(1)} = 3.841$ ).



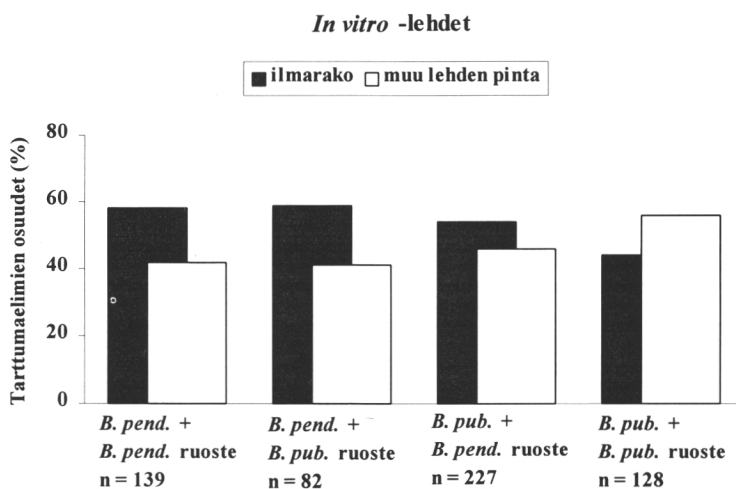
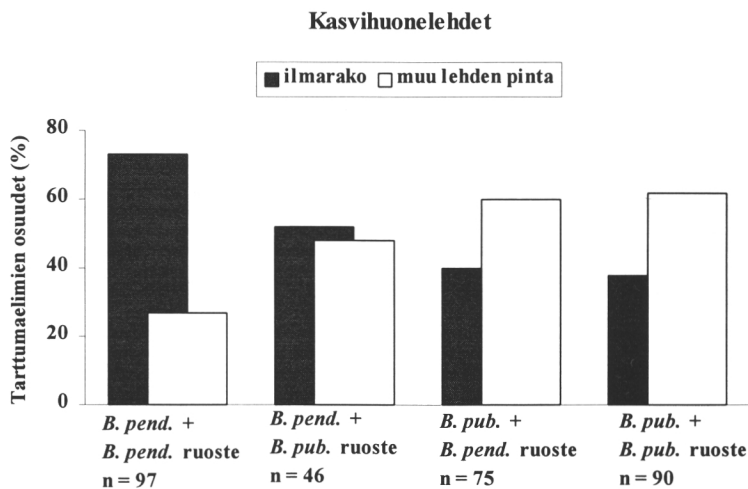
Kuva 1. (ylh. vas.) Kasvihuoneessa kasvatetun rauduskoivuklooni E4214 lehden alapintaa. Rauduskoivulta kerätyn ruostekannan kesäitiön iturihma on muodostanut tarttumaelimen ilmaraon päälle. Kuva 12 tuntia inokuloinnin jälkeen.

Kuva 2. (ylh. oik) Kasvihuoneessa kasvatetun hieskoivuklooni V5944 lehden alapintaa. Rauduskoivulta kerätyn ruostekannan kesäitiön iturihmat kasvavat kohtisuoraan yli lehtisuonen. Kuva vuorokauden kuluttua inokuloimista.

Kuva 3. (alh. vas.) Kasvihuoneessa kasvatetun hieskoivuklooni V5940 lehden alapintaa. Rauduskoivulta kerätyn ruostekannan kesäitiön iturihman kärki on pullistunut ennen varsinaisen tarttumaelimen muodostumista. Iturihmasta erittynyt myös väliainetta (EM; extracellular matrix) lehden pinnalle kiinnittymistä varten. Kuva 12 tuntia inokuloinnin jälkeen.

Kuva 4. (alh. oik.) Hieskoivuklooni V5940 *in vitro*-lehden alapinnalla itäneitä rauduskoivulta kerättyjä kesäitiöitä. Kesäitiöt ja iturihmat osittain irronneet lehden pinnalta. Kuva 20 tuntia inokuloimista jälkeen.

*In vitro* -taimien lehdillä oli kiinnittyminen heikompaa, mikä näkyi SEM-kuvissa iturihmojen irtoamisena lehden pinnalta (Kuva 4). Ilmarakoihin muodostuneiden tarttumaelinten määrissä oli eroja kasvihuone- ja *in vitro*-taimien välillä. Raudusruosteisolaatit muodostivat tarttumaelimiä ilmarakoihin tilastollisesti merkitsevästi enemmän rauduskoivujen kasvihuonetaimilla kuin *in vitro* -taimilla ( $G^2 = 6.176$ ,  $\chi^2_{0.05(1)} = 3.841$ ). Hieskoivujen *in vitro* -lehtien pinnoilla raudusruosteisolaatit muodostivat tarttumaelimiä ilmarakojen päälle tilastollisesti merkitsevästi enemmän kuin kasvihuonetaimien lehdillä itäessään ( $G^2 = 4.558$ ,  $\chi^2_{0.05(1)} = 3.841$ ).



Kuva 5. Koivuruosteen kesäitiöiden tarttumaelimiin osuudet (%) ilmaraoissa ja muualla lehden pinnalla raudus- ja hieskoivuklooneilla. Ylemmässä kuvassa kasvihuoneessa kasvatettujen raudus- ja hieskoivujen lehdenpalaset, jotka on inokuloitu raudus- ja hieskoivuilta kerätyillä ruostekannoilla. Alemmassa kuvassa sama inokulointi suoritettu in vitro-lehdillä.

## Tulosten tarkastelu

Useat ruostelajit tunnistavat isäntäkasvinsa lehden pinnanmuodostuksen perusteella (Allen ym. 1991). Samoin ilmarakojen huulisolujen korkeus on joissakin tapauksissa ärsyke, jonka vaikutuksesta kasvava iturihma alkaa muodostaa tarttumaelimiä (Hoch ym. 1985). Tässä tutkimuksessa eri koivuruostekannat pystyivät itämään ja muodostamaan tarttumaelimiä molempien koivulajien kasvihuone- ja *in vitro*-taimilla. Näin siitäkkin huolimatta, että hies- ja rauduskoivun lehdet eroavat anatomisesti toisistaan mm. siten, että tetraploidisella hieskoivulla on isommat ilmaraot kuin diploidisella rauduskoivulla (Kujala 1946). Tässä tutkimuksessa raudusruosteisolaatit, jotka eivät infektoineet hieskoivuja, muodostivat kuitenkin tarttumaelimiä ilmarakoihin hieskoivun lehdillä. Hieskoivujen kestävyys raudusruostetta vastaan ei siten todennäköisesti johdu epäonnistuneesta tarttumaelimen muodostuksesta infektion alkuvaiheessa, vaan selityksenä on mahdollisesti hieskoivun biokemiallinen puolustautuminen.

Tutkitussa aineistossa iturihmat irtosivat herkästi *in vitro*-lehtien pinnalta SEM-näytteiden valmistuksen aikana. Beckett ym. (1990) mukaan eri papulajien lehdillä ja keinotekoisilla pinnoilla pavunruoosten iturihmojen huono kiinnittyminen johtui ruosteitiöiden ja iturihmojen erittämän väliaineen (extracellular matrix, EM) heikommasta tuotannosta. Wynn ja Staples (1981) totesivat puolestaan eri *Puccinia*-ruosteilla tekemissään tutkimuksissa, että isäntäkasvin lehden kutikulan vahapeitteen kehittymättömyys voi johtaa huonoon väliaineen tuotantoon ja siten iturihmojen puutteelliseen kiinnittymiseen lehden pinnalle. Tässä tutkimuksessa käytettyjen *in vitro*-taimien lehdillä kutikulan rakenne on kosteiden kasvuolosuhteiden vuoksi kehittymättömämpi kuin kasvihuonetaimilla (ks. Smith ym. 1986). On ilmeistä, että vastaavanlainen kutikulan rakenteesta johtuva huono väliaineen tuotanto on heikentänyt iturihmojen kiinnittymistä myös koivujen *in vitro*-lehdillä. Syynä huonoon väliaineen tuotantoon voi olla myös lehden pinnan sopimattomuus kasvualustaksi, jos kasvi ei ole ruoosten luontainen isäntäkasvi (Wynn ja Staples 1981). Samanlaista iturihmojen irtoamista toisen isäntäkoivulajin lehtien pinnalta ei ollut havaittavissa, kun eri koivulajeilta kerätyillä ruostekannoilla infektoitiin raudus- ja hieskoivun kasvihuonetaimia. Tässä tutkimuksessa iturihmat irtosivat vain *in vitro*-lehtien pinnoilta riippumatta käytetystä ruostekannasta ja koivulajista.

**Kirjallisuus**

- Allen, E.A., Hazen, B.E., Hoch, H.C., Kwon, Y., Leinhos, G.M.E., Staples, R.E., Stumpf, M.A. & Terhune, B.T. 1991. Appressorium formation in response to topographical signals by 27 rust species. *Phytopathology* 81:323-331.
- Beckett, A., Tatnell, J.A. & Taylor, N. 1990. Adhesion and pre-invasion behaviour of urediniospores of *Uromyces viciae-fabae* during germination on host and synthetic surfaces. *Mycological Research* 94:965-875.
- Hoch, H.C., Staples, R.C., Whitehead, B., Comeau, J. & Wolf, E.D. 1985. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* 235:1659-1662.
- Kujala, V. 1946. Koivututkimuksia. Some recent research data on birch. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 34:1-36.
- Lilja, S. 1973. Koivun ruoste ja sen torjuminen. *Metsänviljelyn koelaitoksen tiedonantoja* 9:21-26.
- Poteri, M. 1992. Screening of clones of *Betula pendula* and *B. pubescens* against leaf rust fungus *Melampsorium betulinum*. *European Journal of Forest Pathology* 22:166-173.
- Ryynänen, L. & Ryynänen, M. 1986. Propagation of adult curly-birch succeeds with tissue culture. *Silva Fennica* 20:139-147.
- Smith, M.A., Palta, J.P. & McCown, B.H. 1986. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown Asian White Birch. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 111:437-442.
- Wynn, W.K. & Staples, R.C. 1981. Tropisms of fungi in host recognition. Ks. Staples, R.C. & Toenniessen, G.H. (toim.) *Plant Disease Control: Resistance and Susceptibility*. Wiley, New York, s. 45-69.

Oksa, E. (toim.) 1995  
 Metsäntutkimus uusissa puissa:  
 monistusta ja molekyyilejä  
 Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## Geenipankki pakkasessa: esimerkkinä koivun kryopreservatio

Leena Ryyänen  
 Metla, Punkaharjun tutkimusasema

### Johdanto

Geenipankkiin talletetaan edustava otos tietyn lajin perinnöllistä monimuotoisuutta. Perinnöllisen monimuotoisuuden säilyttämisen tavoitteena on mahdollistaa lajin sopeutuminen tuleviin elinolosuhteisiin (Ledig 1986). Kun kasveilla on riittävä perinnöllinen vaihtelu ovat sekä luonnonvalinta että jalostus mahdollisia. Metsäpuut eroavat useimmista monivuotisista lajeista siinä, että ne ovat pitkäikäisiä, tulevat myöhään sukukypsiksi ja ovat etupäässä ristipölytteisiä. Metsänjalostuksen tehtävä on huolehtia puiden perinnöllisen monimuotoisuuden säilymisestä.

Puiden perintöaineuksen säilytyksessä ja käsittelyssä on kolme huomioon otettavaa perusasiaa; ensimmäisenä on *säilytettävät kohteet* eli mitä säilytetään. Toisena seikkana *lajin perinnöllisen rakenteen tuntemus*, joka takaa sen, että otos, jonka avulla perinnölliset ominaisuudet säilytetään, sisältää riittävästi perinnöllistä vaihtelua. Kolmantena seikkana on *säilytysmenetelmä* so. *geenipankki*, joka määrätty sen mukaan, mitä tahdotaan säilyttää ja minkälainen otos siihen tarvitaan.

### Säilytettävät kohteet

Tärkeintä on estää yksittäisten *uhanalaisten lajien* kuoleminen sukupuuttoon, samoin varmistaa pienten *uhanalaisten populaatioiden* säilyminen. Suomessa ei ole uhanalaisia puulajeja, uhanalaisiksi populaatioiksi voidaan laskea joitakin jalojen lehtipuiden pieniä yksittäisiä populaatioita. Suomessa varsin tärkeitä säilytettäviä kohteita ovat *marginaalipopulaatiot*, pohjoisen metsärajan muodostavat populaatiot, jotka edustavat lajin äärimmäistä sopeutumista nykyisessä ilmastossa. *Peruspopulaatiot* ovat luontaisesti syntyneitä paikallisia ”maataisyksilöiden” muodostamia populaatioita, jotka edustavat lajin luontaista sopeutumista ja perinnöllistä vaihtelua nykyisissä kasvuolosuhteissa. *Tunnettujen erityisominaisuuksien perinnöll-*

*linen* vaihtelu säilyy parhaiten jalostuspopulaatioissa. Jalostus tuottaa metsänuudistamiseen lajeja, joilla on tiettyjä huippuominaisuuksia, esim laadun suhteen. Ajan myötä voivat halutut ominaisuudet muuttua. Näihin tuleviin haasteisiin voidaan vastata vain, jos on jalostuspopulaatioita, joissa nykyisten tunnettujen huippuominaisuuksien lisäksi säilytetään sellaisia tunnettuja ominaisuuksia, jotka vasta olosuhteiden tai kysynnän muuttuessa ovat merkityksellisiä. Toisaalta puissa voi olla vielä moniakkin “löytämättömiä” ominaisuuksia. Tämä ns. *tuntematon perinnöllinen vaihtelu* pitää myös saada säilymään.

### **Perinnöllisen rakenteen tuntemus**

Lajin perinnöllistä rakennetta voidaan tutkia eri menetelmillä ja perintötekijöiden säilytyksestä tulisi päättää useamman eri menetelmän tulosten perusteella. Vanhimpia tutkimusmenetelmiä on *morfologisten markkerien* käyttö. Näiden avulla, esim. männyn siemenen ja lenninsiiven erilaisen värityksen perusteella, voidaan eri genotyyppejä erottaa toisistaan. *Numeerisesti mitattavat markkerit*, esim. vuosikasvu, voivat osoittaa hyvää sopeutuneisuutta, mutta ovat monen geenin yhteisvaikutuksia, joten yksittäisten geenien vaikutusta ei voida tunnistaa. *Biokemiallisten markkerien* esim. isoentsyymien avulla geenit on helppo tunnistaa ja ne voivat osoittaa sopeutumisen perinnöllistä vaihtelua. *Molekulaaristen markkerien* (DNA-tekniikat) avulla saadaan täsmällinen tieto perinnöllisestä rakenteesta, mutta ei vielä puiden sopeutuneisuudesta vallitseviin kasvuolosuhteisiin. Näitä tietoja on vain tärkeimmistä puolajeastamme, metsämännystä, kuusesta ja rauduskoivusta. Muiden lajien perinnöllistä rakennetta täytyy arvioida niiden ekologian perusteella. Esim: populaatioiden välinen perinnöllinen vaihtelu on suurempaa kuin populaation sisäinen vaihtelu, jos populaatiot ovat pieniä ja sijaitsevat erillään toisistaan, laji on hyönteispölyttäjä, siemenen leviäminen on rajoittunutta tai laji on pioneerilaji.

### **Säilytysmenetelmät**

Säilytysmenetelmän valinta riippuu siis siitä, mitä ollaan taltioimassa. Toisaalta eri menetelmät täydentävät toisiaan ja aina tulisi käyttää useampaa geenipankkia yhtäaikaisesti.

Puiden perinnöllisen monimuotoisuuden säilytysmenetelmät jaetaan säilytyspaikan suhteen kahteen ryhmään: *in situ*- ja *ex situ*-menetelmiin. Karkeasti ottaen voidaan sanoa, että *in situ*-säilytysmenetelmiä käytetään kaikkeen muuhun perinnöllisen aineiston säilytykseen, paitsi jalostustarkoituksiin ja *ex situ*-menetelmiä käytetään en-

nenkaikeaa jalostustarkoituksiin. Pohjoismaissa on sovittu säilytysmenetelmien yhteisestä terminologiasta (A report of gene resources ....1992).

### *In situ*-menetelmät

*In situ*-menetelmissä populaatiot säilytetään alkuperäisillä kasvupaikoillaan ja niissä tapahtuu jatkuvaa uusiutumista ja sopeutumista.

Maailmanlaajuisesti merkittävimpiä geenipankkeja ovat *luonnonsuojelualueet*, joilla kaikkalainen luonnonkäsittely on kielletty. Yleensä luonnonsuojelualueet on perustettu muuhun tarkoitukseen kuin metsäpuiden suojeluun, mutta alueeltaan laaja-alaisina soveltuvat myös paikallisen puupopulaation perinnöllisen monimuotoisuuden säilyttämiseen. Tropiikissa luonnonsuojelualue on ainoa mahdollinen ratkaisu; tropiikin metsissä on samalla alueella runsaasti eri puolajaja, joiden siemen on hankalaa kerätä eikä suuren vesipitoisuutensa vuoksi kestä varastoinnin edellyttämää kuivattamista ja alhaisia lämpötiloja (öljypalmu, kookospalmu, kakaao, kahvi). Suomessa luonnonsuojelualueita on yhteensä n. 1 000 000 ha, käsittäen 15 luonnonpuistoa, 20 kansallispuistoa ja yli 1200 pienempää luonnonsuojelualuetta.

Toinen *in situ*-menetelmä on ns. *geenireservimetsät*, jotka on suunniteltu nimenomaan puiden perinnöllisen monimuotoisuuden säilyttämiseen. Geenireservimetsiä hoidetaan ja uudistetaan joko luontaisesti tai saman metsikön siemenellä niin, että metsässä on jatkuvasti eri-ikäistä puustoa. Geenireservimetsän minimiala, ulkopuolisen pölytyksen vähentämiseksi, on 100 ha. Suomessa on tavoitteena perustaa jokaista pääpuulajiamme kohden 20 geenireservimetsikköä eri puolille maata. Huh-tikuuhun 1995 mennessä on männylle (*Pinus sylvestris*) perustettu 17, kuuselle (*Picea abies*) 6 ja koivulle (*Betula pendula* ja *B. pubescens*) 3 geenireservimetsikköä. Lisäksi on lehmukselle (*Tilia cordata*) ja vaahteralle (*Acer platanoides*) perustettu 3 pienempää metsikköä. Näiden 29 geenireservimetsikön yhteispinta-ala on 5, 188 ha.

### *Ex situ*-menetelmät

*Ex situ*-menetelmässä säilytettävä perintöaines tallennetaan muualle kuin alkuperäiselle kasvupaikalleen, jopa puun luontaisen levinneisyysalueen ulkopuolelle. *Ex situ*-menetelmissä käytetään joko siemen/siementaimimateriaalia tai kloonimateriaalia.

Siemenalkuisella materiaalilla perustetaan *geenireservipopulaatiot* ja *pienet kerrannaispopulaatiot* (small multiple populations). Geenireservipopulaatioista mainittakoon esimerkkinä ulkolaiset havupuuviljelmät Suomessa. Pienet kerrannaispopulaatiot jaetaan kahteen alaryhmään. Ensimmäiseen kuuluu kaupallisesti merkityksellisten lajien populaatiot, joissa ei suoriteta metsänhoitotoimenpiteitä. Toiseen ryhmään kuuluvat taloudellisesti arvokkaat, sukupuultaan tarkoin tunnetut populaatiot. Tämän ryhmän populaatioita hoidetaan tehokkaasti ja käytetään jalostukseen. Esimerkkinä Imatralla sijaitsevat lehtikuusen siemenviljelykset. *Siitepölyn ja siementen varastointia* käytetään perinnöllisen monimuotoisuuden säilytykseen vain hyvin harvinaisilla lajeilla. Perintöaineksen säilytyksen kannalta täytyisi siementä varastoida yhtä pitkään, kun luonnossa kuluu siemenen itämisestä siihen, kun uusi sukupolvi tuottaa siementä (Bonner 1990). Käytännössä nykyisissä siemenvarastoissa säilytetään siementä lyhyehköjä aikoja metsänuudistamisen tarpeisiin.

Suomessa alkoi aineiston valinta metsänjalostusta varten 1940-luvulla. Tähän mennessä on fenotyyppisesti valittu n. 1 200 pluspuuta, joista suurin osa on kloonattu *kloonikokoelmiin* ja *kloonisiemenviljelyksiin*. Näiden yksilöiden perinnölliset ominaisuudet tunnetaan erittäin hyvin. Kloonikokoelmat on perustettu puiden perinnöllisen monimuotoisuuden säilyttämiseksi jalostus- ja tutkimustarkoituksiin, kloonisiemenviljelykset jalostuksellisesti ja fysiologisesti hyvälaatuisen siemenen tuottamiseksi (Kuva 1).



Kuva 1. Rauduskoivun kloonikokoelma (kok. 36) Punkaharjun tutkimusalueessa Laukan-  
saarella.

## Uudet *ex-situ* menetelmät: bioteknologiset geenipankit

Edelläesitetyt perinteiset säilytysmenetelmät ovat sopivia pohjoisiin oloihin, missä on runsaasti laaja-alaisia maa-alueita luonnonolosuhteisiin perustettavia *in situ*- ja *ex situ*-menetelmiä varten. Toisin on laita esim. tropiikissa; luonnonsuojelualueiden perustaminen on kilpajuoksua metsien lopullisen tuhoamisen ja muuhun käyttöön ottamisen välillä. Nimenomaan trooppisten puiden kohdalla on perinnöllisen monimuotoisuuden säilytyksessä edetty pitkälle käyttäen nykyisiä *bioteknologisia menetelmiä: in vitro-säilytystä ja kryopresevaatiota* (Engelmann 1991). Useimpiin perinteisiin menetelmiin verrattuna näillä on monia etuja, kuten aseptisuus, vähäinen tilan tarve ja ennen kaikkea perintöaines on suojattu ulkoisten olosuhteiden muutoksilta.

### *In vitro*-säilytys

Lajeilla, joille on kehitetty *in vitro*-viljelytekniikka, voidaan sitä soveltaa perinnöllisen monimuotoisuuden säilyttämiseen lyhyehköiksi ajoiksi. Menetelmän periaatteena on saada elintoiminnat ja kasvu hidastumaan ja siten pidentää siirrostusväliä. Helpoimmin tämä onnistuu alentamalla lämpötilaa ja vähentämällä valaistusta. Myös viljelyalustaa voidaan muuttaa siirrostusvälin pidentämiseksi. Puolittamalla mineraalit ja jättämällä sakkaroosi kokonaan pois, on kahvipensaan (*Coffea arabica*) siirrostusväli saatu pidennettyä kahteen vuoteen (Kantha ym. 1981). Alustassa voidaan käyttää myös erilaisia kasvunhidasteita, esim. ABAA (abskissiinihappo). Samoin ilman hapen määrän alentaminen aina 1 %:iin hidastaa kasvua. Siirto säilytykseen välittömästi siirrostuksen jälkeen parantaa säilyvyyttä, toisaalta juurellisten *in vitro*-taimien säilyvyys on hyvä. Viiljelyastian koolla voidaan vaikuttaa säilyvyyteen; pienessä astiassa kasvu on hidasta, mutta isommassa astiassa lehdet ja juuret säilyvät kauemmin elinkykyisinä. Tulevaisuudessa *in vitro*-säilytysmenetelmänä on mahdollisesti kasvullisen alkion sulkeminen kapseliin l. tekosiemen.

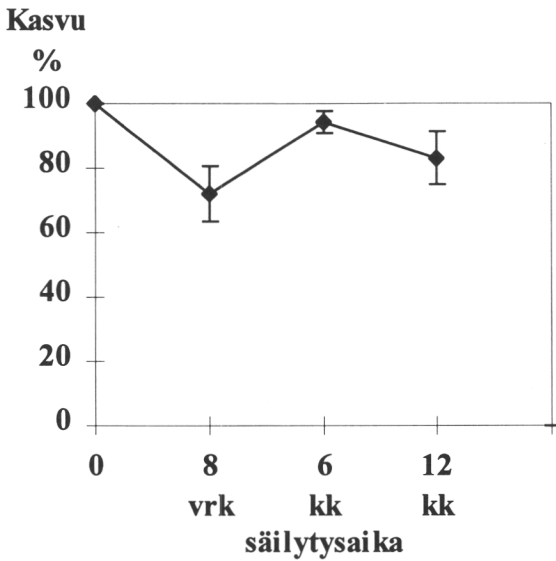
*In vitro*-säilytys soveltuu parhaiten täysin erilaistuneiden solukoiden säilytykseen. Suspensio- ja kallusviljelmissä solujen lisääntyminen vähenee nopeasti. Toisaalta pitkälinen varastointi saattaa johtaa tiettyjen genotyyppien valintaan. Siirrostus on aina kuitenkin välttämätöntä, joten suurien kokoelmien ylläpito on mahdotonta.

## Kryopreservaatio

Perintöaineksen pitkäaikaisessa säilytyksessä laboratorio-oloissa on kryopreservaatio so. varastointi hyvin alhaisissa lämpötiloissa, yleensä nestemäisessä tyypessä,  $-196^{\circ}\text{C}$ , ainoa mahdollisuus. Näin alhaisessa lämpötilassa on solujen jakautuminen ja kaikki aineenvaihdunta pysähdyksissä, ja kasvimateriaalia voidaan säilyttää muuttumattomana ainakin teoreettisesti rajoittamattomia aikoja. Kryopreservaatio suojaa materiaalin ulkoisten olosuhteiden muutoksilta vielä varmemmin kuin *in vitro*-säilytys, sen tilan tarve on vähäisempää eikä säilytysmenetelmä työllistä varastoinnin aikana. Toisaalta kryopreservaation onnistumisen edellytyksenä on säilytettävän solukon meristemaattisuus sekä regeneroitavuus. Kryopreservointimenetelmä riippuu paitsi pakastettavasta solukosta myös lajista. Menetelmänä kryopreservaatio on sikäli verrattavissa solukkoviljelyyn, että käytännössä jokainen laji ja jopa solukko vaatiin oman modifikaationsa menetelmään.

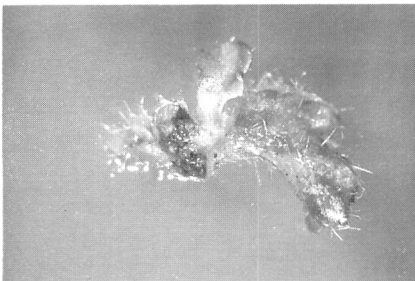
Koivun suoraan luonnosta kerättyjen, *in vivo*-silmujen kryopreservaatio onnistuu hyvin. Pakastettavana materiaalina on luonnossa karaistuneet, talvilevossa olevat silmut. Silmut irrotetaan oksista, suljetaan ampulleihin ja esijäädätetään hitaasti,  $10^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ,  $-38^{\circ}\text{C}$ :een, jonka jälkeen ne varastoidaan nestemäiseen tyypeen. Halutun pakastusajan jälkeen silmut sulatetaan ja solukkoviljely aloitetaan normaalin ruttiin mukaan. Solukkoviljelyssä ei koivun *in vivo*-silmuilla ole kryopreservoidulle materiaalille yleensä tyypillistä kasvuviihettä (lag phase), jona aikana minkäänlaista ulospäin näkyvää kasvua ei tapahdu, eikä solukon tummumista (Yakuwa ja Oka 1988), vaan kasvuunlähtö tapahtuu heti. Kaikki tutkitut kloonit käyttäytyvät samalla tavoin, eikä eripituisia aikoja nestetyypessä säilytettyjen silmujen kasvutulos poikkea pakastamattomien silmujen kasvusta (Kuva 2).

*In vitro*-materiaalin kryopreservoinnin etuna on pieni koko ja solukon aseptisuus, haittapuolena menetelmän vaatima suuritoinen esi- ja jälkikäsitteily. Koivun *in vitro*-silmujen kryopreservaatiomenetelmä on vielä kehityksen alaisena, mutta joitakin selviä tuloksia on jo olemassa. Pakastettavana materiaalina on käytettävä kasvavia versonkärkiä. Ennen pakastamista versot on talveennutettava kylmä/valokäsittelyllä. Koivun *in vitro*-solukoiden kryopreservaatio seuraa muutoin menetelmällisesti *in vivo*-silmujen pakastusta, mutta säilytyksen ajaksi suljetaan silmut ampulliin suoja-aineessa, joka ennen kasvun aloitusta täytyy poistaa huolellisella huuhtelulla. Versonkärkien suoja-ainekäsittelyn aloitus jo muutamaa vuorokautta ennen pakastusta parantaa kryopreservaation jälkeistä regeneraatiota. Suoja-aineena käytetty DMSO (dimetyylisulfoksiidi) ei ole toksista koivun versonkärjille toisin kuin esim. havupuiden embryonaalisille solukoille (esim. Klimanszewska ym. 1992, Lainé ym. 1992). Pakastettujen *in vitro*-versonkärkien regeneraatio poik -



Kuva 2. 8 vrk, 6 kk ja 12 kk nestetyössä säilytettyjen *in vivo*-silmujen kasvu sulatuksen jälkeen. O-kohdassa pakastamattomat silmut. Eri kasvatuskertojen välillä ei ole tilastollisesti merkitseviä eroja kasvutuloksessa.

keaa oleellisesti *in vivo*-materiaalista siinä, että kloonien väliset erot ovat merkittävät riippumatta käytetystä menetelmästä. Yleisesti versonkärjen erilaistunut solukko tuhoutuu pakastuksen vaikutuksesta, ja uusi kasvu alkaa lehden hankasilmusta 2 - 4 viikon viiveellä (Kuva 3). ABA-käsittelyllä saadaan regeneraatiotuloksia huomattavasti parannettua. Kloonien väliset erot ovat edelleen selvät, mutta parhaiten säilyvissä klooneissa (elävyys pakastuksen jälkeen n. 95%) kestävät jo erilaistuneet lehdet ja varsi kryopresevaation (Kuva 4).



Kuva 3. Kasvava hankasilmu *in vitro*-kryopresevaation jälkeen. Kuva 6 viikkoa sulatuksesta.

Kuva 4. Kasvava ABA-käsitelty versonkärki *in vitro* kryopresevaation jälkeen. Kuva 6 viikkoa sulatuksesta.

**Kirjallisuus**

- Bonner, F. T. 1990. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. *Forest Ecology and Management* 35:35-43.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm a review. *Euphytica* 57:227-243.
- Gene Resources of Forest Trees 1992. Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter 1992:580. Nordic Council of Ministers, Copenhagen 1992, 24s. + Liite 3s.
- Kartha, K. K., Mroginski, L. A., Pahl, K. ja Leung, N. L. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. *Plant Science Letters* 22:301-307.
- Klimaszewska, K., Ward, C. ja Cheliak, W. M. 1992. Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix x eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). *Journal of Experimental Botany* 43(246):73-79.
- Lainé, E., Bade, P. ja David, A. 1992. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Reports* 11:295-298.
- Ledig, F. T. 1986. Conservation strategies for forest gene resources. *Forest Ecology and Management* 14:77-90.
- Yakuwa, H. ja Oka, S. 1988. Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) stored in liquid nitrogen. *Annals of Botany* 62:79-82.

Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyylejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Typpiravinteet puuvartisten kasvien solukkoviljelmissä**

Hanna Laukkanen ja Anja Hohtola  
Oulun yliopisto, biologian laitos

### **Johdanto**

Typpi on kasveille välttämätön ravintoaine. Kasvit tarvitsevat typpeä mm. valkuaisaineiden, nukleiinihappojen, klorofyllin, monien vitamiinien ja hormonien valmistamiseen. Solukkoviljelmien kasvatusalustaresepteissä typpi esiintyy yleensä ammonium- ja kaliumnitraattina esim. MS- (Murashige ja Skoog 1962), BM- (Krogstrup 1986) ja LP-alustoissa (von Arnold ja Erikson 1981), joskus ammoniumsulfaattina ja kalsiumnitraattina esim. WPM- (Lloyd ja McCown 1980) ja GD-alustoissa (Gupta ja Durzan 1985). Typpeä on annettu kasveille myös orgaanisessa muodossa, erityisesti aminohappoina tai orgaanisen typen seoksina, kuten kaseiinina. Siinä, millaista typpeä kukin kasvi suosii, on eroja. Sen vuoksi ei ole yhdentekevää, missä muodossa ja suhteessa typpeä ravintoalustaan lisätään.

### **Liiallinen ammoniumtyppi voi olla haitaksi**

Vitrifikaatio, tässä merkityksessä hyperhydraatio, on monille solukkoviljelijöille tuttu ilmiö, jossa kasvit muuttuvat läpikuultaviksi heikentyneen lignifikaation seurauksena. Vitrifikaation syytä on paljon pohdittu ja erilaisia tutkimustuloksia esitetty (mm. Debergh ym. 1981, Bornman ja Vogelmann 1984, Kevers ym. 1984). Daguin ja Letoutzé (1986) havaitsivat korkean ammonium-ionipitoisuuden nostavan erityisesti juurissa olevan glutamaattidehydrogenaasientsyymin aktiivisuutta ja samalla indusoivan vitrifikoitumista pajulla (*Salix babylonica*). He tulivat siihen tulokseen, että kasvatusalustan ammoniumtyppipitoisuutta säätelemällä voidaan ehkäistä vitrifikoitumista.

Vitrifikaatiota esiintyy myös kallussolukoilla. Vitrifikoitunut ('habituated') kallus on vetistä, kellertävää ja haurasta verrattuna normaaliin, kiinteään kallukseen. Solujen seinissä on vähän selluloosaa, eikä ollenkaan ligniiniä (Crévecœur ym. 1987). Kun viljelmän ikä ylittää 14 vuorokautta, vitrifikoituneessa kalluksessa voidaan havaita

nopeasti kehittyviä nekroottisia alueita. Ilmiölle on tyypillistä myrkyllisten happiyhdisteiden kertyminen solukkoon (esim. vetyperoksidia hajottavat entsyymit puuttuvat), sekä proliinin ja polyamiinien määrän nousu häiriytyneen typpimetabolian seurauksena (Le Dily ym. 1993).

Ammonium-ionien on havaittu ehkäisevän kalluksen kasvua esim. strobusemännillä (*Pinus strobus*). Tutkimuksessa kallussolukon kasvu lakkasi kokonaan, kun typenlähteenä oli ammoniumkloridi, mutta vaikutus kumoutui, jos samanaikaisesti kasvatusalustaan lisättiin kaliumnitraattia (Kaul ja Hoffman 1993). Kloridi-ioneilla ei ollut vaikutusta kalluksen kasvuun.

Vuorivaahteran (*Acer pseudoplatanus*) suspensioviljelmillä tehdyissä kokeissa havaittiin, että muutokset, jotka ammoniumtyppi aiheutti solujen amino- ja orgaanisten happojen määriin, olivat pH:sta riippuvaisia (Goodchild ja Givan 1990). pH:n ollessa 5 ammonium-ionien ja aminohappojen määrissä ei tapahtunut muutoksia, toisin kuin korkeammassa ja matalammassa pH:ssa. Esim. jos pH laski alle 4 ammonium-ionien läsnäollessa, fosfoenolpyruvaattikarboksylaasin aktiivisuus laski voimakkaasti.

### **Ammonium- ja nitraattitypen suhteella merkitystä**

Paitsi typen kokonaismäärällä (esim. Nuutila ym. 1991), myös ammonium- ja nitraattitypen suhteella on todettu olevan merkitystä somaattisessa embryogeneesissä. Porkkanalla (*Daucus carota*) havaittiin, että pienikin määrä ammoniumkloridia lisäsi embryogeneesiä alustalla, jonka ainoana typpiravinteena oli ollut kaliumnitraatti. Samassa kokeessa myös glutamiinilla, glutamiinihapolla, urealla ja alaniinilla havaittiin samansuuntaista vaikutusta (Wetherell ja Dougall 1976). Puuvartisista kasveista esim. kuusella (*Picea abies* (L.) Karst) optimaalisen ammonium/nitraatti -suhteen on polyembryogeneesissä todettu olevan 0,2, kun samanaikaisesti alustaan lisätään 3,0 mM glutamiinia (Bozhkov ym. 1993). Appelsiinilla (*Citrus sinensis*) muutokset ammonium- ja nitraattitypen suhteessa vaikuttivat paitsi kallusten tuorepainoon, myös kasvatusalustojen pH-lukemiin (Niedz 1994).

Polyamiinit ovat eräs tärkeä tyyppi sisältävien yhdisteiden ryhmä. Kasvit tarvitsevat polyamiineja, kuten putreskiinia, spermidiiniä, spermiiniä, kasvun ja stressin säätelyssä. Erityisesti putreskiinin määrä voi nousta stressin yhteydessä huomattavasti. Tällöin putreskiinia tuotetaan eri reittiä kuin normaalissa kasvun säätelyssä. Altman ja Levin (1993) havaitsivat ammonium- ja nitraattitypen suhteella olevan merkitystä polyamiinien määrään tupakan suspensioviljelmässä. Putreskiinin määrä nousi, jos ammonium-ioneja oli liikaa. Typpiravinteita muuttamalla he saivat

aikaan huomattavia muutoksia polyamiinien määrään. Samankaltainen havainto on tehty myös viiniköynnöksen (*Vitis vinifera* L.) suspensioviljelmästä (Triantaphylidès ym. 1993).

### **Orgaaninen typpi**

Liian suuri määrä aminohappoa kasvatusalustassa tai liuoksessa voi estää solukoiden kasvua. Tupakan (*Nicotiana sylvestris*) suspensioviljelmällä tehdyssä kokeessa kaikki yleiset proteiineissa esiintyvät aminohapot paitsi glutamiini inhiboivat suspension kasvua muutaman millimoolin pitoisuuksina (Bonner ym. 1992). Arginiini oli kaikkein vähiten kasvua inhiboiva aminohappo. Glutamiinin todettiin toimivan tehokkaana antagonistina aminohappoinhibiittoreille.

Orgaaniset typpiyhdisteet voivat kuitenkin sopivina pitoisuuksina stimuloida embryogeenisen kalluksen syntyä. Esim. saksanpihdalla (*Abies alba*) embryogeneesiä on parannettu kaseiinilla ja glutamiinilla (Hristoforoglu ym. 1995). Glutamiini on ollut tehokas myös mustakuusella (*Picea mariana*) (Khlifi ja Tremblay 1995). Simola ja Santanen (1990) havaitsivat, että vähäisen määrän kaseiinihydrolysaattia sisältävä arginiinin ja glutamiinin seos oli suotuisa kuusen (*Picea abies*) kallusviljelmien kasvuille ja proembryoidien muodostumiselle. Orgaaninen typpi paransi embyogeneesiä kuitenkin vain valkoisella megagametofyyttikalluksella, mutta ei klorofyllipitoisella vihreällä kalluksella.

Kasvatusalustaan lisätyillä polyamiineilla on joissakin tapauksissa parannettu solukoiden kasvua ja regeneroitumista esim. kuusella, koivulla, omenapuulla, viiniköynnöksellä ja pähkinäpensaalla (Simola ja Honkanen 1983, James ym. 1988, Valobra ja James 1990, Martin-Tanguy ja Carre 1993, Rey ym. 1994). Polyamiineilla on myös parannettu protoplastien elinkykyä ja jakautumista mm. lepillä (Huhtinen ym. 1982/1983).

### **Ravinteiden ottoa tilanteen mukaan**

Kasville hyväksi todettu ravintoalusta ei välttämättä sovi samalle kasvilajille toisenlaisissa koejärjestelyissä. Ravinnevaatimukset typen suhteen voivat olla esim. iästä riippuvaisia, tulokseen vaikuttaa, otetaanko viljelmän aloituskappale nuoresta tai vanhasta emokasvista tai emokasvin osasta (Minocha 1982). Myös kasvin sisäinen fysiologinen tila ratkaisee miten kasvi reagoi eri ravinteisiin (Durzan 1986, Simola ja Santanen 1990).

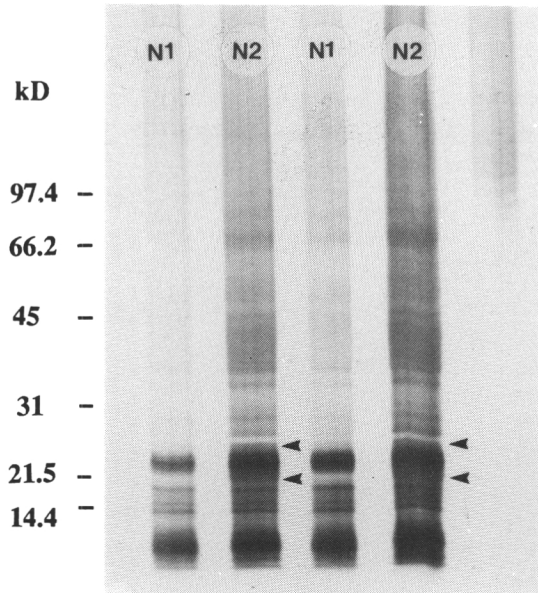
Montereymännöllä (*Pinus radiata*) tehdyissä kokeissa verrattiin typpiaineen vaihduntaa sirkkalehdistä aloitetuilla solukoilla, joista hormonikoostumuksesta riippuen toiset tuottivat versoja ja toiset eivät. Havaittiin, että versoja tuottamattoman solukon typpiaineenvaihdunta poikkeaa tiettyssä kasvatuksen vaiheessa versoja tuottavasta ja muistuttaa kasvien vanhenemisessä ilmenevää typpiaineenvaihduntaa (Joy ym. 1994).

### **Typpiravinteiden vaikutus männyn kallussolukoiden kasvuun ja proteiinisynteesiin**

Männyn (*Pinus sylvestris* L.) silmuista aloitettuihin kallusviljelmiin on alustavasti kokeiltu erilaisia typpiravinteita ja tutkittu niiden vaikutusta kasvuun ja aineenvaihduntaan, erityisesti proteiinisynteesiin. Havaittiin, että muutokset typpi ravinteissa näkyvät helposti solukoiden polypeptidikoostumuksessa geelielektroforeesilla analysoitaessa. Kalluksia, joiden kasvatusalustat (modifioituja MS-alustoja) erosivat typen suhteen siten, että alustassa N1 oli 0.02 M ammoniumnitraattia (nk. N1-kallukset) ja alustassa N2 0.018 M kaliumnitraattia (nk. N2-kallukset), verrattiin keskenään. Alustoihin oli lisätty <sup>35</sup>S-metioniinia, jotta voitiin mitata proteiini synteesiaktiivisuus nestetuikelaskijalla. Tutkimuksessa havaittiin, että vaikka N2-kallusten kasvu oli N1-kallusten kasvua heikompaa, niiden proteiinisynteesi aktiivisuus oli suurempi (Taulukko 1). Liukoisista proteiineista ajetun geelielektroforeesin (SDS-PAGE) mukaan kahden polypeptidin (20 ja 24 kD) pitoisuus lisääntyi N2-kalluksessa (Kuva 1). Myös kallusten vesipitoisuudet poikkesivat toisistaan, mahdollisesti juuri typen suhteen erilaisen ravinne koostumuksen vuoksi (Taulukko 2). Appelsiinilla tehdyssä tutkimuksessa on havaittu nitraatti- ja ammoniumtypen suhteen muutosten selittävän 55 % kallusten tuorepainoissa tapahtuvista muutoksista (Niedz 1994).

*Taulukko 1. Typen suhteen erilaisilla kasvatusalustoilla kasvaneiden männyn kallusten tuorepainot ja proteiinisynteesiaktiivisuudet kolmen viikon kasvatuksen jälkeen.*

Kasvatusalusta	Paino (mg)/kallus, ka	Translaatioaktiivisuus cpm/ tuorepaino g
N1 (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	87.2 (n=16)	5 330
N1	92.3 (n=14)	11 740
N2 (KNO <sub>3</sub> )	63.5 (n=15)	58 830
N2	64.4 (n=14)	79 270



Kuva 1. Männyn kalluksista eristettyjen liukoisten proteiinien polypeptidikoostumukset (SDS-PAGE, hopeavärjäys). Kallusten epäorgaanisena typpiravinteena oli joko ammoniumnitraatti (N1-kallus) tai kaliumnitraatti (N2-kallus). Erot polypeptideissä merkitty nuolilla (24 kD, 20 kD).

Taulukko 2. Silmujen ja niiden kärjistä aloitettujen 6 viikon ikäisten kallusten vesipitoisuudet tammi-maaliskuussa. Kallusten kasvatusalustat erosivat toisistaan tyypin suhteen (N1:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ja N2:  $\text{KNO}_3$ )

	H <sub>2</sub> O-pit. (%) silmu	H <sub>2</sub> O-pit. (%) N1	H <sub>2</sub> O-pit. (%) N2
Tammikuu	38.3 (n=6)	93.7 (n=6)	87.7 (n=6)
Helmikuu	36.5 (n=6)	94.4 (n=6)	87.5 (n=6)
Maaliskuu	45.7 (n=6)	92.4 (n=6)	88.1 (n=6)

Aiemmin julkaistuissa tutkimuksissa männyn kallusten liukoissa proteiineissa on löydetty eroja erityisesti embryogeenisen ja ei-embryogeenisen solukon välillä (Wann ym. -89, David ym. 1995). Wann ym. (1989) havaitsivat eri mäntylajeilla (*Pinus taeda*, *P. strobus*, *P. serotina*) 18-20 kD suuruisen proteiinin tulevan selkeästi näkyviin ei-embryogeenisessä solukossa. Koska N2-kasvatusalustassa ei ollut epäorgaanista ammoniumtyyppiä, jota todennäköisesti tarvitaan ainakin jonkin verran somaattisessa embryogeneesissä (Wetherell ja Dougall 1976), voinee 20 kD

polypeptidi ilmentää paitsi kasvun, myös embryogeneettisen potentiaalin heikkoutta. Kuitenkin myös N1-kalluksessa somaattinen embryogeneesi pysähtyy varhaisessa vaiheessa. Lisätutkimukset typen vaikutuksesta männyn silmuista aloitettuun kallussolukkuun ja sen kehittymiseen ovat meneillään.

## Kirjallisuus

- von Arnold, S. & Erikson, T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot. 59: 870-874.
- Altman, A. & Levin, N. 1993. Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. Physiol. Plant. 89: 653-658.
- Bonner, C.A., Rodrigues, A.M., Miller, J.A. & Jensen, R.A. 1992. Amino acids are general growth inhibitors of *Nicotiana glauca* in tissue culture. Physiol. Plant. 84: 319-328.
- Bornman, C.H. & Vogelmann, T.C. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. Physiol. Plant. 61: 505-512.
- Bozhkov, P.V., Mikhilina, S.B., Shiryayeva, G.A. & Lebedenko, L.A. 1993. Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway spruce [*Picea abies*(L.)Karst] somatic polyembryogenesis: High frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. J. Plant Physiol. 142: 735-741.
- Crévecœur M., Kevers, C., Greppin H. & Gaspar, T. 1987. A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli. Biol. Plant. 29: 1-6.
- Daquin, F. & Letouzé, R. 1986. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. Physiol. Plant. 66:94-98.
- David, A., Laine, E. & David, H. 1995. Somatic embryogenesis in *Pinus caribea*. Ks. Jain, S.M., Gupta, P.K. & Newton, R.J. (toim.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 3, Gymnosperms, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, s. 145-181.
- Debergh, P.C., Harbaoui, Y. & Lemeur, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. 53: 181-187.
- Durzan, D.J. 1986. Ammonia: Its analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis. Ks. Bonga J.M. & Durzan, D.J. (toim.): Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 2, Martinus Nijhoff, Dordrecht, s. 92-136.
- Goodchild, J.A. & Givan, C.V. 1990. Influence of ammonium and extracellular pH on the amino and organic acid contents of suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus*. Physiol. Plant. 78: 29-37.
- Gupta, P.K. & Durzan, D.J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep. 4: 177-179.
- Hristoforoglu, K., Schmidt, J. & Bolhar-Nordenkampf, H. 1995. Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 40: 277-284.
- Huhtinen, O., Honkanen, J. & Simola, L.K. 1982/1983. Ornithine and putrescine-supported divisions in leaf protoplasts of Alders (*Alnus glutinosa* and *A. incana*). Plant Sci. Lett. 28: 3-9.

- James, D.J., Passey, A.J. & Rugini, E. 1988. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 132: 148-154.
- Joy IV, R.W., Bender, L. & Thorpe, T.A. 1994. Nitrogen metabolism in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata* during *de novo* organogenesis. *Physiol. Plant.* 92: 681-688.
- Kaul, K. & Hoffman, S.A. 1993. Ammonium ion inhibition of *Pinus strobus* L. callus growth. *Plant Sci* 88: 169-173.
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gillès, M.F. & Gaspar T. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 61: 69-74.
- Khilifi, S. & Tremblay, F.M. 1995. Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41: 23-32.
- Krogstrup, P. 1986. Embryolike structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Can. J. For. Res.* 16: 664-668.
- Le Dily, F., Billard, J.-P. & Boucaud, J. 1991. Polyamine levels in relation to growth and NaCl concentration in normal and habituated sugarbeet callus cultures. *Plant. Cell. Env.* 14: 327-332.
- , Huault, C., Gaspar, T. & Billard J.-P. 1993. Does altered nitrogen metabolism and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* (L.)? *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35:69-74.
- Lloyd, G. & McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30: 421-427.
- Martin-Tanguy, J. & Carre, M. 1993. Polyamines in grapevine microcuttings cultivated *in vitro*. Effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. *Plant Growth Regul.* 13: 269-280.
- Minocha, S.C. 1982. Role of nitrogen sources in the growth of shoot tips and callus cultures of woody plants *in vitro*. *Colloque International sur la Culture in vitro des Essences Forestieres. IUFRO, Fontainebleau 1981*, pp 307-311.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 479-497.
- Niedz, R.P. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 1-5.
- Nuutila, A.M., Kurtén, U. & Kauppinen, V. 1991. Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roth.) callus cultures: A statistical approach. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 24: 73-77.
- Rey, M., Díaz-Sala, C. & Rodrigue, R. 1994. Exogenous polyamines improve rooting of hazel microshoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36: 303-308.
- Simola, L.K. & Honkanen, J. 1983. Organogenesis and fine structure in megagametophyte callus lines of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 59: 551-561.
- & Santanen, A. 1990. Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megagametophyte and embryo callus lines of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 80: 27-35.
- Triantaphylidès, C., Nespoulos, L. & Cervin, C. 1993. Ammonium requirement for radiation-induced accumulation of polyamines in suspension-cultured grape cells. *Physiol. Plant.* 87: 389-395.
- Valobra, C.P. & James, D.J. 1990. *In vitro* shoot regeneration from leaf discs of *Betula pendula* 'Dalecarlica' EM 85. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 51-54.

- Wann, S.R., Bechwar, M.R., Nagmani, R., Feirer, R.P. & Johnson, M.A. 1989. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic calli of conifers. *Trees* 3: 173-178.
- Wetherell, D.F. & Dougall, D.K. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37: 97-103.

Oksa, E. (toim.) 1995  
 Metsäntutkimus uusissa puissa:  
 monistusta ja molekyyilejä  
 Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Mikrolisätyt männyntaimet - varhaiskypsiä kukkijoita jalostuksen käyttöön**

Hely Häggman  
 Metla, Punkaharjun tutkimusasema

### **Mänty jalostuskohteena**

Mänty on metsänjalostuksen pääpuulaji Suomessa ennenkaikkea taloudellisen merkityksensä ja viljelymäärän perusteella. Männyn jalostusstrategia on perustunut pluspuiden valintaan ja siemenviljelysten perustamiseen ja kehittämiseen. Männyn siemenviljelyksiä on kaikkiaan 3000 ha, joiden sato nykyisellään riittää kattamaan sekä Suomen etelä- että keskiosien siementarpeen (Mikola 1985,1992). Männyn jalostukseen liittyy kuitenkin ongelmia, olipa sitten kyse perinteisestä valintajalostuksesta, risteytyksistä, tai uusiin DNA-merkkeihin perustuvasta jalostuksesta. Ongelmia aiheuttavat mm. männyn perimän suuri koko ja eräänä pahimmista jalostustyön vaikeuttajista pidetään männyn pitkää sukupolvenväliä (Danell 1993). Myös männyn siementuotto esimerkiksi koivuun verrattuna on vähäistä.

### **Männyn kukkiminen**

Männyllä, kuten yleensäkin puilla, on nuoruusvaihe, jolloin ne eivät tavallisesti kuki. Aikuistuvat männyt yksittäisinä puina kasvaessaan alkavat tuottaa emikukintoja 8-20 -vuotiaina (Sarvas 1964) ja mäntyvartteet siemenviljelyksillä vähän aikaisemmin 4-10 -vuotiaina (Bhumibhamon 1978). Siitepölyn tuotto taas alkaa muutamaa vuotta myöhemmin. Vuosirytmiiä ajatellen aikuisissa männnyissä hedekukkien aiheita syntyy läpi kesän ja syksyn mittaan syntyneet kukanalut kasvavat ja erilais-  
 tuvat niin, että talven tullessa ne ovat lähes lopullisen muotoisia pienoiskuk-  
 kien (Kupila-Ahvenniemi 1984). Emikukintojen aiheet puolestaan syntyvät syksyllä ja yksittäisten kukkien aiheet vasta seuraavana keväänä (Kupila-Ahvenniemi 1984).  
 Keinollisesti kukintaan on pyritty vaikuttamaan ja kukinnan määrää lisäämään vai-  
 kuttamalla ympäristö-olosuhteisiin (mm. lannoittamalla ja harventamalla), kaulaa-  
 malla ja lähinnä kasvihormoneista gibberelliinikäsittelyillä (Chalupka 1991).  
 Useimmissa tapauksissa vaikutus on kuitenkin ollut ohimenevää ja edelleenkin

kaivattaisiin menetelmiä, jotka aikaistaisivat kukintaa ja lyhentäisivät sukupolvenväliä.

### **Havupuut solukkoviljelyssä**

Havupuiden solukkoviljelyä kloonatun materiaalin tuottamiseksi on tutkittu 1970-luvulta lähtien aktiivisesti eri puolilla maailmaa. Näiden vuosien aikana useita kasvullisen lisäyksen menetelmiä, kuten pistokaslisäystä, aksillaari- ja adventiivisilmu-monistukseen perustuvaa organogeneesiä ja somaattista embryogeneesiä, on sovellettu useille eri havupuulajeille. Tällä hetkellä on kuitenkin olemassa vain muutama esimerkki solukkoviljelyn avulla tuotettujen havupuutaimien käytöstä kaupallisessa tarkoituksessa ja / tai metsityksessä. Tilanne heijastaneekin yleisesti havupuiden solukkoviljelyyn liittyviä vaikeuksia.

Havupuusuvuista männyt ovat osoittautuneet, radiatamäntyä ehkä lukuunottamatta, vaikeiksi solukkoviljelykohteiksi ja sama pätee myös männyn (*Pinus sylvestris* L.) kohdalla. Vuosien varrella on ilmestynyt muutamia männyn solukkoviljelyyn liittyviä julkaisuja. Organogeneesiin perustuvan solukkoviljelyn lähtömateriaalina näissä kaikissa on käytetty alkioista tai nuorista taimista peräisin olevaa materiaalia (Bornman ja Janson 1980, Mohan Jain ym. 1988, Zel ym. 1988, Chalupa 1989, Supriyanto ja Rohr 1994) ja kaikissa näissä on myös saatu aikaan juurellisia versoja *in vitro*. Somaattisen embryogeneesiin tutkimusta lajilla on myös tehty jonkin verran (Hohtola 1995). Näissä artikkeleissa esitettyjä menetelmiä, ehkä Supriyanton ja Rohrin menetelmää lukuunottamatta, voidaan toistaiseksi soveltaa lähinnä pienimittakaavaisen tutkimuskäyttöön.

### **Mäntyä solukkoviljellään Punkaharjulla**

Metsäntutkimuslaitoksen Punkaharjun tutkimusasemalla monistetaan mäntyä organogeneesiin perustuvalla menetelmällä. Tutkimuksen tarkoituksena on ollut kehittää männylle solukkoviljelymenetelmä, jota voitaisiin käyttää sekä geneettisissä tutkimuksissa että metsäpuiden jalostuksessa.

Lähtömateriaalina tutkimuksissa käytettiin siemenviljelykseltä kerätyistä, idäteytyistä vapaapölytyssiemenistä eristettyjä sirkkalehtiä. Siemenet steriloidtiin 2 %:ssa kalsiumhypokloriitissa 20 min, minkä jälkeen ne huuhdeltiin steriilillä tislattulla vedellä. Pintasteriloidut siemenet idätettiin petrimaljoilla 1%:lla vetyperoksidilla kostutettujen suodatinpaperien päällä jatkuvassa valossa, + 26 °C:ssa. Itämisen jälkeen siemenkuoret poistettiin ja megagametofyyttien suojaamat alkiot steriloidtiin

uudelleen 1%:lla kalsiumhypokloriitilla 8 minuuttia, minkä jälkeen ne huuhdeltiin steriilillä tislatulla vedellä. Tämän jälkeen alkiot preparoitiin esiin megagametofyyteistä ja sirkkalehdet (5-7 kpl / alkio) leikattiin irti ja levitettiin solukkoviljelyalustalle.

Solukkoviljelyalustana käytettiin ½GD-alustaa (Gresshoff ja Doy 1972), joka alustavissa alustatesteissa osoittautui tuottavimmaksi. Adventiivisilmujen ja edelleen versojen indusoimiseksi alustaan lisättiin kahden viikon ajaksi 0.05 µM NAA (naftaleenietikkahappo) ja 5µM BAP (6-benzyliaminopuriini). Versojen muodostumiseen ja erilaistumiseen käytettiin kasvihormonittomia alustoja. Juurien indusointiin käytettiin 2.7 µM NAA:ta viikon kerrallaan, tarpeen mukaan toistettuna. Juurten muodostuminen ja erilaistuminen tapahtui kasvihormonittomilla alustoilla.

Männyn solukkoviljelyn onnistuminen oli genotyypistä riippuvaista. Keskimäärin versoja syntyi eri kokeissa kolmesta viiteentoista kutakin alkiota kohti. Suurin yksittäisen alkioiden sirkkalehtien tuottama versomäärä oli 35. Solukkoviljelyn kannalta optimaalisin siementen idätysaika ennen sirkkalehtien irroitusta oli 4 vrk. Juuritus osoittautui menetelmän vaikeimmaksi osaksi ja genotyypistä riippuen juurtumisprosentti vaihteli nolasta sataan. Useissa tapauksissa tuotetut versot muodostivat päätesilmun jo varhaisessa vaiheessa. Juuritusvaikeudet ja päätesilmumuodostus kuvastanevatkin muodostuneiden versojen aikaista vanhenemista jo *in vitro* oloissa.

### **Miten sirkkalehtien poisto vaikuttaa alkion kehitykseen ?**

Eräissä koesarjassa tutkittiin mahdollisuutta kasvattaa alkuperäistä genotyyppiä, alkiota, sen jälkeen kun puolet sen sirkkalehdistä oli poistettu. Tällaiset alkiot laitettiin kasvamaan kasvihormonittomalle ½GD -agar-alustalle. Siemenen itämis-kykyä testattiin pintasteriloimalla siemenet ensin ja idättämällä ne sen jälkeen em. solukkoviljelyalustalla. Kontrollikäsittelyt olivat seuraavat: 1) idätetyt siemenet steriloitiin uudelleen 1%:lla kalsiumhypokloriitilla ennen solukkoviljelyalustalle laittoa, 2) siemenkuorten poiston jälkeen megagametofyyttien ympäröivät alkiot pintasteriloitiin 1%:lla kalsiumhypokloriitilla ennen viljelyalustalle laittoa. Alkioiden elävyyttä, kokoa ja kasvatapaa seurattiin kahden viikon ajan *in vitro* oloissa, jonka jälkeen ne siirrettiin kasvihuoneelle neljäksi kuukaudeksi.

Taulukko 1: Männyn alkiokasvatustuloksia sen jälkeen kun osa sirkkalehdistä on irrotettu solukkoviljelyä varten

Koemateriaali	Taimien kehitys <i>in vitro</i> , %				Taimien kehitys kasvihuoneella, %	
	Normaali	Epä- normaali	Hidas itäminen	Kuollut	2 viikkoa	4 kuukautta
Pelastetut alkiot	39	61	0	0	50	50
Kontrollit:						
Siemenet	88	0	6	6	ei määritetty	
Itäneet siemenet	33	28	14	25	56	52
Siemenkuorettomat itäneet siemenet	27	45	8	20	46	36

Kokeessa havaittiin (taulukko 1), että puolet alkiosta kesti sekä pintasteriloinnin että megagametofyytin ja osittaisen sirkkalehtien poiston ja jatkoi kasvuaan kasvihuoneella vielä neljän kuukauden kuluttua kokeen aloituksesta. Pintasterilointi vähensi elävien taimien määrää kontrollikäsittelyissä (käsittely 1) kun vertailukohteena käytettiin siemenereää. Taimien kuolleisuus lisääntyi vielä enemmän kun siemenkuoret poistettiin ennen pintasterilointia (käsittely 2). Pelastetuista alkiosta kasvaneet taimet olivat pienempiä kuin normaalisti siemenestä kasvaneet taimet johtuen todennäköisesti megagametofyytin poistoa seuranneesta ravinteiden puutteesta. Alkiolla samoin kuin kontrollikäsittelyjen taimilla havaittiin myös plagiotrooppista kasvua, mikä taas mahdollisesti oli seurausta pintasteriloinnin aiheuttamista juurivaurioista. Jatkossa tällaiset pintasteriloinnista johtuvat kasvutapaongelmat pystyttäneen välttämään idättämällä siemenet aseptisesti.

### Solukkotaimien kehitys kasvihuoneella

Juurtuneet solukkotaimet sopeutettiin *in vitro* kasvatuksen jälkeen kasvihuone-oloihin. Ne istutettiin joko kasvuturve - multa - perliitti (1:1:1) -seokseen tai kasvuturve - perliitti (1:1) -seokseen. Ensimmäisten kahden viikon ajan kasvihuoneella taimia sumutettiin ja kasteltiin päivittäin ½GD-liuoksella. Kasvukaudella taimia lannoitettiin kaksi kertaa kuukaudessa kaupallisilla 0.2 % 9- ja 5-Superex lannoitteilla (Kekkilä). Kasvukausien välillä taimet pidettiin noin kuuden kuukauden ajan kylmässä + 1-6°C:ssa. Taimien pituuskasvua, kasvutapaa ja kukintaa havainnoitiin useiden kasvukausien ajan ja hedekukallisista silmuista kerättiin siitepölyä, jonka itävyys

määritettiin *in vitro* menetelmällä, joka perustui Brewbaker'in ja Kwack'in (1963) sekä Muren'in työvereineen (1979) kehittämiin menetelmiin.

Kasvihuoneelle siirrettyinä mikrolisätyt taimet olivat kasvutavaltaan enemmän tai vähemmän plagiotrooppisia ja haaroittuneita, ja taimen kasvutapa pysyi muuttumattomana koko seurantajakson (neljä vuotta) ajan. Tällaisesta adventiivisilmuista syntyneiden havupuun taimien varhaisesta vanhenemisesta ovat raportoineet aikaisemmin myös Pierik (1990), Monteuis ja Dumas (1992) sekä Frampton ja Foster (1993). Lähtömateriaalin ja solukkoviljelymenetelmän lisäksi vanhenemiseen saattavat vaikuttaa myös tietyt stressitekijät. Taimien juurisysteemien vajavainen kehitys saattaa aiheuttaa puutetta veden ja ravinteiden otossa tai juurissa syntetisoitavissa kasvihormoneissa (McKeand ja Allen 1984, Timmis ym. 1992).

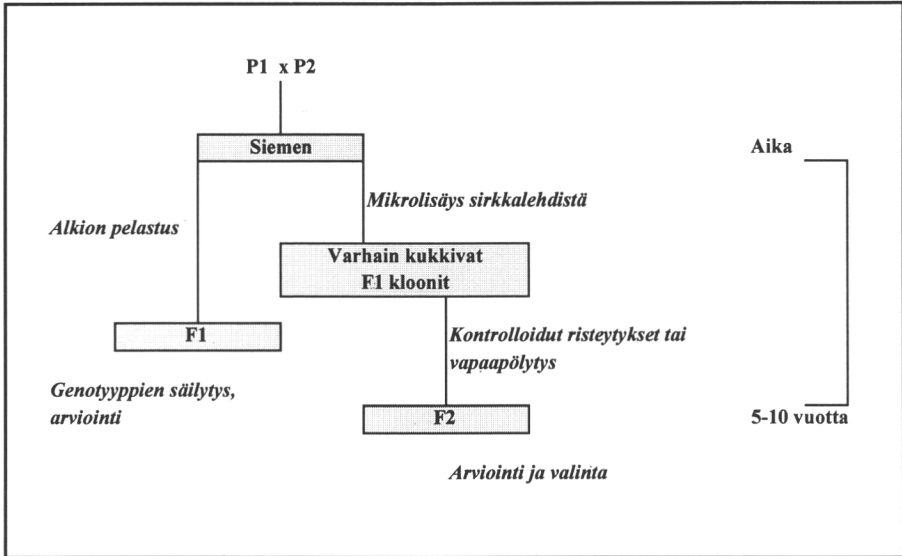
### Varhaiskypsiä kukkijoita jalostuksen käyttöön



Kuva 1. Emikukintoja männyn 3-vuotiaassa solukkotaimessa (vasemmalla) ja hedekukintoja 4-vuotiaassa solukkotaimessa (oikealla).

Osa taimista alkoi tuottaa emikukintoja (Kuva 1) 3-vuotiaina ja vuotta myöhemmin emikukintoja tuottavien taimien määrä oli jo kaksinkertaistunut. Näiden taimien pitkäaikaista siementuottokykyä on tässä vaiheessa vielä kuitenkin vaikea ennustaa.

Ensimmäiset hedekukinnot (Kuva 1) havaittiin tänä kesänä 4-vuotiaissa taimissa. Kukista kerättiin siitepöly, jonka itävyys *in vitro* oli 67 %. Luonnosta kerättyihin männyn siitepölyjen itävyyksiin verrattuna luku on keskitasoa.



Kuva 2. Hypoteesi kehitetyn mikrolisäysmenetelmän merkityksestä männyn jalostusohjelmille.

Tällaiset varhain kukkivat kloonit antavat mahdollisuuden jälkeläistestaukseen perustuvien jalostusohjelmien nopeuttamiseen (Kuva 2). Erityisesti tutkimuksessa havaittu elävän siitepölyn tuotto avaa ovia kontrolloiduille risteytyksille. Parhaassa tapauksessa kehitetyn menetelmän avulla voidaan tutkia vanhempia ja jälkeläisiä, joiden ikäeroa on vain muutama vuosi.

## Kirjallisuus

- Bhumibhamon, S. 1978. Studies on Scots pine seed orchards in Finland with special emphasis on the genetic composition of the seed. *Commun. Inst. For. Fenn.* 94:1-118.
- Bornman, C.H. & Jansson, E. 1980. Organogenesis in cultured *Pinus sylvestris* tissue. *Z. Pflanzenphysiol.* 96:1-6.

- Brewbaker, J. L. & Kwack, B. H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50: 859-865.
- Chalupa, V. 1989. Micropropagation of *Larix decidua* Mill. and *Pinus sylvestris* L. *Biol. Plant.* 31:400-407.
- Chalupka, W. 1991. Regulation of flowering in seed orchards. Ks. Giertych M, Mátyás C (eds) *Genetics of Scots pine*. Akadémiai Kiadó, Budapest, s. 173-182.
- Danell, Ö. 1993. Tree breeding strategy: Are we too concerned conservationists but inefficient breeders ? Ks. Lee, S.J. (toim.) *Progeny Testing and Breeding Strategies*. Proceedings of the Nordic Group for Tree Breeding, Edinburgh, Scotland. 6-10 October 1993, s. 80-94.
- Frampton, L.J. & Foster, S. 1993. Field performance of vegetative propagules. Ks. Ahuja, M. R. & Libby, V. J. (toim.) *Clonal Forestry: Genetics, Biotechnology and Application*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, s. 110-134.
- Gresshoff, P.M. & Doy, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* L. (tomato). *Planta* 107:161-170.
- Hohtola, A. 1995. Somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Ks. Mohan Jain, S., Gupta, P.K. & Newton, R.J. (toim.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, London, Vol 3: 269-285.
- Kupila-Ahvenniemi, S. 1984. Männyn kukkiminen. *Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja* 158:22-36.
- McKeand, S. E. & Allen, H. 1984. Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. *Physiol. Plant.* 61:523-528.
- Mikola, J. 1985. Mänty, kuusi ja koivu jalostuksen kohteina. *Metsäviesti* 5-6:osa5.
- 1992. Forest tree breeding in Finland. *Paper and Timber* 74:83-89.
- Mohan Jain, S., Newton, R.J. & Soltes, E.J. 1988. Induction of adventitious buds and plantlet regeneration in *Pinus sylvestris* L. *Curr. Sci.* 57:677-679.
- Monteuuis, O. & Dumas, E. 1992. Morphological features as indicators of maturity in acclimated *Pinus pinaster* from different *in vitro* origins. *Can. J. For. Res.* 22:1417-1421.
- Muren, R.C., Ching, T. M. & Ching, K. K. 1979. Metabolic study of Douglas-fir pollen germination *in vitro*. *Physiol. Plant.* 46:287-292.
- Pierik, R. L. M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. Ks. Nijkamp, H.J.J., van der Plas, L. H. W. & van Aartrijk, J. (toim.) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, s. 91-101.
- Sarvas, R. 1964. Havupuut. WSOY, Porvoo Helsinki, s. 1-518.
- Supriyanto & Rohr, R. 1994. *In vitro* regeneration of plantlets of Scots pine (*Pinus sylvestris*) with mycorrhizal roots from subcultured callus initiated from needle adventitious buds. *Can. J. Bot.* 72:1144-1150.
- Timmis, R., Ritchie, G. A. & Pullman, G.S. 1992. Age- and position-of-origin and rootstock effects in Douglas-fir plantlet growth and plagiotropism. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 29:179-186.
- Zel, J., Gogala, N. & Camloch, M. 1988. Micropropagation of *Pinus sylvestris*. *Plant Cell Tissue Org Cult.* 14:169-175.



Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyliä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## DNA merkit tutkimuksessa ja jalostuksessa

Päivi Hurme, Auli Karhu ja Outi Savolainen,  
Oulun yliopisto, Biologian laitos

### Johdanto

Geneettiset merkit ovat tärkeitä apuneuvoja metsäpuiden jalostuksessa ja tutkimuksessa. Niitä tarvitaan sekä jalostuksen perusteiden geneettisessä tutkimuksessa että rutiininomaisissa geneettisen materiaalin tunnistustehtävissä. Aikaisemmin geneettisinä merkkeinä on käytetty erilaisia harvinaisia morfologisia ominaisuuksia, valkuaisaineita sekä erilaisia muita yhdisteitä. Näin saatavien merkkien lukumäärä on kuitenkin rajallinen. Entsyymigenejä on käytetty runsaasti koska niiden tutkiminen on edullista, nopeaa ja teknisesti helppoa. Käytetyt entsyymigeenit edustavat kuitenkin vain pientä osaa valkuaisaineista. Lisäksi niiden avulla saadaan vain välillistä tietoa DNA-tason muuntelusta, koska osa muuntelusta jää havaitsematta. Viime vuosina on kehitetty runsaasti erilaisia DNA-pohjaisia merkkejä, jotka ovat monissa suhteissa entsyymimerkkejä parempia (Wagner, 1992).

### DNA-merkkien etuja

DNA-merkkien etuna on niiden lähes rajaton saatavuus, sekä merkkien tasainen jakautuminen genomiin. Lisäksi DNA-merkkien antama informaatio perustuu suoraan nukleotidisekvensseihin eli DNA:n emäsjärjestykseen. Näin ollen DNA-merkit eivät muuntele eri kudosten, solukoiden tai kehitystasojen välillä. Myöskään ympäristön muuntelu ei vaikuta DNA-merkkeihin. DNA-merkkien etuna on myös niiden runsas muuntelu. Esimerkiksi lajeilla, joilla entsyymigeenimuuntelu on vähäistä tai joista pystytään tutkimaan vain muutama geeni, DNA-merkit tarjoavat ratkaisun. Muuntelu tarjoaa mahdollisuuden tutkia yksilöiden välisiä eroja. Lisäksi muuntelevia merkkejä voidaan käyttää esimerkiksi geenikartoituksessa. DNA-merkkien tutkiminen ei myöskään vaadi suuria DNA-määriä. Yleensä eri menetelmissä tarvitaan DNA:ta alle gramman miljoonasosa.

Useimpien DNA-merkkien tuottaminen perustuu PCR-reaktioon (polymerase chain reaction), mikä mahdollistaa suurten näytemäärien käsittelyn.

### **DNA-merkkien luokittelu**

DNA-merkit voidaan jakaa mendelistisesti ja ei-mendelistisesti periytyviin merkkeihin. Mendelistisesti periytyviin kuuluvat kaikki tuman DNA-merkit, kun taas ei-mendelistisiä ovat solun organellien DNA-merkit.

DNA:n muuntelua voidaan tutkia eri menetelmin. RFLP-menetelmässä DNA:ta pilkotaan valituilla restriktioentsyymeillä. Pilkotuissa DNA-jaksoissa voidaan havaita yksilöiden välillä pituusmuuntelua, joka perustuu restriktiopaikkojen syntyyn tai häviämiseen DNA-juosteessa. Tällaisia muutoksia DNA-juosteeseen aiheuttavat insertiot, deleetiot ja nukleotidimuutokset. Toinen tapa tutkia DNA-tason muuntelua perustuu PCR-menetelmään.

### **PCR-reaktioon perustuvat merkit**

PCR-reaktion avulla voidaan monistaa tiettyjä DNA-alueita spesifisillä, tunnettuihin sekvensseihin perustuvilla alukkeilla (Saiki ym., 1985). RAPD- (random amplified polymorphic DNA) menetelmässä puolestaan monistetaan DNA:ta umpimähkäisesti sattumanvaraisilla lyhyillä alukkeilla (Williams ym., 1990). Syntyvät DNA-jaksot erotellaan toisistaan geelillä. Merkkigeenilokukset voidaan myös kartoittaa toistensa suhteen. RAPD-merkit ovat dominantteja, jolloin heterotsygoottia ei voi erottaa dominoivasta homotsygootista. Tämä rajoittaa niiden käyttöä.

Mendelistisesti periytyviä mikrosatelliittimerkkejä monistetaan käyttämällä sekvenssispesifisiä alukkeita. Mikrosatelliitit koostuvat lyhyistä (< 6 nukleotidia) toistojaksoista, joiden yhteispituus on yleensä alle 100 nukleotidia. Mikrosatelliittimerkkien runsas pituusmuuntelu perustuu niiden suhteellisen korkeaan mutaatiotaajuuteen ( $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ / sukupolvi). Yleensä mutaatiot aiheuttavat yhden tai useamman toistojakson lisäyksen tai poistumisen DNA-juosteessa (Litt & Luty, 1989).

## DNA-merkkien käyttö

### Genomin rakenne

DNA-merkkien avulla saadaan tietoa genomin rakenteesta. RFLP-kuvioiden perusteella voidaan arvioida tutkittavan geenialueen kopioiden lukumäärä genomissa. Merkkien avulla voidaan myös verrata eri lajien geenijärjestystä. Esimerkiksi entsyymigeenien kytcentöjen on havaittu olevan samankaltaisia mäntylajien välillä (Conkle, 1979). Myös lähilajien RFLP-kartat ovat keskenään hyvin samankaltaisia. Tämä on havaittu esimerkiksi maissin ja riisin RFLP-karttoja vertailtaessa (Ahn ja Tanksley, 1991). Osittaisen merkkikartan avulla voidaan myös arvioida genomin kokoa (Chakravarti ym., 1991). Tämän perusteella voidaan arvioida kuinka monta merkkiä tarvitaan koko genomin kattavan merkkikartan luomiseksi.

### Populaatiogeneettiset tutkimukset

DNA-merkit sopivat hyvin myös populaatioiden sisäisen ja välisen muuntelun tutkimiseen. RFLP- ja mikrosatelliittimerkit sopivat hyvin tähän tarkoitukseen (Karhu ym., valmisteilla). RAPD-merkkejä tulee käyttää varovaisemmin, sillä samoilta vaikuttavat lokukset yksilöiden välillä eivät välttämättä edusta samaa RAPD-lokusta. Populaatioiden välistä RAPD-muuntelua on kuitenkin tutkittu määnyistä *Pinus attenuata*- (Wu ym., 1995) ja *Pinus resinosa*- (Mosser ym., 1992) lajeissa. DNA-merkkien avulla voidaan tutkia myös populaatiorakenteeseen vaikuttavia tekijöitä, kuten lisääntymisjärjestelmiä, suku- ja itsesiitoksen määrää sekä taustapölytyksen osuutta siemenviljelyksillä.

### Tunnistusominaisuudet

DNA-merkit voivat toimia myös tunnusominaisuuksina tunnistettaessa klooneja ja risteytyksiä. Entsyymigeenit, RFLP- ja mikrosatelliittimerkit ovat näihin tarkoituksiin RAPD-merkkejä käyttökelpoisempia. Usein jo entsyymimerkkien tutkiminen riittää tunnistukseen. Klooniin tunnistukseen sopivat mendelistisesti periytyvien tuman DNA-merkkien lisäksi myös solun organellien DNA:sta saatavat emendelistiset merkit.

### Kvantitatiivisten ominaisuuksien geneettinen tausta

Yksi DNA-merkkien käyttötarkoituksesta on kvantitatiivisten ominaisuuksiin vaikuttavien geenien (quantitative trait loci, QTLs) kartoittaminen. Tiheiden merkki-

geenikarttojen avulla voidaan tutkia ominaisuuden ja merkkien välistä kytkeytymistä. Kasveilla on aloitettu kvantitatiivisten ominaisuuksien kartoitus. RFLP-pohjaista karttaa käytettiin kasveilla ensimmäisenä tomaatin hedelmän painoon ja happamuuteen vaikuttavien geenien kartoittamiseen (Paterson ym., 1988). Havupuilla loblolly-männyn (*Pinus taeda*) puun tiheyteen vaikuttavien geenien kytkeytymistä RFLP-merkkeihin on tutkittu (Groover ym., 1994).

Kvantitatiivisen ominaisuuden kartoittamisen jälkeen voidaan ominaisuuteen kohdistaa valintaa merkkigeenien välityksellä, tietyissä rajoitetuissa tapauksissa. Tällainen merkkigeeniavusteinen valinta (marker-aided selection eli MAS) voi mahdollistaa ominaisuuksien nopeamman ja tehokkaamman jalostamisen. Esimerkiksi männyn elinkierto on pitkä ja useat ominaisuudet tulevat esiin vasta myöhäisessä vaiheessa. Merkkigeeniavusteisen valinnan avulla ominaisuuden valinta voisi tapahtua jo taimivaiheessa. Mahdollisuuksia havupuiden merkkigeeniavusteiseen valintaan on alustavasti tutkittu (Williams ja Neale, 1992; Bradshaw ja Foster, 1992).

Nykyisin merkkigeenien avulla voidaan ominaisuuteen vaikuttava geenialue eristää chromosome landing-menetelmän avulla (Tanksley ym., 1995). Siinä merkkigeeniä käytetään koettimena geenin eristämiseksi ns. kloonikirjastosta. Menetelmä mahdollistaa geenin eristämisen myös lajeilla, joilla on suhteellisen suuri genomi. Tästä huolimatta geenien eristäminen paikan perusteella esimerkiksi suuren genomien omaavasta männystä ei ole toistaiseksi mahdollista.

Merkkigeenien käyttö on tehostunut huomasti alkuajoista. Nyt käyttöä rajoittaa lähinnä mielikuvituksen puute.

## Kirjallisuus

- Ahn, S. & Tanksley, S. D. 1993. Comparative linkage genetic maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7980-7984.
- Bradshaw, Jr., H. D. & Foster, G. S. 1992. Marker-aided selection and propagation systems in trees: advantages of cloning for studying quantitative. *Can. J. For. Res.* 22: 1044-1049.
- Chakravarti, A., Lasher, L. K. & Reefer, J. E. 1991. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128: 175-182.
- Conkle, M.T. 1979. Isozyme variation and linkage in six conifer species. *Abstr. Symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. Berkeley* 27. heinäkuuta 1979, s. 11-17.
- Groover, A., Devey, M., Fiddler, T., Lee, J., Megraw, R., Mitchel-Olds, T., Sherman, B., Vujcic, S., Williams, C. & Neale, D. 1994. Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine. *Genetics* 138: 1293-1300.

- Karhu, A., Hurme, P., Karjalainen, M., Karvonen, P., Kärkkäinen, K., Neale, D. & Savolainen O. 1995. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? Käsikirjoitus.
- Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- Mosseler, A., Egger, K. N. & Hughes, K. A.. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can. J. For. Res.* 22: 1332-1337.
- Paterson, A. H., Lander, E. S., Hewitt, J. D., Peterson, S., Lincoln, S. E. & Tanksley, S. D. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map. *Nature* 335: 721-726.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullins, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W. & Martin, G. B. 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *TIG* 11: 63-68.
- Wagner, D. B. 1992. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forest* 6:373-390.
- Williams, C. G. & Neale, D. B. 1992. Conifer wood quality and marker-aided selection: a case study. *Can. J. For. Res.* 22: 1009-1017.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.
- Wu, J., Wagner, R. S., Krutovskii, K. V. & Strauss, S. H. 1995. Strong differentiation of RAPD markers among populations of knobcone pine (*Pinus attenuata*). *Forest. Genet.* (submitted).



Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyilejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Isoentsyymien käyttö perinnöllisinä merkkiominaisuuksina**

Anni Harju

Metla, Kolarin tutkimusasema

### **Tausta**

Perimältään erilaisten yksilöiden tunnistamiseksi tarvitaan merkkiominaisuuksia. Perinnöllisen merkkiominaisuuden vaatimuksena on, että tutkittavan lokuksen alleelit pystytään tunnistamaan ja erottamaan muista saman lokuksen tai eri lokusten alleeleista (ks. esim. Brown ja Moran 1981). Lisäksi tutkittavien lokusten on oltava satunnainen otos perimästä. Merkkiominaisuutena voidaan käyttää yhtä lokusta, jossa on harvinainen alleeli, tai usean lokuksen alleelien yhdistelmää (multilokusmarkkerit).

Isoentsyymien käyttö perinnöllisinä merkkiominaisuuksina perustuu elektroforeettisiin menetelmin havaittuun runsaaseen perinnölliseen muunteluun. Evoluutiobiologeille yllätyksenä tullut muuntelu löytyi yhtä aikaa ihmisestä ja banaanikärpäsestä vuonna 1966 (ks. Stebbins 1989, Weeden ja Wendel 1989). Pian muuntelun löytymisen jälkeen uudet merkkiominaisuudet otettiin käyttöön myös kasvien geneettisissä tutkimuksissa (Allard 1989). Aikaisemmin kasveilla käytössä olleista morfologisista yhden lokuksen merkeistä (esim. klorofyllimutantit) ja sekundäärimetabolian tuotteista (esim. fenolit ja terpeenit) poiketen isoentsyymejä pidettiin primäärisinä geenituotteina.

### **Isoentsyymimuuntelun tutkiminen**

Isoentsyymit ovat saman entsyymin eri muotoja, joita koodaavat eri lokukset. Saman lokuksen eri alleelien tuotteita sanotaan allotsyymeiksi. Yleisin menetelmä isoentsyymimuuntelun tutkimisessa on tärkkelysgeielektroforeesi. Menetelmään liittyviä ohjeita on runsaasti, osa tietyille lajeille tarkoitettuja, osa yleisempiä (esim. Saura ja Lankinen 1974, Conkle ym. 1982, Cheliak ja Pitel 1984, Wendel ja Weeden 1989, Kephart 1990). Esittelen lyhyesti työn eri vaiheet. Tarkemmat yksityiskohdat selviävät edellä mainituista julkaisuista.

Harkitun näytteenottosuunnitelman mukaiset kasvinäytteet preparoidaan ja jauheetaan uuttopuskurissa. Jauhetut näytteet imeytetään suodatinpaperiliuskoihin, jotka asetetaan tärkkelyksestä valmistettuihin geeleihin tehtyihin viiltoihin. Geelit asetetaan ajokammioihin ja entsyymien annetaan kulkeutua sähkökentässä useiden tuntien ajan. Entsyymien kulkeutumiseen geelillä vaikuttavat sekä entsyymin sähköinen varaus että molekyylikoko. Ajon jälkeen geelit leikataan vaakatasossa useaksi siivuksi ja kukin siivu asetetaan tietyn entsyymin värjäävään liuokseen. Sopi- van ajan kuluttua värjäysreaktio pysäytetään ja geelit ovat valmiita tarkasteltaviksi. Tulokset kirjataan, geelit valokuvataan ja tulokset tallennetaan tietokoneelle. Vasta tämän jälkeen tehdään varsinainen työ, johon merkki-ominaisuuksia tarvitaan.

### Menetelmän hyvät puolet

1. Suuressa osassa isoentsyymilokuksia on useampi kuin yksi alleeli. Tämä polymorfismi on yksi merkkiominaisuutena käytön perusedellytyksistä.
2. Kodominantin ilmenemisen ansiosta homotsygoottien lisäksi tunnistetaan myös heterotsygootit.
3. Yleensä periytyminen lokuksissa on mendelististä.
4. Samasta näytteestä voidaan useassa puskurisysteemissä ajamisen ja geelien siivutuksen ansiosta värjätä lukuisia entsyymejä, ääritapauksissa jopa yli 20. Koska samaa entsyymiä saattaa koodata usea lokus, saadaan merkeiksi mahdollisesti yli neljäkymmentä isoentsyymilokusta. Männyllä saa kolmella puskurisysteemillä käyttöön 18 lokusta, joista tosin osa on muuntelemattomia.
5. Suurinta osaa isoentsyymeistä pidetään valinnan suhteen neutraaleina.
6. Ympäristön tiedetään vaikuttavan vain harvojen entsyymien ilmiasuun.
7. Todisteet viittaavat siihen, että lokukset ovat sironneet laajalle genomiin (Weeden ja Wendel 1989). Tämä on etu, sillä lokusten välisen kytkennän puuttuminen tai heikkous on monien analyysien perusedellytys.
8. Tärkkelysgeelielektroforesimenetelmä on helppo ja halpa verrattuna esimerkiksi polyakryyliamidigeelielektroforeesiin (PAGE).
9. Ainakin männyllä geelien lukeminen on melko helppoa ja joutuisaa.
10. Pienikin näyte riittää ja seuraava sukupolvi voidaan tutkia siemenistä. Koko kasvia ei tarvitse tuhota (siemenet kyllä tuhoutuvat!).
11. Tutkittuja lajeja ja solukkoja on runsaasti. Menetelmää on kasveilla kehitelty soveltuvaksi siemenkasveille, paljassiemenisille, sanikkaisille, sienille ja sammalille. Usein käytettyjä solukkoja ovat siementen vararavintolosukko ja alkio, silmut, lehdet ja joskus neulaset, kuori ja juuret. Tietoa eri lajeista on kertynyt runsaasti, mikä helpottaa menetelmän opettelua ja omien tulosten arviointia. (Brown ja Moran 1981, Brown ym. 1989, Hattermer 1991, Forrest 1994).

## Menetelmän huonot puolet

1. Isoentsyymit ovat pääasiassa primäärimetabolian tuotteita ja ne ovat hyvin pieni, ehkä harhainenkin, otos eliöiden valkuaisaineista ja koko genomista.
2. Vain osa DNA-muutoksista (noin 30 %) näkyy isoentsyymien kulkeutumiserona sähkökentässä, joten eri genotyypit voivat tuottaa samanlaisen ilmiön. Toisin sanoen tärkkelysgeelelektroforeesi on karkea menetelmä.
3. Entsyymien rakenne voi muuttua translaation jälkeen perinnöllisistä tai ympäristön aiheuttamista syistä. Myös näytteen käsittelyn ja elektroforeesijon aikana voi tapahtua muutoksia entsyymien rakenteessa.
4. Havaittu isoentsyymimuuntelu on riippuvainen menetelmästä ja esimerkiksi käytetyistä puskureista. PAGE:n tiedetään paljastavan tärkkelysgeelelektroforeesia enemmän muuntelua.
5. Isoentsyymikoostumus voi vaihdella kasvin eri solukoissa, eri kehitysvaiheissa ja erilaisissa kasvuolosuhteissa.
6. Geelien lukeminen saattaa olla hankalaa, sillä lokusten tuotteet voivat mennä geelillä päällekkäin. Erityisen hankalia ovat polyploidien lajien geelit. Oman hankaluutensa tuovat joidenkin entsyymien nolla-alleelit, jotka tunnistetaan (siis eivät näy!) vain haploidissa tai homotsygootissa solukossa yksiselitteisesti. Nolla-alleelit tulkitaan täydellisen resessiivisiksi.
7. Osa väriaineista on myrkyllisiä tai haitallisia. Työskentely vaatii vetokaapin ja oikean suojautumisen.
8. Kuolleesta materiaalista ei voi tutkia isoentsyymejä, mikä rajoittaa käyttömahdollisuuksia (Savolainen, suull.).

(Brown ja Moran 1981, El-Kassaby 1991, Hattemer 1991, Forrest 1994).

## Sovellukset

Isoentsyymeillä on tärkeä merkitys tutkittaessa nimenomaan eliön koko perimään, kaikkiin lokuksiin samalla tavalla vaikuttavia tekijöitä. Erityisesti tutkittaessa kasvien lisääntymisjärjestelmiä isoentsyymit ovat olleet uraauurtavan tärkeitä.

Ennen kuin isoentsyymimerkit otetaan käyttöön, on niiden periytyminen ja kytkeäsuhteet selvitettävä useimmiten risteytysten avulla. On tiedettävä, miten edustava otos kytkeäryhmistä valitut isoentsyymit ovat.

Tärkeimpiä menetelmän sovelluksia ovat (Forrest 1994, Wheeler ja Jech 1992):

- populaatioiden muuntelun vertaaminen: sama laji, eri lajit, maantieteellinen muuntelu
- lisääntymisjärjestelmätutkimukset (luonnonpopulaatiot, siemenviljelykset): ristisiitos, geenivirta
- introgressio, risteytyminen
- kloonien, lajien, hybridien ja siemenerien tunnistaminen
- siitepölykilpailun tutkiminen
- lisääpölytyksen onnistumisen testaaminen siemenviljelyksillä
- geenivarojen suojele

### **Havupuut esimerkkitapauksena**

#### 1. Periytyminen ja kytkentä

Havupuilla siemenen vararavintosolukkona toimiva megagametofyytti on haploidi ja sillä on sama genotyyppi kuin munasolulla. Kun samasta puusta tutkitaan useita megagametofyyttejä, saadaan selville emopuun genotyyppi, alleelien periytyminen ja lokusten välinen kytkentä ilman risteytyksiä. On todettu, että vahvat lokusten väliset kytkennät ovat harvinaisia (Conkle 1981, Szmidt ja Muona 1989), joten myöskään kytkentää taloudellisesti tärkeisiin lokuksiin ei ole syytä odottaa. Lokusten välinen kytkentäepätasapaino aiheuttaisi harhaa alleelifrekvenssi- ja heterotsygotia-arvioihin populaatiotutkimuksissa (Forrest 1994). Nolla-alleelin lukematta jääminen heterotsygooteissa aiheuttaa heterotsygoottien vajuksen.

#### 2. Populaatorakenne

Kun isoentsyymien periytyminen ja kytkentä tunnetaan, yksilön genotyyppi voidaan määrittää vegetatiivisesta solukosta (esim. silmut) yhdenkin näytteen perusteella. Tämä mahdollistaa populaatioiden muuntelun tehokkaan tutkimisen. Populaatioiden tutkiminen on mahdollista, vaikka yksilöt eivät tuottaisi lainkaan siemeniä tai jos siemenet ovat huonolaatuisia.

Populaatiosta voidaan selvittää polymorfisten eli muuntelevien lokusten osuus kaikista lokuksista ( $P$ ), alleelien määrä lokusta kohti ( $A$ ) sekä havaittu heterotsygoottien määrä keskimäärin kaikissa lokuksissa ( $H_0$ ). Alleelifrekvenssien perusteella voidaan arvioida odotettu heterotsygotia-aste ( $H_e = 1 - \sum p_i^2$ , missä  $p_i$  on  $i$ :n alleelifrekvenssi), jota voidaan puolestaan verrata havaittuun heterotsygotia-asteeseen.

seen. Yleensä muuntelun mittana käytetään odotettua heterotsygotia-astetta. Laajalle levinneillä tuulipölytteisillä havupuilla  $H_e$  on yleensä korkea (Hamrick 1989, Hamrick ja Godt 1989). (Taulukko 1).

*Taulukko 1. Polymorfisten lokusten osuus (P), alleelien lukumäärä kussakin lokuksessa keskimäärin (A) ja odotettu heterotsygotia-aste ( $H_e$ ) eri kasviryhmissä. (Hamrick ja Godt 1989).*

	Taksoneja	Lokuksia ka	P(%)	A	$H_e$
Paljassiemeniset	55	16.1	70.9	2.35	0.173
Yksisirkkaiset	111	15.5	59.2	2.38	0.181
Kaksisirkkaiset	329	16.8	44.8	1.79	0.136

On todettu, että havupuilla suurin osa muuntelusta on populaation sisäistä ja populaatioiden väliset erot ovat hyvin vähäisiä, yleensä paljon alle 10 % ( $G_{st}$ -arvoilla mitattuna, Taulukko 2) (Hamrick ja Godt 1989, El-Kassaby 1991). Tulos poikkeaa kvantitatiivisissa ominaisuuksissa havaitusta periytyvästä ekotyypisestä ja kliinaalisesta muuntelusta (esim. Merkle ja Adams 1986). Ilmeisesti isoentsyymeillä ei pystytä tutkimaan adaptiivista muuntelua. Isoentsyymit ovat valinnallisesti neutraaleja, kun taas kvantitatiivisiin ominaisuuksiin kohdistuu valinta ja ne ovat erilais-tuneempia eri populaatioissa. Eli isoentsyymimuuntelun perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä muiden ominaisuuksien muuntelusta (Lewontin 1984).

*Taulukko 2. Populaatioiden välisen muuntelun osuus kokonaismuuntelusta eri lisääntymisjärjestelmissä. (Hamrick 1989).*

Lisääntymisjärjestelmä	Tutkimuksia	$G_{st}$
Itsepölytteiset lajit	39	0.523
Ristisiittoiset lajit	76	0.118
Eläinpölytys	32	0.187
Tuulipölytys	44	0.068

### 3. Lisääntymisjärjestelmien tutkiminen

Populaatioiden geneettinen rakenne sekä luonnon- että jalostuspopulaatioissa on riippuvainen lisääntymisjärjestelmästä. Isoentsyymejä on käytetty ja käytetään hyvin laajalti lisääntymisjärjestelmätutkimuksissa. Siitepölyn leviämistä käyttäviin tutkimusmenetelmiin verrattuna isoentsyymimenetelmällä päästään askelta pidemmälle. Sen sijaan, että tutkittaisiin pelkästään siitepölyn leviämistä, päästään tutkimaan lisääntymistapahtumaan todella osallistunutta siitepölypopulaatiota – tosin vasta alkionkehityksen loppuvaiheissa, jolloin siemenet ovat valmiita itämään. Isoentsyymien avulla pystytään arvioimaan yksilöiden ja populaatioiden risti siitosasteita ja pölytyssuhteita. Myös taustapölytyksen osuutta siemenviljelyksillä on tutkittu.

Havupuiden etuna koppisiemenisiin verrattuna on emopuun munasolun tunnistaminen megagametofyytistä. Kun lisäksi tiedetään siemenessä olevan alkion genotyyppi, saadaan selville myös siitepölyhiukkasen genotyyppi (alkio - megagametofyytti = siitepölyhiukkanen). Osa siitepölyhiukkasista pystytään tunnistamaan joko uniikkien alleelien tai multilokusgenotyyppinsä perusteella juuri tietyistä lähteestä (isä, populaatio) tulleeksi. Koska kaikkia siitepölyhiukkasia ei pystytä tunnistamaan, tarvitaan erilaisia estimointimenetelmiä esim. ristisiitosasteen ja taustapölytyksosisuuden arvioimiseksi (esim. Shaw ja Allard 1981, Brown 1989, Friedman ja Adams 1985, Adams ja Birkes 1991, Adams ym. 1992).

Lukuisten tutkimusten perusteella on todettu männyn, kuten useimpien muidenkin havupuiden siemensatojen olevan hyvin ristisiittoisia (ks. Adams ja Birkes 1991, Muona 1989). Siemenviljelysten siemensadot ovat joskus jopa ristisiittoisempia kuin luonnonpopulaatioiden (Muona ja Harju 1989). Havupuilla ei ole itsesiitosta estäviä mekanismeja, mutta alkiolefaatit karsivat pois suurimman osan itse-pölytyksen seurauksena syntyneistä alkioista (Koski 1971). Siemenviljelysten ulkopuolelta tulevan taustapölytyksen on todettu olevan yksi suurimmista ongelmista siemenviljelyksillä kaikkialla, missä asiaa on vain tutkittu (Buchert 1992, Wheeler ja Jech 1992).

### 4. Genotyyppien tarkastaminen

Siemenviljelystutkimuksissa on olennaisen tärkeää olla varma siitä, että tutkitut kloonit ovat genotyybiltään yhtenäisiä. Klooneissa saattaa olla virheellisesti merkittyjä vartteita tai karanneita perusrunkoja. Taustapölytystä arvioitaessa siemenviljelyksen sisältä virhevartteista tullut siitepöly tulkitaan siemenviljelyksen ulkopuolelta tulleeksi. Isoentsyymien avulla voidaan kloonin vartteiden genotyypit tar-

kastaa, minkä jälkeen virheelliset vartteet voidaan poistaa (Adams 1981, Wheeler ja Jech 1992).

Valvottujen risteytysten tarkoituksena on tuottaa juuri halutunlaista siementä. Aina pölytys ei kuitenkaan onnistu, vaan sekaan saattaa joutua väärää pölyä. Kun vanhempien isoentsyymigenotyypit tunnetaan, pystytään tehdyt risteytykset tarkistamaan (Adams 1981, Wheeler ja Jech 1992).

## Lopuksi

Isoentsyymimuuntelulla on ollut suuri merkitys erityisesti lisääntymisjärjestelmä- ja siemenviljelytutkimuksen edistäjänä. Populaatiogenetiikan ja evoluutiobiologian teoreettinen tutkimus on saanut tuekseen ja vauhdittajakseen myös empiirisen tutkimuksen. Uusista molekyylogeneettisistä menetelmistä huolimatta isoentsyymimerkit tulevat varmaankin säilyttämään asemansa monilla tutkimuksen aloilla, varsinkin kun yhä paremmin ollaan tietoisia, ettei ole olemassa tutkimusmenetelmää, jolla löydetään vastaus kaikkiin kysymyksiin.

## Kirjallisuus

- Adams, W.T. 1981. Applying isozyme analyses in tree breeding programs. Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. July 27, 1979, Berkeley, Ca. Gen. Tech. rep. PSW-48. Berkeley, Ca: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service, s. 60-64.
- & Birkes, D.S. 1991. Estimating mating patterns in forest tree populations. Kirjassa: Fineschi, S., Malvolti, M.E., Cannata, F. & Hattemer, H.H. (toim.). Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, s. 157-172.
- , Birkes, D.S. & Erickson, V.J. 1992. Using genetic markers to measure gene flow and pollen dispersal in forest tree seed orchards. Kirjassa: Wyatt, R. (toim.). Ecology and evolution of plant reproduction. New approaches. Chapman & Hall, Inc. New York, s. 37-61.
- Allard, R.W. 1989. Future directions in plant population genetics, evolution, and breeding. Kirjassa: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. & Weir, B.S. (toim.). Plant population genetics, breeding, and genetic resources, Sinauer Associates, Inc., s. 1-19.
- Brown, A.H.D. 1989. Genetic characterization of plant mating systems. Kirjassa: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. & Weir, B.S. (toim.). Plant population genetics, breeding, and genetic resources, Sinauer Associates, Inc., s. 145-162.
- & Moran, G.F. 1981. Isozymes and the genetic resources of forest trees. Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. July 27, 1979, Berkeley, Ca. Gen. Tech. rep. PSW-48. Berkeley, Ca: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service, s. 1-10.

- Brown, A.H.D., Burdon, J.J. & Jarosz, A.M. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. Kirjassa: Soltis, D.E. & Soltis, P.S. (toim.). Isozymes in plant biology. Chapman and Hall Ltd., London, s. 73-86.
- Buchert, G.P. 1992. Genetic measurement of contamination in seed orchards, state of art. Kirjassa: Di-Giovanni, F. & Joyce, D. (toim.). Challenges in pollen dispersal and pollen contamination. Proceedings of challenges of pollen dispersal workshop. Canadian Climate Center, Environment Canada, Egbert, Ontario. CCA-92-008, s. 51-58.
- Cheliak, W.M. & Pitel, J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information report PI-X-42, Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, 49 s.
- Conkle, M.T. 1981. Isozyme variation and linkage in six conifer species. Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. July 27, 1979, Berkeley, Ca. Gen. Tech. rep. PSW-48. Berkeley, Ca: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service, s. 11-17.
- , Hodgskiss, P.D., Nunnally, L.B. & Hunter, S.C. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. Gen. Tech. Rep. PSW-64. Berkeley, Ca: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service, 18 s.
- El-Kassaby, Y.A. 1991. Genetic variation within and among conifer populations: review and evaluation of methods. Kirjassa: Fineschi, S., Malvolti, M.E., Cannata, F. & Hattemer, H.H. (toim.). Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, s. 61-76.
- Forrest, G.I. 1994. Biochemical markers in tree improvement programmes. Forestry Abstracts 55(2):123-152.
- Friedman, S. & Adams, W.T. 1985. Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Theor. Appl. Genet. 69:609-615.
- Hamrick, J.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. Kirjassa: Soltis, D.E. & Soltis, P.S. (toim.). Isozymes in plant biology. Chapman and Hall Ltd., London, s. 87-105.
- & Godt, M.J. 1989. Allozyme diversity in plant species. Kirjassa: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. & Weir, B.S. (toim.). Plant population genetics, breeding, and genetic resources, Sinauer Associates, Inc., s. 43-63.
- Hattemer, H.H. 1991. Genetic analysis and population genetics. Kirjassa: Fineschi, S., Malvolti, M.E., Cannata, F. & Hattemer, H.H. (toim.). Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, s. 5-22.
- Kephart, S.R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. Amer. J. Bot. 77(5):693-712.
- Koski, V. 1971. Embryonic lethals of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. Comm. Inst. For. Fenn. 75(3):1-30.
- Lewontin, R.C. 1984. Detecting population differences in quantitative characters as opposed to gene frequencies. Am. Nat. 123:115-124.
- Merkle, S. & Adams, W.T. 1986. Patterns of allozyme variation within and among Douglas-fir breeding zones in southwest Oregon. Can. J. For. Res. 17:402-407.
- Muona, O. 1989. Population genetics in forest tree improvement. Kirjassa: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. & Weir, B.S. (toim.). Plant population genetics, breeding, and genetic resources, Sinauer Associates, Inc., s. 282-298.

- & Harju, A. 1989. Effective population sizes, genetic variability, and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris*. *Silvae Genetica* 38(5-6):221-228.
- Saura, A. & Lankinen, P. 1974. Elektroforeesitekniikkaa perinnöllisyystieteilijöille, kurssimoniste, 15 s.
- Shaw, D.V. & Allard, R.W. 1981. Analysis of mating system parameters and population structure in Douglas-fir using single-locus and multilocus methods. Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. July 27, 1979, Berkeley, Ca. Gen. Tech. rep. PSW-48. Berkeley, Ca: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service, s. 18-22.
- Stebbins, G.L. 1989. Introduction. Kirjassa: Soltis, D.E. & Soltis, P.S. (toim.). Isozymes in plant biology. Chapman and Hall Ltd., London, s. 1-4.
- Szmidt, A.E. & Muona, O. 1989. Linkage relationships of allozyme loci in *Pinus sylvestris*. *Hereditas* 111:91-97.
- Weeden, N.F. & Wendel, J.F. 1989. Genetics of plant isozymes. Kirjassa: Soltis, D.E. & Soltis, P.S. (toim.). Isozymes in plant biology. Chapman and Hall Ltd., London, s. 46-72.
- Wendel, J.F. & Weeden, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. Kirjassa: Soltis, D.E. & Soltis, P.S. (toim.). Isozymes in plant biology. Chapman and Hall Ltd., London, s. 5-45.
- Wheeler, N.C. & Jech, K.S. 1992. The use of electrophoretic markers in seed orchard research. *New Forests* 6:311-328.



Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyilejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Pihtalajien tunnistus RAPD-tekniikalla**

Maria Boije  
Metla, Punkaharjun tutkimusasema  
Helsingin yliopisto, Kasvibiologian laitos

### **Johdanto**

Biotekniikan ja molekyylibiologian menetelmiä käytetään nykyisin jalostuksen ja tutkimuksen apuna. Populaatiogenetiikan merkkitekniikat ovat kehittyneet nopeaan tahtiin. Merkki on jokin ominaisuus, geenituote tai itse genomin pätkä joka voidaan yhdistää tiettyyn ominaisuuteen, yksilöön, populaatioon tms (Wagner ym. 1992). Entsyymimerkit sivuttivat ensimmäiseksi perinteisesti merkkeinä käytetyt morfologiset tai fenologiset ominaisuudet. Albino-ominaisuus taimessa on esimerkki morfologisesta merkistä (Savolainen 1993). Viime vuosina on otettu käyttöön DNA:n muunteluun perustuvia merkkejä. Näiden tekniikoiden avulla voidaan etsiä merkkejä suoraan kasvien perintöaineksesta. DNA-merkeillä on monenlaisia etuja entsyymimerkkeihin verrattuna. DNA-merkit kattavat koko genomin ja niitä voidaan löytää lähes rajattomasti. Nykyisellä polymeerasiketjureaktiolla DNA:ta voidaan monistaa hyvin pienistä näytteistä (Savolainen 1993). Tällaisia suoraan DNA:n muunteluun perustuvia merkkejä ovat RFLP (katkoskirjumuuntelu), RAPD (random amplified polymorphic DNA), mikrosatelliittimerkit ja CAPS (Rafalski 1993).

### **RAPD-tekniikka**

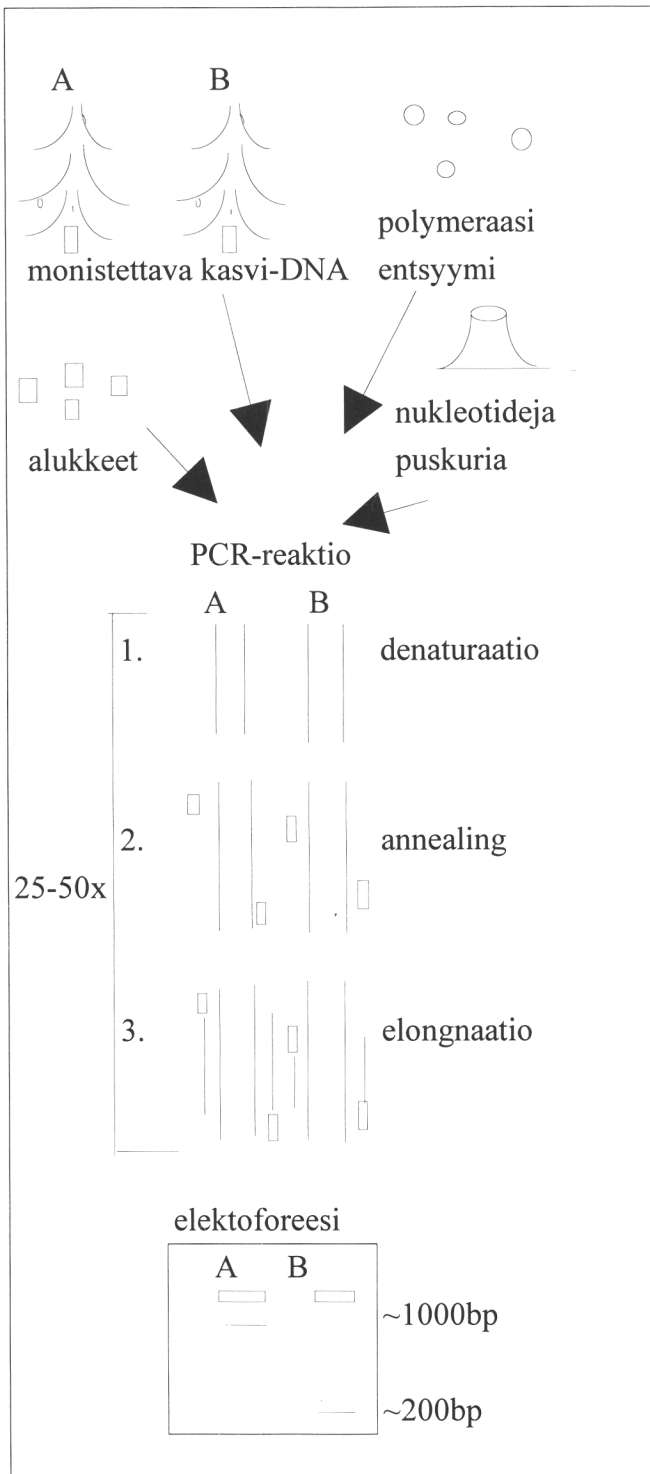
RAPD-tekniikka (Random Amplified Polymorphic DNA) kuuluu suoraan DNA-muuntelua tutkivien menetelmien joukkoon. RAPD-tekniikka pohjautuu PCR-menetelmään (Polymerase Chain Reaction). PCR:ssä DNA:ta monistetaan keino-tekoisissa olosuhteissa lämmönkestävällä polymeerasientsyymillä. PCR-reaktioon tarvitaan polymeerasientsyymien lisäksi nukleotideja, puskuria, aluketta (synteettisesti valmistettu lyhyt DNA-jakso) sekä tietysti monistettava kasvi-DNA. Polymeerasientsyymi pystyy monistamaan alukkeista riippuen joko tiettyjä tai sattumanvaraisia fragmentteja tutkittavasta DNA-näytteestä. RAPD-tekniikassa

käytetään emäsjärjestykseltään satunnaisia noin kymmenen emäsparin pituisia alukkeita, joiden avulla monistetaan tutkittavasta DNA-näytteestä geenisisällöltään tuntemattomia emäsjaksoja.

Itse PCR-reaktio tapahtuu kolmen eri lämpötilan kontrolloiman toistuvan syklin avulla: 1) Denaturaatiossa monistettava kasvi-DNA tehdään yksijuosteiseksi kuumentamalla. 2) Annealing-vaiheessa lämpötilan laskettua alukkeet sitoutuvat monistumisen mallina toimivaan kasvi-DNA:han. Alukkeiden sitouduttua templaatti-DNA:han entsyymi aloittaa (3) elongaatiovaiheessa uusien DNA-juosteiden synteesin alukkeista lähtien. Tämän jälkeen koko prosessi aloitetaan alusta. Uudet kaksoisjuosteiset DNA-molekyylit denaturoidaan, reaktioseos jäädytetään, alukkeet sitoutuvat jne.. Reaktiosarja toistetaan 25-50 kertaa. Templaatti-DNA:n läpikäytyä PCR-reaktionsarjan, monistuneet fragmentit erotellaan agarosigeelissä sähköisen varauksen ja kokonsa perusteella. Tulos tutkitaan UV-valossa etidumbromidivärjäyksen jälkeen. Riippuen tutkittavista genotyypeistä monistuneet DNA-jaksot voivat olla pituudeltaan erilaisia (Kuva 1) (Karvonen 1993; Weising ym. 1995).

### **Puiden tutkimusta RAPD-tekniikan avulla**

Biotekniikan ja molekyylibiologian menetelmiä on sovellettu onnistuneesti puuvartisilla kasveilla (Huang ym. 1993; Häggman 1991; Haines 1994). DNA-merkkejä voidaan hyödyntää monin tavoin myös metsäntutkimuksessa. Jalostuksessa merkkigeeneistä on hyötyä mm. populaatioiden, lajien tai yksilöiden eli kloonien erottamisessa ja tunnistamisessa, risteytysjälkeläisten alkuperää varmistamassa ja taustapölytyksen määrittämisessä sekä kvantitatiivisten ominaisuuksien kartoittamisessa (QTL) (Neale ym. 1992). RAPD-tekniikkaa on mm. sovellettu mustakuusen (*Picea mariana*) somaattisten alkioiden vaihtelun tutkimiseen (Isabel ym. 1992). Somaattisten alkioiden geneettisen vaihtelun tutkiminen on tärkeätä esimerkiksi kloonien kaupattaessa. Kanadassa ja Suomessa on osoitettu että RAPD-merkkejä voidaan käyttää eri koivulajien (*Betula alleghaniensis*, *B. pendula*) kontrolloitujen risteytysten valvonnassa (Roy ym. 1992; Åkerman ym. 1995). RAPD-merkkejä on myös käytetty haapakloonien (*Populus spp.*) ja omenalajikkeiden tunnistamisessa (Castiglione ym. 1993; Koller ym. 1993). Esimerkkinä RAPD-tekniikan käytöstä läheisten lajien erottamiseksi toisistaan voidaan mainita Arcaden työryhmineen (1995) tekemä tutkimus lehtikuusista.



Kuva 1. Geenisisällöltään tuntemattoman kasvi-DNA:n tutkiminen PCR-RAPD menetelmän avulla.

## Pihdat

*Abies*-suku, pihdat, ovat viileän ilmastovyöhykkeen, lauhkean ja vieläpä subtrooppisen vyöhykkeen metsäpuita, mutta niiden levinneisyysalue ei ulotu pohjoiselle metsärajalalle. Suomessa pihtoja ei esiinny luontaisesti. Pihtojen puuttuminen Fennoskandiasta tuskin johtuu ilmastollisista syistä. Luultavasti tärkein syy on se, että viime jääkauden jälkeen pihdat eivät vielä ole ehtineet vallata takaisin aikaisempia asemiaan muilta nopeammin edenneiltä ja geneettisesti ilmastoon sopeutuneilta puilta (Sarvas 1964).

Pihtalajeja tavataan maapallolla kaikkiaan 35-40. Useimmat ovat *Picea*-lajien tavalla puolivarjopuita. Pihta-suvun teknillistä arvoa vähentää niiden helposti lahoava puu. Useimpien pihtojen puuaine on kevyttä, pehmeätä ja sen lujuusominaisuudet ovat vähäiset. Luontaisilla levinneisyysalueillaan pihtoja käytetään sahapuiksi ja selluloosan raaka-aineeksi, mutta yleensä pihtapuu ei ole kumpaankaan yhtä haluttua kuin esimerkiksi kuusipuu. Pihtojen vanhempi suomenkielinen nimi, jalokuusi, viitannee lähinnä pihtojen koristeelliseen ulkonäköön, ei niinkään teknillisiin ominaisuuksiin (Sarvas 1964). Pihtojen terävähuippuinen latvus sekä niiden hopeahoitoiset neulaset tekevät ne erittäin suosituiksi koristepuiksi.

Suomessa pihtoja esiintyy eksootteina puutarhoissa, viljelmissä ja puulajipuistoissa, mm. Punkaharjun puulajipuistossa. Punkaharjun puulajipuistoon istutettiin 1920-30 -luvulla 16 pihtalajia. Kymmenen lajia on säilynyt nykypäiviin, mutta puolet näistä on kuolemaisillaan ankarien talvien seurauksena. Elinvoimaisina säilyneet lajit ovat siperianpihta (*Abies sibirica*), lännenpihta (*Abies lasiocarpa*), palsamipihta (*Abies balsamea*), japaninpihta (*Abies veitchii*) ja sahalininpihta (*Abies sachalinensis*) (Nikkanen 1991).

Siperianpihta on venäläis-siperialaisen havumetsän, taigan, tyypillinen edustaja. Lännen- ja palsamipihtan luontainen levinneisyysalue on pohjois-Amerikka. Palsamipihtaa esiintyy suurimmassa osassa Kanadan metsäalueita kun taas lännenpihta kasvaa pohjois-Amerikan koillisvuoristoissa Alaskasta Meksikoon. Japanin- ja sahalininpihtaa tavataan nimiensä mukaan Japanin saarilla sekä Sahalinin alueilla (Hämet-Ahti ym. 1989).

## Tutkimuksen taustaa

Punkaharjun puulajipuistossa siperian-, lännen-, palsami-, japanin- ja sahalininpihta ovat sopeutuneet ilmastoomme niin hyvin että ne ovat tuottaneet runsaasti jälkeläisiä. Näitä luontaisesti syntyneitä pihtataimia voidaan käyttää hyväksi puulajipuistoa

kehittettäessä, siinä tapauksessa että niiden alkuperä tunnistetaan. Punkaharjun puulajipuisto on merkittävä kohde dendrologian opetuksessa ja tutkimuksessa, joten siellä olevien puiden tunnistaminen on tärkeää. Eri pihtalajien välisillä hybrideillä voi olla merkitystä myös esimerkiksi koristekasveina. Yleensä puulajipuiston pihtalajien geneettinen alkuperä on tuntematon. Ne voivat olla joko puhtaita lajeja tai lajien välisiä risteymiä. Koska jälkeläisten tunnistus morfologisten tuntomerkkien (neulasten ulkomuoto, ilmarakojuovat, kävyn rakenne jne.) perusteella ei aina ole mahdollista, RAPD-merkit valittiin tunnistusmenetelmäksi.

### **Tutkimuksen aineisto ja menetelmät**

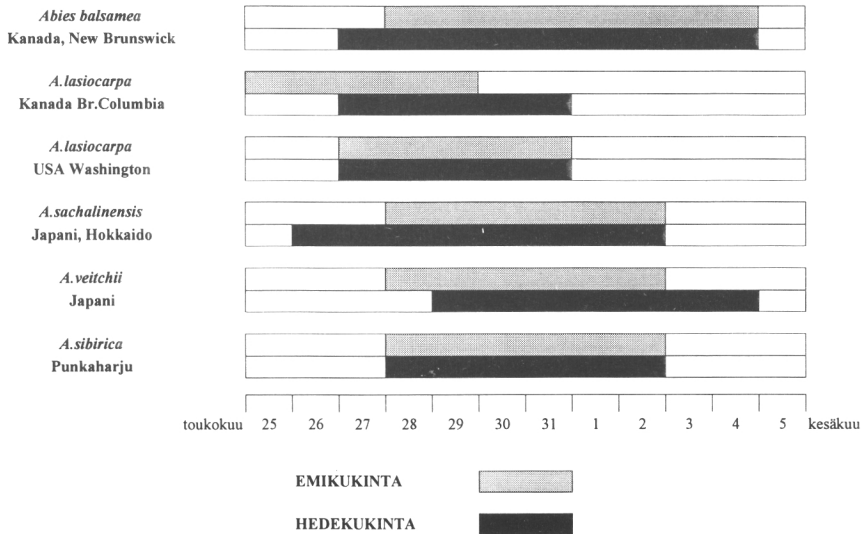
Tutkimuksen aineistona käytetään Punkaharjun puulajipuistossa kasvavien pihtalajien neulasnäytteitä. Tutkittavien pihtalajien (*A. balsamea*, *A. lasiocarpa*, *A. veitchii*, *A. sachalinensis* ja *A. sibirica*) kaikista yksilöistä kerättiin neulasia. Tunnettuja mahdollisia vanhempia on yhteensä 120 kpl. Neulasnäytteitä on kerätty myös luontaisesti syntyneistä pihtayksilöistä, joita on tarkoitus tunnistaa noin 50 kpl. Jokaisesta puuyksilöstä on eristetty DNA:ta muunnellun CTAB-menetelmän mukaan (Doyle ja Doyle 1990). CTAB on aine joka irroittaa membraanit ja muodostaa kompleksin kasvi-DNA:n kanssa. DNA-merkkejä etsitään PCR-RAPD tekniikan avulla. RAPD-tekniikassa monistetaan PCR:llä sattumanvaraisesti eri pituisia DNA-jaksoja satunnaisalukkeiden avulla. Jälkeläisten tunnistamiseksi käytetään vain sellaisia DNA-jaksoja, jotka ovat kullekin lajille tyypillisiä ja jonka kohdalla ei esiinny lajin sisäistä vaihtelua.

### **Tulosten tarkastelua**

Itse käytännön tutkimustyö aloitettiin tänä keväänä tarkkailemalla Punkaharjun puulajipuiston pihtojen kukintafenologiaa. Havaintojen perusteella emi- ja hedekukinta tapahtuu kaikilla lajeilla lähes samanaikaisesti, eli kukintafenologisia risteytymisestiteitä eri lajien välillä ei ole (Kuva 2).

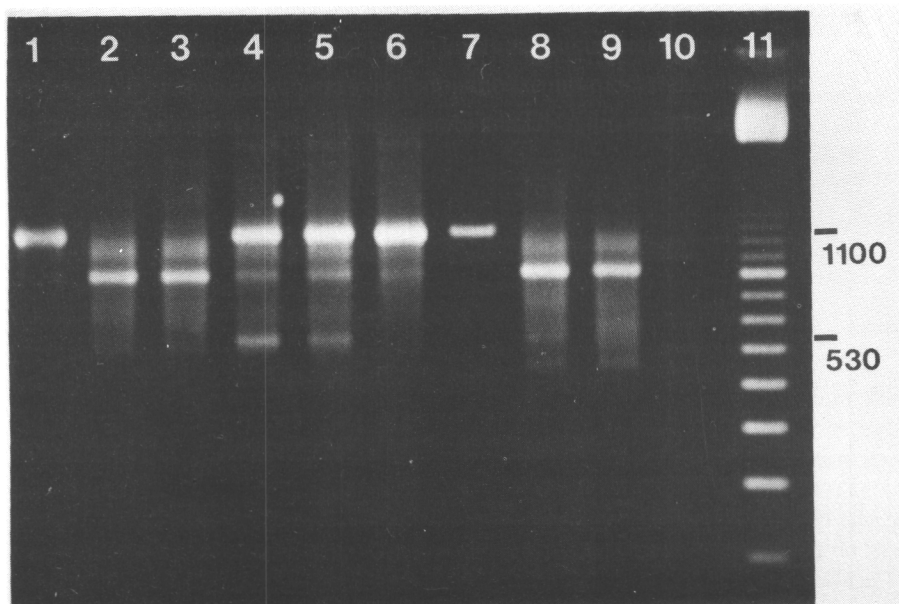
Tutkimuksen tämänhetkisen tilanteen mukaan, neljänkymmenen satunnaisalukkeeseen kokeilun jälkeen, yhdentoista alukkeeseen on osoitettu monistavan lajispesifisiä- ja osittain lajispesifisiä DNA-merkkejä, sekä merkkejä jotka jakavat lajit eri ryhmiin. Kaikilla yhdellätoista alukkeella ei ole vielä tutkittu aivan kaikkia yksittäisiä DNA-näytteitä eri lajeista. Siperianpihta (*A. sibirica*) pystytään erottamaan varmasti muista lajeista. Muille neljälle lajille ei toistaiseksi ole löytynyt varmoja lajispesifisiä DNA-merkkejä. Toisaalta osa lajeista pystytään erottamaan toisistaan käyttäen hyväksi osittain lajispesifisiä-, lajeja eri tavoin ryhmitteleviä RAPD-merkkejä. Esi-

merkiksi yhden alukkeen kohdalla lajit jakautuvat selvästi kahteen maantieteelliseen ryhmään. Luontaisesti syntyneet jälkeläiset pystytään luotettavammin tunnistamaan lajispesifisten merkkien avulla, mutta samaan lopputulokseen voidaan päästä myös yhdistämällä informaatiota useista, osittain lajispesifisistä DNA-merkeistä.



Kuva 2 Tutkittavien pihtalajien kukintafenologiahavainnot keväällä 1995.

Se, että siperianpihta pystytään jo näin tutkimuksen alkuvaiheessa erottamaan muista tutkittavista pihtalajeista on ymmärrettävää lajien maantieteellisten esiintymisalueitten perusteella. Siperianpihdan luontainen levinneisyysalue poikkeaa selvästi muista tutkittavista lajeista. Voitaneen päätellä, että siperianpihta eroaa geneettisesti eniten lännen-, palsami-, japanin- ja sahalininpihdasta. Samantyyppistä geneettistä muuntelua on nähtävissä DNA-merkin kohdalla, joka jakaa lajit kahteen maantieteelliseen ryhmään: euraasialaiseen- ja pohjoisamerikkalaiseen ryhmään. Euraasialaiseen ryhmään kuuluvat siperian-, japanin- ja sahalininpihta, ja lännen- ja palsami- ja puolestaan kuuluvat pohjoisamerikkalaiseen ryhmään (Kuva 3). Osittain lajispesifisten DNA-merkkien kohdalla on huomattu, että palsami- ja lännenpihta ovat vaikeasti toisistaan erotettavissa. Sama pätee japaninpihdan ja sahalininpihdan kohdalla. Tästä voitaneen päätellä että lajit, joiden luontainen levinneisyysalue on lähellä toisiaan tai osittain sama ovat myös perinnöllisesti läheisiä, mikä näkyy samankaltaisina DNA:n monistumistuloksina käytettäessä RAPD-tekniikkaa.



Kuva 3. DNA:n monistumistuloksia alukkeella 959. 1= *A. sachalinensis*, 2 ja 3= *A. balsamea*, 4 ja 5= *A. sibirica*, 6 ja 7= *A. veitchii*, 8= *A. lasiocarpa* (Kanada Br.Col.), 9= *A. lasiocarpa* (USA), 10= vesi, 11= 100 bp ladder. PCR-reaktioissa käytettiin templaattina bulk-DNA:ta. Esimerkkeinä löytyneistä RAPD-merkeistä voidaan mainita *A. sibirica*-lajille tyypillinen merkki (kooltaan noin 530 bp) ja lajit maantieteellisiin ryhmiin jakava merkki (kooltaan noin 1100 bp).

### Kirjallisuus

- Arcade, A., Faivre Rampant, P., le Guerroué, B., Paques, L. & Prat, D., 1995. Quantitative traits and genetic markers: analysis of a factorial mating design in larch. Ks. Abstracts. Somatic Cell Genetics and Molecular genetics of Trees. Joint Meeting of the IUFRO Working Parties S.04-07 and S.04-06. Gent, Belgium, september 26-30, 1995.
- Castiglione, S., Wang, G., Damiani, G., Bandi, C., Bisoffi, S. & Sala, F. 1993. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus spp.*) clones. *Theor. Appl. Genet.* 87:54-59
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *BRL Focus* 12:13-15
- Haines, R. 1994: Biotechnology in forest tree improvement. FAO Forestry Paper 118, Roma, Italy. 230 s.
- Huang, Y., Karnosky, D.F. & Tauer, C.G. 1993. Application of biotechnology and molecular genetics to tree improvement. *Journal of Arboriculture* 19:84-98.
- Häggman, H. 1991. Application of biotechnology to forest tree breeding. *Silva Fennica* 25: 270-279.
- Hämäl-Ahti, L., Palmén, A., Alanko, P. & Tigerstedt, P.M.A. 1989. Suomen puu- ja pensaskasvio. Yliopistopaino, Helsinki. 290s

- Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay, F.M. & Bousquet, J. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana*. *Theor. Appl. Genet.* 86:81-87.
- Karvonen, P., 1993. Mitä DNA-menetelmät voivat paljastaa havupuiden perimästä ja evoluutiosta? *Luonnon Tutkija* 4/1993:152-155.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J.M. & Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 901-904.
- Neale, D.B., Devey, M.E., Jermstad, K.D., Ahuja, M.R., Alosi, M.C. & Marshall, K.A. 1992. Use of DNA markers in forest tree improvement research. *New Forests* 6:391-407.
- Nikkanen, T. 1991. Punkaharjun puulajipuiston kehittäminen. *Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja* 372. 50s
- Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9: 275-280.
- Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. & Bousquet, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RADPs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor. Appl. Genet.* 85:173-180.
- Sarvas, R. 1964. Havupuut. Werner Söderström Oy, Porvoo. 518 s.
- Savolainen, O. 1993. DNA-merkit jalostuksen käytössä. Julkaisussa Häggman, J. & Oksa, E (toim.) *Metsänjalostusta Punkaharjulla jo 70 vuotta. Metsäntutkimuspäivät Olavinlinnassa 1993. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja* 525: 47-50.
- Wagner; D. 1992. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphism as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forests* 6: 373-390
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. & Meyer, W. 1995. DNA fingerprints in plants and fungi. CRC Press, Florida. 322s
- Åkerman, S., Tammissola, J., Lapinjoki, S., Söderlund, H., Kauppinen, V., Viherä-Aarnio, A., Regina, M. & Hagqvist, R., 1995. RAPD markers in parentage confirmation of a valuable breeding progeny of European white birch. *Canadian Journal of Forest Research* 25:1070-1076.

Oksa, E. (toim.) 1995  
 Metsäntutkimus uusissa puissa:  
 monistusta ja molekyyilejä  
 Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## DNA-markkerien käyttö rauduskoivulla

Mikko Regina ja Seppo Lapinjoki  
 Kuopion yliopisto, Farmaseuttisen kemian laitos

### Johdanto

Vuonna 1993 alkaneen tutkimusprojektimme tarkoituksena on ollut DNA-markkeriteknikoiden käyttöönotto rauduskoivun (*Betula pendula* Roth.) tutkimusta, jalostustyötä ja istutusmateriaalin seurantaan ajatellen. DNA-markkereista voidaan odottaa olevan erityistä etua periytyvien ominaisuuksien seulonnassa jo varhaisessa vaiheessa. Näin rauduskoivun luonnollisen sukupolvenkierron aiheuttama jalostustyön pitkittyminen vältettäisiin, kun voidaan tehdä tarvittavia valintoja varhaisessa vaiheessa. Esimerkkejä DNA-markkerien mahdollisista sovellutusalueista rauduskoivulle esitetään kuvassa 1.



Kuva 1. DNA markkerikartan sovellukset rauduskoivulle

Vielä viisi vuotta sitten oli DNA-markkereiden löytäminen vaikeaa ja työlästä, mutta tekniikoiden nopea kehittyminen mahdollistui polymeraasiketjureaktion (PCR) keksimisen jälkeen (Mullis ja Faloona 1987, Saiki ym. 1988). Nyt markkerit ovat tärkeitä välineitä geneettisen kartoituksen, yksilöiden tunnistuksen sekä populaatiogeneettisten tutkimusten yhteydessä kaikilla eliölajeilla (Helentjaris 1987, Litt ja Luty 1989, Tanksley, ym. 1989, Weber ja May 1989, Williams ym. 1990, Murray ym. 1991, Zabeau ja Vos 1992). DNA-markkereita käytetään ns. sormenjälkinä yksilöiden tunnistamisessa. Ne voivat myös olla tiukasti johonkin ominaisuuteen liittyneitä, jolloin markkerien avulla on mahdollista seurata ominaisuutta risteytysten jälkeläisaineistoissa. Kvantitatiivisesti ominaisuuksiin vaikuttavia lokuksia (QTL:t) voidaan seurata niihin liittyvillä DNA-markkereilla. QTL:t kontrolloivat monimutkaisesti periytyviä ominaisuuksia. Tällaisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi puuaineen laatu, kasvunopeus, kuidun pituus ja stressinsieto. DNA-markkereita on jo käytetty geneettisten kytkentäkartojen rakentamiseksi useille puulajeille, kuten poppelille, eukalyptukselle (Grattapaglia ja Sederoff 1994), loblollymännylle, lehtikuuselle, valkokuuselle, Douglas-kuuselle, radiatamännylle, etelänkeltamännylle (*Pinus elliottii*) ja pitkäneulasmännylle (*Pinus palustris*).

DNA-markkeri voidaan yleistää mitattavissa olevaksi DNA:n rakenteeksi, joka periytyy yksinkertaisten mendelististen sääntöjen mukaisesti. Näitä ovat RFLP-, RAPD-, AFLP- ja SSR-markkerit.

### **RFLP-markkerit**

RFLP eli restriktiofragmenttien pituuspolymorfia perustuu DNA:n pilkkomiseen restriktioentsyymillä (Tanksley, ym. 1989). Tämän jälkeen pilkkoutuneet DNA-palaset voidaan erotella elektroforeettisesti toisistaan. Syntyneet palaset siirrostetaan nylon- tai nitroselluloosakalvolle, ja RFLP-koettimella suoritettuna hybridi-saatioanalyysin jälkeen näkyvät polymorfiset (kokovaihtelun mukaan erottuneet) fragmentit filmillä tummennettuina ja eroteltavina juovina. Markkerityyppi on kodominantti ja antaa täydellisen geneettisen informaation yhdestä lokuksesta. DNA-määrä, joka tarvitaan analyysiin on 5-10 µg, eli kohtalaisen suuri verrattuna muihin tässä artikkelissa mainittuihin DNA-tekniikoihin. Menetelmän haittana ovat olleet radioaktiiviset merkkiaineet, mutta uudet ja herkät kemiluminisenssiin tai värireaktioihin pohjautuvat kuvantamismenetelmät ovat nykyisin saatavilla.

## RAPD-markkerit

RAPD eli satunnaisesti monistunut polymorfinen DNA yhdistää PCR-reaktion (ks.erillinen kappale lopussa) ja epäspesifiset DNA-alueet, jotka ovat 10 - 12 emästä pitkiä ja joista kukin voi sitoutua useisiin paikkoihin DNAssa. Kun alukkeiden sitoutuminen tapahtuu riittävän lähellä toisiaan ja vastakkaissuuntaisessa orientaatioissa polymerisaatio etenee ja alukkeiden välinen DNA-jakso monistuu (Williams ym. 1990). Analyysiin tarvittava DNA-määrä on 15-25 ng välillä ja ei-radioaktiiviset merkkiaineet ovat käytettävissä. Menetelmä on nopea ja halpa, sekä kohtuullisen suoraviivainen pystyttää. DNA-jaksot voivat olla polymorfisia sen johdosta, että sekvenssien erot esiintyvät alukseen yhdessä tai molemmissa sitoutumiskohdissa tai sitoutumispaikkojen välinen etäisyys on muuttunut. Täten tietty DNA-jakso joko näkyy tai ei näy RAPD-merkkinä. RAPD-markkerit ovat dominanteja, mikä rajoittaa niiden käyttökelpoisuutta.

Työryhmämme on todennut RAPD:n soveltuvan rauduskoivulle sormenjälkitekniikkana yksilöntunnistuksessa ja vanhemmuusanalytiikassa (Åkerman ym. 1995). Seuloimme soveliaita RAPD-markkereita varmistamaan kantapuiden oikeellisuuden risteytyksestä, jossa äitipuoli ei ollut varma. Samoja markkereita käytettiin myös liuskalehtisen fenotyypin aiheuttavan mutaation alkuperän selvityksessä. DNA-näytteiden yhdistäminen on RAPD-tekniikassa mahdollista, kun käsitellään tietyn fenotyypin omaavia yksilöitä ja verrataan saatuja tuloksia toisen fenotyypin poolin RAPD-merkkeihin. Tähän liittyen kehitimme myös yleisen periaatteen BSA-analyysin (bulked segregant analysis) käytöstä vanhemmuustutkimuksissa (Tammisola ym. 1994). RAPD-markkereiden on myös osoitettu toimivan geneettisten kytkentäkartojen laadinnassa sekä lituruoholla (*Arabidopsis thaliana*) että eukalyptuksella (Reiter ym. 1992, Grattapaglia ym. 1995)

## AFLP-markkerit

Keygene on yritys, jonka tuotekehittelyn tuloksena "amplified fragment length polymorphism" on syntynyt (Zabeau ja Vos 1992). Lähestymistapa on samatyypinen kuin RFLP:ssä. Siinä huomioidaan pituuspolymorfiaa, joka syntyy restriktiofragmenttien erilaisista pituuksista. AFLP:ssä restriktiofragmentit kuitenkin monistetaan PCR:llä, eikä havainnointiin tarvita niihin sitoutuvia koettimia kuten RFLP:ssä. Monistuksessa käytetään alukkeita, joita vastaavat DNA-jaksot on liitetty adapterina restriktiofragmenttien päihin. Koska kaikkien fragmenttien ei haluta monistuvan yhdessä analyysissä, valitaan pieni alajoukko fragmentteja käytämällä 1-5 satunnaista emästä alukseen 3'-päissä. Tällöin alukkeet tunnistavat vain ne fragmentit, joiden päissä sattuvat olemaan nämä ns. selektiiviset emäkset.

Muuntelemalla selektiivisiä emäksiä voidaan siis vaikuttaa PCR:llä monistettavien fragmenttien lukumäärään.

Rauduskoivulla menetelmä on osoittautunut erittäin toimivaksi ainakin sormenjälkitekniikkana. Se on luotettavuudeltaan ja toistettavuudeltaan huomattavasti RAPD-markkereita parempi, joskin tarvittava DNA-määrä on suurempi (500-2500 ng). Tämä kävi ilmi mm. AFLP-markkereiden segregaaation seurannassa eräässä risteytysjälkeläistössä.

### **SSR-markkerit**

Simple Sequence Repeat eli yksinkertaisen sekvenssin toistojaksot, jotka tunnetaan myös mikrosatelliitteina, muodostuvat muutamasta toistuvasta nukleotidisekvenssistä. Nukleotidien määrä toistossa vaihtelee yhdestä seitsemään ja toistojen määrä yleensä neljästä neljäänkymmeneen (Akkaya ym. 1992, Cregan 1992, Bruford ja Wayne 1993, Lagercrantz ym. 1993, Morgante ja Olivieri 1993, Wright 1994). SSR:t ja niiden polymorfia todettiin ensimmäisenä ihmisgenetiikan tutkimuksessa, mutta myöhemmin niitä on käytetty eläinten ja kasvien genomisten karttojen kehittämisessä (Litt ja Luty 1989, Tautz 1989, Weber ja May 1989, Dietrich ym. 1992, Hazan ym. 1992, Serikawa ym. 1992, Bell ja Ecker 1994, Grattapaglia ja Sederoff 1994, Rohrer ym. 1994, Jacob ym. 1995). SSR:t ovat luonteeltaan kodominanteja, genomissa runsaslukuisina esiintyviä ja tasaisesti genomiin jakautuneita. SSR-markkerit ovat osoittautuneet huomattavasti polymorfisemmiksi kuin RFLP-markkerit (Morgante ja Olivieri 1993, Poulsen ym. 1993, Cregan ym. 1994).

SSR on PCR-pohjainen markkerityyppi, jossa on ensin tunnistettava SSR-jakso. Tämän jälkeen sekvennoidaan DNA molemmilta puolilta toistojaksoa sekä suunnitellaan sille sopivat alukkeet PCR-monistusta varten. Näin koko alukkeiden sitoutumiskohtien välinen alue, ns. mikrosatelliitti, voidaan monistaa SSR-markkeriksi, jonka koko vaihtelee 80-350 emäksen välillä. Polymorfia ilmenee toistojaksojen määrän vaihteluna, eli tässäkin tapauksessa tarkasteltavien juovien pituuseroina.

Yleensä SSR-jaksoja etsitään tietokoneohjelmilla suoraan tietokannoista tai toistojaksokoetinten avulla genomisista DNA-kirjastoista. Olemme kehittäneet tämän rinnalle tekniikan, jolla niitä voidaan osoittaa myös AFLP-fragmenteista. Osoitimme koettimella toistojakson olemassaolon, kloonasimme fragmentit sekvennointivektoriin, sekvennoimme SSR-markkerin ja testasimme sekvenssin pohjalta suunnitelluilla alukkeilla markkerin todellisuuden alkuperäisestä koivun DNA:sta. Menetelmästä olemme lähettäneet artikkelin arvioitavaksi ja julkaistavaksi.

Tällä hetkellä olemme saaneet tunnistettua rauduskoivulle 14 SSR-markkeria ja niiden polymorfian testaus on meneillään. Ensimmäiset monistetut markkerit ovat osoittautuneet polymorfisiksi ja siten käyttökelpoisiksi. Tuotamme jatkuvasti uusia SSR-sekvenssejä rauduskoivun kokofraktioidusta genomisesta kirjastosta (Baron ym. 1992, Karagyozov ym. 1993) ja tavoitteenamme on saada yli 30 polymorfista SSR-markkeria, joiden avulla voimme luoda alustavan geneettisen kytkentäkartan rauduskoivulle.

## PCR-menetelmä

Polymeraasiketjureaktio on menetelmä, jonka avulla monistetaan suuria määriä tiettyä DNA-jaksoa. Monistuminen tapahtuu tunnettuja alukkeita käyttämällä ja lämmönkestävää DNA-polymeraasientsyymiä hyödyntämällä. PCR-menetelmässä on kolme perusaskelta. Ensin suunnitellaan kaksi n. 20 emäksen mittaista aluketta käyttäen monistettavan DNA-fragmentin emäsjärjestystä mallina. Toisessa vaiheessa tutkittava DNA, sekä nukleotidit, joista DNA rakentuu, ja DNA-polymeraasientsyymi yhdistetään reaktioseokseksi. Kolmannessa vaiheessa polymeraasiketjureaktioseos asetetaan laitteeseen, joka nopeasti sekä luotettavasti kykenee lämmittämään ja viilentämään seosta ohjelmoidusti.

Varsinaisessa reaktioketjussa kolmen toiminnon toistaminen muodostaa varsinaisen monistustapahtuman. Kuumennusvaiheessa kaksijuosteinen kohde-DNA erottuu kahdeksi yksisäikeiseksi juosteeksi. Tämän jälkeen tapahtuu nopea jäädytys ja alukkeet tarttuvat sitoutumislämpötilassaan emäsjärjestystään vastaaviin DNA:n kohdefragmentteihin. Kun reaktioseoksen lämpötila sitten nousee 72°C:een niin DNA-polymeraasi saa aikaan polymerisaatioreaktion, jossa vapaat nukleotidit muodostavat vastinsäiettä yksijuosteiselle DNA:lle. Tietyn ajan kuluttua reaktioseos kuumennetaan, jolloin polymerisaatioreaktio pysähtyy ja seuraava kierros reaktiota voi alkaa (Mullis ja Faloona 1987, Saiki ym. 1987).

Reaktiossa kahden alukkeen välissä oleva DNA-juoste monistuu kunkin kierroksen aikana. Ensimmäisen kierroksen aikana yhdestä DNA-fragmentista muodostuu kaksi DNA-fragmenttia, toisen kierroksen aikana neljä fragmenttia, kolmannen kierroksen aikana kahdeksan fragmenttia jne. Monistuminen perustuu siihen, että jokainen monistunut fragmentti toimii mallina kahdelle reaktiolle seuraavalla kierroksella. Tavallisesti suoritetaan kaikkiaan 20-30 kierrosta ja jokaisessa kierroksessa DNA-fragmenttien lukumäärä tuplaantuu edelliseen verrattuna. PCR:n käyttökelpoisuus perustuu valikoivaan DNA-fragmenttien monistukseen ja reaktiosarjan kykyyn tuottaa miljoonia kopioita kohdefragmentista 2-5 tunnissa. Loppu-

tuotetta syntyy niin runsaasti (jopa kymmeniä  $\mu\text{g}$ ), että se voidaan havaita nopeasti ja helposti.

### Tulevaisuuden näkymät

RAPD-, SSR- ja AFLP-markkereille on käytettävissä yleisiä ohjeita eri sovelluksiin ja kaupallisia alukesarjoja on saatavilla useista eri lähteistä. Menetelmät ovat yleisesti tutkimuksen ja jalostajien käytössä. Kasvinjalostajille ne edustavat käyttökelpoisia ja nopeita tunnistusjärjestelmiä markkeriavusteiseen selektioon ja perustutkimusluonteisiin tunnistustehtäviin.

Tutkimuksemme alkuperäinen päämäärä oli DNA-markkereiden käyttöönotto ja soveltaminen rauduskoivulla. Tämä on saavutettu ja saatavien SSR-markkereiden myötä voimme mahdollisesti rakentaa genomisen kartan rauduskoivulle 1996-97 välisenä aikana. Työryhmämme mielenkiinto kohdistuu tällä hetkellä lähinnä puulaatuun liittyvien markkerien lisäksi rauduskoivun visaisuuteen ja fenyylipropanoidireitin DNA-markkereihin.

### Kirjallisuus:

- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. & Cregan, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131-1139.
- Baron, B., Poirier, C., Simon-Chazottes, D., Barnier, C. & Guenet, J.L. 1992. A new strategy useful for rapid identification of microsatellites from DNA libraries with large size inserts. *Nucleic Acids Res.* 20: 3665-3669.
- Bell, C.J. & Ecker, J.R. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of arabidopsis. *Genomics* 19:137-144.
- Bruford, M.W. & Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 3:939-943.
- Cregan, P.B. 1992. Simple sequence repeat DNA length polymorphisms. *Probe Spring*:18-22
- , Bhagwat, A.A., Akkaya, M.S. & Rongwen, J. 1994. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5:49-61.
- Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S.E., Shin, H-S., Friedman, J., Dracopoli, N.C. & Lander, E.S. 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131:423-447.
- Grattapaglia, D. & Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137.
- Hazan, J., Dubay, C., Pankowiak, M-P., Becuwe, N. & Weissenbach, J. 1992. A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics* 12:183-189.
- Helentjaris, T. 1987. A genetic linkage map for maize based upon RFLPs. *Trends Genet.* 3:217-221.

- Jacob, H.J., Brown, D.M., Bunker, R.K., Daly, M.J., Dzau, V.J., Goodman, A., Koike, G., Kren, V., Kurtz, T., Lernmark, Å., Levan, G., Mao, Y-P., Pettersson, A., Pravenec, M., Simon, J.S., Szpirer, C., Szpirer, J., Trolliet, M.R., Winer, E.S. & Lander, E.S. 1995. A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nature Genetics* 9:63-69.
- Karagoyozov, L., Kalcheva, I.D., & Chapman, V.M. 1993. Construction of random small insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Res.* 16:3911-3912.
- Lagercrantz, U., Ellengren, H., & Andersson, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21:1111-1115.
- Litt, M. and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am.J.Hum.Genet* 44, 397-401.
- Morgante, M. & Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3:175-182.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- Murray, M.G., Chyi, Y-S., Cramer, J.H., DeMars, S., Kirchman, J., Ma, Y., Pitas, J., Romero-Severson, J., Shoemaker, J., West, D.P., Zaitlin, D. 1991. Application of restriction fragment length polymorphism to maize breeding. *Ks. Herrman, R.G., Larkins, B. (toim.) Plant Molecular Biology.* Plenum Press, New York, s 249-261.
- Poulsen, G.B., Kahl, G. & Weising, K. 1993. Abundance and polymorphism of simple repetitive DNA sequences in *Brassica napus* L. *Theor. App. Genet.* 85:994-1000.
- Reiter, R.S., Williams, J.G.K., Feldman, K.A., Rafalski, A., Tingey, S.V. & Scolnik, P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1477-1481.
- Rohrer, G.A., Leeson, J.A., Keele, J.W., Smith, T.P. & Beattie, W. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136:231-245.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, B., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-489.
- Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J., Dubay, C.J., Lindpainter, K., Ganten, D., Guenet, J-L., Lathrop, G.M. & Beckmann, J.S. 1992. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131:701-721
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., and Bonierbale, M.W. 1989, *Bio/Tecnology* 7:257-264.
- Tammisola, J., Åkerman, S., Regina, M., Lapinjoki, S.P. & Kauppinen, V. 1994. Strategies of pooling for parentage analyses applying DNA markers. *Ks. Ooijen J.W. & Jansen J. (toim.): Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular markers.* Proc. 9th Meeting EUCARPIA Sect. Biometrics in Plant Breeding, Wageningen, the Netherlands, s.186-194.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.
- Weber, J. and May, P.E. 1989. Abundant class of human polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am.J.Hum.Genet.* 44:388-396.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wright, J.M. 1994. Mutations at VNTRs: Are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? *Genome* 37:345-347.
- Zabeau, M. & Vos, P. 1992. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *Eur. Pat. Appl.* 92402629.7.
- Åkerman, S., Tammissola, J., Lapinjoki, S.P., Söderlund, H., Kauppinen, V., Viherä-Aarnio, A., Regina, M., and Hagqvist, R.. 1995. RAPD markers in the parentage confirmation of a valuable breeding progeny of European white birch. *Can. J. For. Res.* 25: 1070-1076.

Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyilejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## Agrobakteeri-välitteinen geeninsiirto mäntyyn - puun ja bakteerin vuorovaikutus

Tuija Aronen  
Metla, Punkaharjun tutkimusasema

### Johdanto

Agrobakteerit ovat yleisiä maabakteereita. Suurin osa agrobakteerilajeista elää hajottamalla kuollutta eloperäistä ainesta, mutta joukossa on myös kasvipatogeenieja: *Agrobacterium tumefaciens* ja *A. rubi* -lajit aiheuttavat aitosyöpää, joka ilmenee tavallisimmin äkämien muodostumisena juurenniskaan, ja *A. rhizogenes* puolestaan saa aikaan epänormaalia juurten kasvua infektiokohdasta. Sairastuneiden kasvien kasvu voi hidastua, ja ne kärsivät usein tavallista herkemmin ankarista ympäristöoloista (Agrios 1988). Metsämaista eristetyt agrobakteerikannat ovat yleensä harmittomia (Bell & Ramey 1990), eikä agrobakteerien aiheuttamilla taudeilla olekaan merkitystä käytännön metsätaloudelle. Ainoastaan taimitarhajoissa agrobakteerit ovat aiheuttaneet vakavia tautiepidemioita, ja silloinkin lähinnä nopeakasvuisissa lehtipuissa, kuten poppeleissa (Rowan ym. 1972, Zhang ym. 1988, Nesme ym. 1990) ja eukalyptuksissa (Herrera Autter 1964, Jindal & Bhardwaj 1986). Suomessa aitosyöpää on tavattu puista luonnossa vain raidalla (Erkamo & Erkamo 1974).

Agrobakteerien taudinaiheuttamismekanismi perustuu niiden luontaiseen kykyyn siirtää osa plasmidi-DNA:ssaan olevista geneistä osaksi isäntäkasvin perintöainesta, mitä ominaisuutta tutkijat ovat osanneet käyttää hyväkseen 1980-luvun alkupuolelta lähtien. Käytettäessä agrobakteeria geeninsiirtovektorina korvataan sen tavallisesti siirtämä DNA, ns. T-DNA, halutuilla geneeillä säilyttäen vain T-DNA:n reuna-alueet. T-DNA:n reuna-alueiden lisäksi geeninsiirtoon tarvitaan virulenssi-genejä, jotka sijaitsevat samassa Ti- tai Ri-plasmidissa kuin alkuperäinen T-DNA:kin.

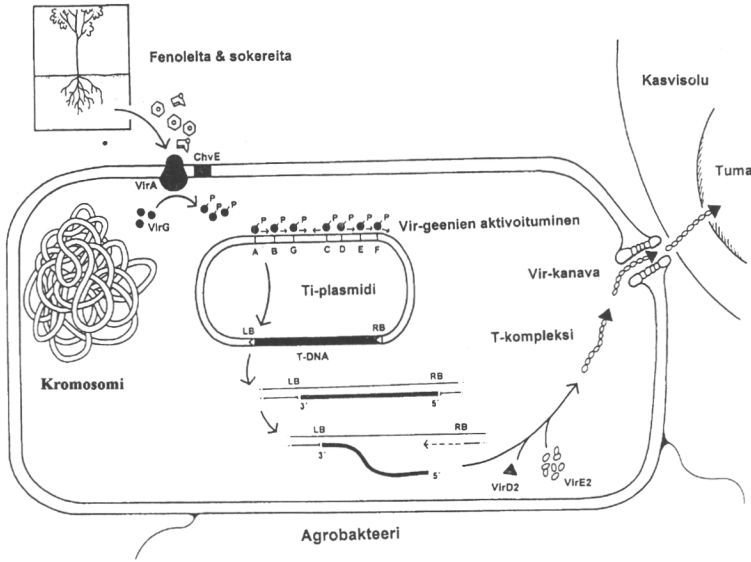
Nykyisin agrobakteeri-välitteinen geeninsiirto on rutiinia monilla kaksisirkkiskasveilla. Metsäpuista agrobakteerien avulla on transformoitu eniten eri poppelilajeja, joihin on siirretty reportteri- ja herbisidinkestävyysgenejä (Fillatti ym. 1987,

Pythoud ym. 1987, De Block 1990, Brasileiro ym. 1991, - 1992, Leple ym. 1992, Devillard 1992). Havupuut eivät ole agrobakteerien luontaisia isäntäkasveja, mikä rajoittaa agrobakteerien käyttöä geeninsiirtovektoreina näillä lajeilla. Ainoa havupuun puu, josta on toistaiseksi onnistuttu tuottamaan siirtogeenisiä taimia agrobakteerivälitteisellä menetelmällä on euroopanlehtikuusi (Huang ym. 1991). Havupuilla toimivat geeninsiirtotekniikat ovatkin aktiivisen tutkimuksen ja kehittäelytyön kohteena laboratorioissa eri puolilla maailmaa. Metsäntutkimuslaitoksen Punkaharjun tutkimusasemalla on tutkittu agrobakteerien mahdollisuuksia toimia geeninsiirtovektoreina männynllä, sekä menetelmän käytännön sovellutuksena geneettisen varttamisen tekniikkaa - eli mäntypistokkaiden juurruttamista agrobakteerikäsittelyn avulla.

### **Agrobakteerien infektiomekanismi: geeninsiirrolla oma ekologinen lokero**

Agrobakteerien aiheuttamien kasvitautien oireet johtuvat bakteeriperäisen T-DNA:n geenien toiminnasta kasvisoluissa. T-DNA:ssa on kahdenlaisia geenejä: Hormonigeenit joko luovat uusia kasvihormonien biosynteesireittejä tai herkistävät solut kasvin omille hormoneille, niin että solunjakautumisten tuloksena infektiokohtaan muodostuu joko äkämäsolukkoa tai tiheäkarvaisia juuria. Opiinigeenit puolestaan ohjaavat uusien tyypipitoisten yhdisteiden, opiinien, synteesiä. Infektoituaan isäntäkasvin, eli siirettyään T-DNA:nsa geenit toimimaan osana kasvisolujen perimää, agrobakteerit elävät äkämäsolukon solunvälitiloissa ja pinnalla käyttäen siirtogeenisten kasvisolujen erittämiä opiineja hiilen, typen ja energian lähteenä (Agrios 1988, Clare 1990).

Agrobakteerit etsiytyvät luonnossa kasvien juuristoon juurieritteiden houkuttelemina (Shaw 1991), mutta kykenevät tavallisesti infektoimaan vain vahingoittuneita kasvinosia. Syynä tähän on ainakin osaksi se, että T-DNA:n siirto agrobakteerista kasvisoluun tapahtuu Ti-plasmidin virulenssi (*vir*-) geenien ohjaamana ja *vir*-geenit indusoituvat toimimaan haavoittuneiden kasvisolujen erittämien fenolien ja sokeiden vaikutuksesta. *Vir*-geeneillä on monenlaisia tehtäviä: Ne huolehtivat T-DNA:n irrotuksesta Ti-plasmidista, sen päällystämistä kuljetuskuntoon ns. T-kompleksiksi, ja siirtämisestä kasvisoluun ns. *vir*-kanavan kautta. *Vir*-geenien toimintaa säätelee kahden proteiinin muodostama systeemi, jossa bakteerin solukelmussa oleva *virA*-proteiini tunnistaa signaalimolekyylit ja fosforyloi solulimassa liikkuvan *virG*-proteiiniin. Fosforyloitunut *virG* kiinnittyy sitten *vir*-geenien säätelyalueille aktivoiden ne (Kuva 1) (Winans 1991, Zambryski 1992). Virulenssi-geenien toiminta on olennaista agrobakteerien geeninsiirtokyvyn kannalta, ja käytettäessä niitä geeninsiirtovektoreina *vir*-geenien indusoinnista huolehdiitainkin usein keinotekoisesti, esimerkiksi asetosyringonen avulla.



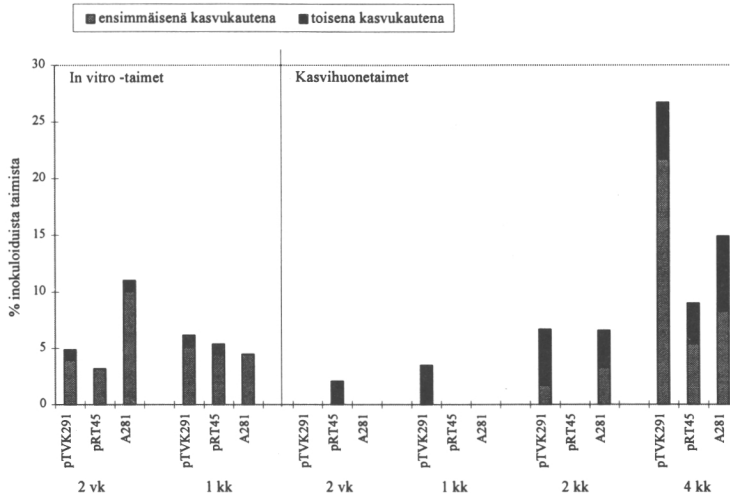
Kuva 1. Virulenssi (*vir*-) geenien toiminta agrobakteerin infektoidessa isäntäkasvinsa. *Vir*-geenit sijaitsevat samassa *Ti*-plasmidissa kuin agrobakteerista kasvisoluuun siirtyvä *T-DNA*. *VirA*- ja *virG*-proteiinit huolehtivat *vir*-geenien aktivoimisesta, ja muut *vir*-proteiinit puolestaan *T-DNA*:n irrotuksesta, päällystyksestä *T*-kompleksiksi ja kuljetuksesta kasvisolun tumaan.

### Kykeneekö agrobakteeri infektoimaan mäntyä ?

Agrobakteerien tiedetään infektoivan havupuita luonnossa erittäin huonosti. Laboratorio-olosuhteissa on kuitenkin onnistuttu tuottamaan äkämäsolukkoja mm. moniin kuusi- (Ellis ym. 1989) ja mäntylajeihin (Morris ym. 1989, Stomp ym. 1990). Pun-kaharjun tutkimusasemalla on testattu eri agrobakteerikantojen kykyä infektoida erikäisiä mäntynntaimia (*Pinus sylvestris* L.) sekä kasvihuone- että *in vitro* -oloissa. Bakterikantoina käytettiin villityypin *A. tumefaciens*-kantaa A281, sekä samaa kantaa, johon on lisätty joko ylimääräisiä *vir*-geenejä (pTVK291) tai reportterigeenejä (pRT45). Kokeet tehtiin haavoittamalla taimien vartta bakteeripesäkkeeseen kastetulla veitsellä, ja äkämien muodostuminen havainnoitiin parin viikon välein.

Inokulaatiokokeiden tulosten perusteella (Kuva 2) voidaan sanoa, että agrobakteerien kyky infektoida mäntyä on heikko. Parhaat tulokset saavutettiin 4 kk:n ikäisillä kasvihuonetaimilla ja supervirulentilla pTVK291-bakteerikannalla, mutta tässäkin tapauksessa vain reilut 20 % taimista onnistuttiin saastuttamaan. Äkämien muodostuminen kasvihuonetaimiin oli lisäksi hyvin hidasta - silmin havaittavien äkämien kasvuun saattoi kulua 4-6 kuukautta. *In vitro* -oloissa äkämät olivat havaittavissa jo 1-2 kuukauden kuluttua saastutuksesta, ja onnistumisprosentitkin olivat parempia kuin samanikäisillä kasvihuonetaimilla. Merkillepantavaa oli myös se,

että osa taimista kehitti äkämän vasta toisena kasvukautenaan, yli vuoden kuluttua alkuperäisestä inokulaatiosta. Näissä tapauksissa infektio lienee tapahtunut jo pian saastutuksen jälkeen, mutta siirtogeeniset solut ovat alkaneet jakautua vasta myöhemmin, ehkä liittyen kasvin hormonaaliseen tilaan. Mäntyäkämät olivat pieniä, ja useimmiten kiinnittyneet varteen "kaulan" välityksellä. Rakenne lienee seurausta siitä, että vain muutamat solut ovat alun perin transformoituneet ja ryhtyneet bakteeriperäisten geenien vaikutuksesta jakautumaan.



Kuva 2. Äkämien muodostuminen eri-ikäisiin männyn *in vitro*- ja kasvihuonetaimiin agrobakteeri-inokulaatioiden jälkeen. Saastutettujen taimien ikä vaihteli 2vk - 4 kk ( $n=450$  *in vitro*-ikäluokkaa kohden, ja  $n=240$  kasvihuonetaimien ikäluokkaa kohden), ja käytetyt bakteerikannat olivat A281, pTVK291 ja pRT45.

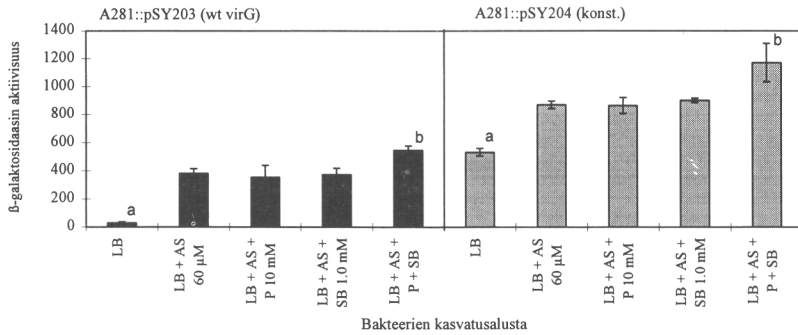
### Männyn kemiallinen puolustus ja sen vaikutus agrobakteerien infektiokykyyn

Mänty puolustautuu mikrobien ja hyönteisten hyökkäyksiä vastaan erittämällä mm. erilaisia fenoleita, pihkahappoja ja muita terpeeniyhdisteitä. Agrobakteeri-infektioiden kannalta mielenkiintoisia yhdisteitä ovat stilbeenit ja eräät monoterpeenit. Stilbeenit ovat fenoliyhdisteisiin kuuluvat ryhmä, jolla tiedetään olevan antimikrobiaalisia ominaisuuksia. Pinosylviini on tyypillinen männynssä esiintyvä stilbeeni (Sjöström 1993). Haavoittaminen, esimerkiksi agrobakteeri-inokulaatioita tehtäessä, vaikuttaa puolestaan suoraan erilaisten terpeeniyhdisteiden määrään männynissä: pihkahappojen kokonaismäärä lisääntyy (Gref & Ericsson 1985), ja monoterpeeneistä erityisesti  $\alpha$ - ja  $\beta$ -pineenin määrä moninkertaistuu nopeasti (Marpeau ym. 1989). Yhtenä syynä huonoihin inokulaatiotuloksiin männynllä saattavatkin olla juuri nämä kemialliset puolustusaineet, mitä ryhdyttiin selvittämään käyttäen esimerkkinä stilbeeniä ja  $\alpha$ -pineeniä.

Stilbeenin ja  $\alpha$ -pineenin vaikutusta agrobakteerien infektiokyvylle tutkittiin sekä *vir*-geenien induktion ja sitä seuraavien geeninsiirtotapahtumien aikana. *Vir*-induktiokokeessa käytettiin agrobakteerikantoja, jotka sisältävät *virB*-geenin säätelyalueen yhdistettynä reportterigeeni  $\beta$ -galaktosidaasiin (*lacZ*), niin että *vir*-geenien aktivoitumista on helppo seurata. *VirB::lacZ*-fuusion lisäksi näissä kannoissa oli mukana myös joko tavallinen, villityyppinen *virG* tai jatkuvatoiminen mutantti-*virG*, joka aktivoi muut *vir*-geenit *virA*-proteiinista riippumatta. Bakteereita kasvatettiin liemissä, joissa oli asetosyringonea *vir*-induktion aikaansaamiseksi, ja lisäksi joko stilbeeniä, pineeniä tai molempia, ja mitattiin *lacZ*-reportterigeenin aktiivisuutta. Aineiden vaikutusta *vir*-induktion jälkeisiin tapahtumiin testattiin inokuloimalla alttiita puuvartisia isäntäkasveja, koivuntaimia, agrobakteerikannoilla A281 ja pTVK291, joita oli kasvatettu asetosyringonea sisältävillä alustoilla *vir*-induktion varmistamiseksi. Inokulaatioiden jälkeen haavoituskohtia sumutettiin varovasti päivittäin pineenillä, stilbeenillä tai näiden seoksella kuukauden ajan, ja verrattiin äkämänmuodostumisprosentteja sumuttamattomiin taimiin.

Pineeni ja stilbeeni eivät vähentäneet *vir*-induktiota (Kuva 3): Ilman *vir*-indusoria kasvatetuissa villityypin bakteereissa *lacZ*-reportterigeenin aktiivisuus oli alhainen, mutta nousi asetosyringonen vaikutuksesta. Jatkuvatomisen *virG*-geenin sisältävässä bakteerikannassa *lacZ*-aktiivisuus oli melko korkea ilman *vir*-indusorin lisäystäkin, ja asetosyringone tehosti *vir*-induktiota edelleen. Erikseen kasvatusliuokseen lisättyinä pineeni ja stilbeeni eivät merkitsevästi vaikuttaneet asetosyringonella aikaansaatuun aktiivisuuteen, mutta yhdessä käytettyinä ne lisäsivät reportterigeenin toimintaa. Näyttääkin siltä, ettei agrobakteerien heikkoa kykyä infektoida mäntyä voida selittää ainakaan nyt testattujen puolustusaineiden vaikutuksilla *vir*-induktioon.

Pineenillä ja stilbeenillä oli vaikutusta myös *vir*-induktion jälkeisiin tapahtumiin. Kontrollikäsittelyssä A281-kannalla saastutetuista koivuntaimista 92 % muodosti äkämän, ja pTVK291-kannalla inokuloituista 79 %. Pineeni- tai stilbeenisumutus vähensi äkämän muodostaneiden taimien osuuden A281-kannalla 41-66 %:iin, mutta supervirulentilla pTVK291-kannalla prosentit laskivat vain hiukan, eli 67-79 %:iin. Ylimääräisiä *vir*-geenejä sisältävällä pTVK291-kannalla saadut tulokset viittaavat siihen, että männyn puolustusaineilla voisi olla vaikutusta suoraan T-DNA:n siirtotapahtumiin. Bakteerikannan pTVK291 oletetaan tuottavan normaalia suurempia määriä eri *vir*-proteiineja, mikä voi kumota pineenin ja stilbeenin T-DNA:n siirtoa haittaavan vaikutuksen. Toisaalta kyse voi olla myös siitä, että vaikeivat aineet estäisikään T-DNA:n siirtoa, ne saattavat ehkäistä siirtogeenisten solujen jakautumista ja näkyvän äkämän kehittymistä.



Kuva 3. Pineenin ja stilbeenin vaikutus agrobakteerien vir-geenien induktioon. Kokeessa käytettiin sekä villityyppisen virG- että jatkuvatoimisen mutanti-virG-geenin sisältäviä bakteerikantoja, A281::pSY203 ja A281::pSY204, joissa lisäksi oli virB::lacZ-fuusio. Bakteereita kasvatettiin LB-liemessä, johon oli lisätty asetosyringonen (AS) lisäksi joko pineeniä (P), stilbeenä (SB) tai molempia, ja mitattiin lacZ-aktiivisuus. Molemmissa bakteerikannoissa reporterigeenin aktiivisuus oli merkitsevästi ( $p < 0.05$ ) alhaisempi ilman vir-indusoria (a), ja nousi asetosyringonen vaikutuksesta. Merkitsevä ( $p < 0.05$ ) lisäys lacZ-aktiivisuudessa havaittiin myös lisättäessä sekä pineeniä että stilbeenä kasvatusalustaan (b).

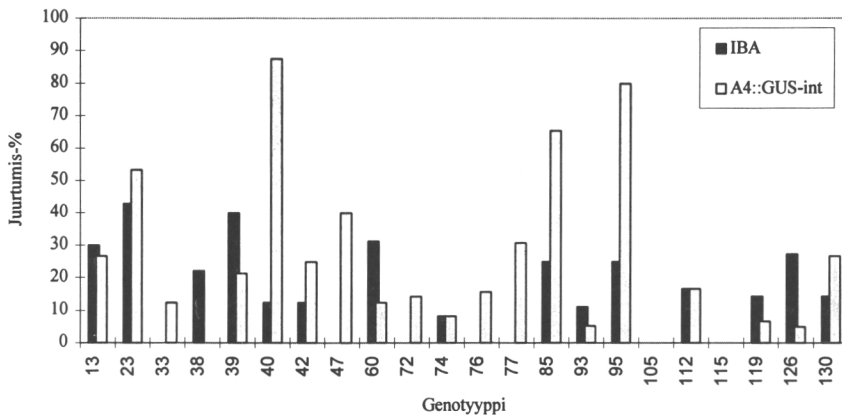
### Mäntypistokkaiden juurrutus agrobakteerien avulla - geeninsiirroista käytännön sovellutus ?

Eräs agrobakteeri-välitteisen geeninsiirron sovellutuksista on geneettisen varttamisen tekniikka - pistokkaiden tai *in vitro*-versojen juurruttaminen *Agrobacterium rhizogenes* -kantojen avulla. Menetelmässä pistokkaan tai verson tyvi saastutetaan bakteerilla, jolloin muodostuvat juuret ovat todennäköisesti siirtogeenisiä. Tekniikkaa on menestyksellisesti käytetty mm. poppelilla (Charest ym. 1992) ja useilla hedelmäpuulajeilla (Lambert ja Tepfer 1991, Rugini 1992). Jo juurtuneiden manteli- ja oliivipuiden juuriston käsittely agrobakteerilla puolestaan lisäsi puiden kasvua ja satoa, minkä arveltiin johtuvan syntyneiden lisäjuurten aiheuttamasta hyvästä kuivuudenkestävyydestä (Strobel & Nachmias 1985, Strobel ym. 1988). Juurtumista on onnistuttu parantamaan agrobakteerikäsittelyllä myös hasselpähkinällä (Basil ym. 1991), lehtikuusella ja erällä mäntylajeilla (McAfee ym. 1993), mutta näissä tapauksissa syntyneiden juurten ei ole voitu osoittaa olevan siirtogeenisiä.

Punkaharjun tutkimusasemalla on tutkittu *A. rhizogenes* -käsittelyn vaikutusta mäntypistokkaiden juurtumiseen. Kasvimateriaalina työssä käytettiin FL Maija Saloselta Metsänjalostussäätiöltä saatuja pistokkaita, jotka oli tuotettu ruiskutta-

malla kaksivuotiaita emotaimia sytokiniinilla. Tutkimuksessa oli mukana kaikkiaan 22 mäntygenotyyppiä. Pistokkaita pidettiin ensin 20 tuntia auksiiniliuoksessa (IBA 100 mg/l), minkä jälkeen niiden tyveen leikattiin tuore haavapinta, joka kastettiin bakteeripesäkkeeseen ennen pistämistä. Kontrollipistokkaat saivat pelkän IBA-käsittelyn. Bakteerikantana kokeissa oli A4, jossa lisäksi oli reportterigeeni  $\beta$ -glukuronidaasi (GUS) intronin sisältävänä versiona.

Agrobakteerikäsittely paransi pistokkaiden juurtumista jonkin verran: Pelkällä IBA-käsittelyllä pistokkaista juurtui keskimäärin 16 ( $\pm$  2.9) %, kun taas bakteerisaastutuksen jälkeen juurtuneiden osuus oli 24 ( $\pm$ 5.1) %. Merkitsevästi kasvoi sellaisten pistokkaiden osuus, jotka eivät kasvattaneet juuria, mutta pysyivät hengissä muodostaen myös usein kallusta pistokkaan tyvelle. IBA-käsittelyssä näitä pistokkaita oli keskimäärin 23 ( $\pm$ 4.9) % ja bakteerikäsittelyssä 45 ( $\pm$ 5.9) %. Eri mäntygenotyyppien välillä oli huomattavia eroja juurtumisessa (Kuva 4): Agrobakteerisaastutuksen tuloksena juurtui parhaimmillaan 80-90 % pistokkaista, kun taas IBA-käsittelyllä saavutettiin parhaimmillakin genotyypeillä vain noin 40 % juurtumistulos. Toisaalta on huomattava, että joukossa oli myös genotyyppejä, joiden juurtumista bakteerisaastutus heikensi.



Kuva 4. Mäntygenotyypin vaikutus mikropistokkaiden juurtumiseen pelkän auksiinikäsittelyn (IBA) ja agrobakteerisaastutuksen (A4::GUS-int) jälkeen. Juurrutettavien pistokkaiden lukumäärä genotyyppejä kohden vaihteli 19-48 kpl.

Opiinialyysien ja histokemiallisen GUS-testin perusteella bakteerisaastutuksen tuloksena muodostuneet juuret eivät ole siirtogeenisiä. Bakteerikäsittelyn juurtumista parantava vaikutus voikin johtua T-DNA:n auksiinigeenien transientista, hetkellisestä toiminnasta kasvisoluissa juurten muodostumisen alkuketkinä (van

Wordragen ym. 1992) tai siitä, että siirtogeeniset solut stimuloivat juurten muodostusta jakautumatta kuitenkaan itse. Lisäksi agrobakteerit voivat edistää pistokkaiden juurtumista muokkaamalla kasvualustaa joko parantamalla ravinteiden liukoisuutta (Leyval ja Berthelin 1989) tai erittämällä itse kasvihormoneja, kuten auksiineja (Kutáček ja Rovenská 1991).

Mäntypistokkaiden juurtumista voidaan tulosten perusteella parantaa *A. rhizogenes*-käsittelyllä, paljolti kuitenkin puun genotyypistä riippuen. Käytännön sovellutusten kannalta saattaa olla yksinomaan hyvä asia, jos syntyneet juuret eivät kuitenkaan ole siirtogeenisiä. Käsittelyn tehoa voitaneekin vielä parantaa tutkimalla eri agrobakteerikantoja mahdollisimman infektiokykyisen kannan löytämiseksi. Lisäksi on mielenkiintoista nähdä, voidaanko männyn kemiallinen puolustus agrobakteerinfektioita vastaan kiertää esimerkiksi käyttämällä juurruttamiseen bakteerikantoja, joiden virulenssigeenejä on muokattu.

### Kirjallisuus

- Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. Academic Press, London. s. 510-565.
- Bassil, N., Proebsting, W., Moore, L. & Lightfoot, D. 1991. Propagation of hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. HortScience 26:1058-1060.
- Bell, C.R. & Ramey, W.D. 1990. Hybrid biovars of *Agrobacterium* species isolated from conifer roots. Can. J. Microb. 37:34-41.
- Brasileiro, A., Leple, J.-C., Muzzin, J., Ounnoughi, D., Michel, M.-F., Jouanin, L. 1991. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. Plant Mol. Biol. 17:441-452.
- Tourneur, C., Leple, J.-C., Combes, V. & Jouanin, L. 1992. Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. Transgenic Research 1:133-141.
- Charest, P., Stewart, D. & Budicky, P. 1992. Root induction in hybrid poplar by *Agrobacterium* genetic transformation. Can. J. For. Res. 22:1832-1837.
- Clare, B. 1990. *Agrobacterium* in plant disease, biological disease control and plant genetic engineering. Sci. Progress Oxford 74:1-13.
- De Block, M. 1990. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. Plant Physiol. 93:1110-1116.
- Devillard, C. 1992. Genetic transformation of aspen (*Populus tremula* x *Populus alba*) by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of plants tolerant to herbicide. C.R. Acad. Sci. Ser. III-Vie 314:291-298.
- Ellis, D., Roberts, D., Sutton, B., Lazaroff, W., Webb, D. & Flinn, B. 1989. Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 8:16-20.
- Erkamo, M. & Erkamo, V. 1974. Raidan bakteeriäkämistä (*Agrobacterium tumefaciens*) ja niiden levinnäisyydestä Suomessa. Memoranda Soc. Fauna Flora Fennica 50:31-43.
- Fillatti, J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. & Comai, L. 1987. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206:192-199.

- Gref, R. & Ericsson, A. 1985. Wound-induced changes of resin acid concentrations in living bark of Scots pine seedlings. *Can. J. For. Res.* 15:92-96.
- Herrera Autter, S. 1964. Siete enfermedades y plagas de los viveros forestales y del Pino insignie. Boletín N:º 15. Instituto Forestal Latino Americano. s. 3-39.
- Huang, Y., Diner, A. & Karnosky, D. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P:210-207.
- Jindal, K. & Bhardwaj, L. 1986. Occurrence of grown gall on *Eucalyptus tereticornis* Sm. in India. *Indian Forester* 112:1121.
- Lambert, C. & Tepfer, D. 1991. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting. *Bio/Technology* 9:80-83.
- Leple, J., Brasileiro, A., Michel, M., Delmotte, F & Jouanin, I. 1992. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep.* 11:137-141.
- Leyval, C. & Berthelin, J. 1989. Influence of acid-producing *Agrobacterium* and *Laccaria laccata* on pine and beech growth, nutrient uptake and exudation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 28:313-319.
- Marpeau, A., Walter, J., Laynay, J., Charon, J., Baradat, P. & Gleizes, M. 1989. Effects of wounds on the terpene content of twigs of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) II. Changes in the volatile terpene hydrocarbon composition. *Trees* 4:220-226.
- McAfee, B., White, E. Pelcher, L. & Lapp, M. 1993. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 34:53-62.
- Morris, J., Castle, L. & Morris R. 1989. Efficiency of different *Agrobacterium tumefaciens* strains in transformation of pinaceous gymnosperms. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 34:451-461.
- Nesme, X., Beneddra, T. & Collin, E. 1990. Importance du crown gall chez les hybrides *Populus tremula* L. x *P. alba* L. en pepiniere forestiere. *Agronomie* 10:581-588.
- Pythoud, F., Sinkar, V., Nester, E. & Gordon, M. 1987. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the *vir* region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar. *Bio/Technology* 5:1323-1327.
- Rowan, S., Filer, T. & Phelps W. 1972. Nursery diseases of southern hardwoods. Forest Pest Leaflet. Forest Service, US Department of Agriculture. s. 1-7.
- Rugini, E. 1992. Involvement of polyamines in auxin and *Agrobacterium rhizogenes* -induced rooting of fruit trees in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:532-536.
- Shaw, C. 1991. Swimming against the tide: Chemotaxis in *Agrobacterium*. *BioEssays* 13:25-29.
- Sjöström, E. 1993. Wood chemistry: fundamentals and applications. Academic Press, London. Sivut 90-113.
- Stomp, A-M., Loopstra, C., Chilton, W., Sederoff, R. & Moore, L. 1990. Extended host range of *Agrobacterium tumefaciens* in the genus *Pinus*. *Plant Physiol.* 92:1226-1232.
- Strobel, G. & Nachmias, A. 1985. *Agrobacterium rhizogenes* promotes the initial growth of bare root stock almond. *J. Gen. Microbiol.* 131:1245-1249.
- Nachmias, A. & Hess, W. 1988. Improvements in the growth and yield of olive trees by transformation with the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Can. J. Bot.* 66:2581-2585.

- Winans, S. 1991. An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds. *Mol. Microbiol.* 5:2345-2350.
- van Wordragen, M., Ouwerkerk, P. & Dons, H. 1992. *Agrobacterium rhizogenes* mediated induction of apparently untransformed roots and callus in chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:149-157.
- Zambryski, P. 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:465-490.
- Zhang, J., Zhou, J. & Xiang, W. 1988. Studies on the types of *Agrobacterium tumefaciens* from poplars in China and their sensitivity to agrocins. *Acta Microbiologica Sinica* 28:12-18.

Oksa, E. (toim.) 1995  
 Metsäntutkimus uusissa puissa:  
 monistusta ja molekyyilejä  
 Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Kukkimattomien koivujen kehittäminen kukintospesifisten geenien avulla**

Juha Lemmetyinen, Annakaisa Elo & Tuomas Sopanen  
 Joensuun Yliopisto, Biologian laitos

### **Miksi kukkimattomia koivuja tarvitaan?**

Geeninsiirtotekniikkojen kehittyminen on avannut kasvinjalostukselle aivan uusia mahdollisuuksia. Geeninsiirtojen avulla kohdekasviin voidaan siirtää täysin uusia ominaisuuksia tai muuttaa jokin olemassa oleva ominaisuus halutuksi. Perinteisestä risteytysjalostuksesta poiketen geeninsiirtojen avulla voidaan muuttaa täsmällisesti yksilön tiettyä ominaisuutta ja samalla säilyttää sen muut ominaisuusyhdistelmät ennallaan. Tämä on yksi geeninsiirtojen merkittävistä eduista esim. jalostettaessa metsäpuita, joilla mm. pitkä sukupolvenväli vaikeuttaa ja hidastaa jälkeläisvalintaa. Geeninsiirrot antavat mahdollisuuden esimerkiksi lisätä puiden taudin- ja kylmänkestävyyttä tai vaikuttaa puuaineksen ominaisuuksiin kuten ligniinipitoisuuteen tai jopa väriin. Suomessa tutkitaan parhaillaan mahdollisuuksia parantaa koivun hyönteis- ja sienitautiresistenssiä geeninsiirtojen avulla (professori Kim von Weissenbergin ryhmä) sekä kehitetään männylle soveltuvia geeninsiirtomenetelmiä (Aronen ym. 1994a ja 1994b).

Testattaessa ja myöhemmin mahdollisesti kasvatettaessa siirtogeenisiä puita on ensiarvoisen tärkeää estää vieraiden geenien leviäminen ympäröiviin luonnonpopulaatioihin, joissa uusilla, aikaisemmista huomattavastikin poikkeavilla ominaisuuksilla saattaa olla ennalta arvaamattomia vaikutuksia. Vaikka uudesta vuonna 1995 voimaan tulleesta geenitekniikkalaista ei vielä olekaan käytännön kokemuksia, on ilmeistä, että testausvaiheessa esimerkiksi kestävyysvaikuttavien siirtogeenien leviämistä siitepölyn tai siementen välityksellä ei tulla hyväksymään. Tästä syystä siirtogeenisten puiden testauksessa välttämättömät kenttäkokeet joudutaan lopettamaan ennen puiden kukkimista, eikä siirtogeenien vaikutuksia aikuisissa yksilöissä voida tutkia.

Ryhmämme eräänä päämääränä on mahdollistaa siirtogeenisten koivujen turvallinen testaus ja kasvatusta luonnossa estämällä niiden kukinta ja siten siementen ja siitepölyn muodostuminen. Tutkimuskohteeksi on valittu koivu, koska toisin kuin esimerkiksi kuusella ja männyllä, geeninsiirto- ja kloonausmenetelmät toimivat koivulla hyvin ja niiden käyttöä jalostuksessa ollaan jo tutkimassa. Koska puut kuluttavat kukkien ja siementen tekoon melkoisen määrän energiaa ja rakennusaineita, hidastaa kukkiminen niiden kasvua. Arviot kasvun vähenemisestä vaihtelevat puulajin ja mittaustavan mukaan 14-38 %:iin vuodessa (mm. Harper 1977 ja Strauss ym. 1995). Kukkimisen ja siementuotannon tarkka kokonaisvaikutus koivun puuaineksen tuottoon voidaan selvittää luotettavimmin vertaamalla samaa geneettistä alkuperää olevien kukkivien ja kukkimattomien puiden kasvua.

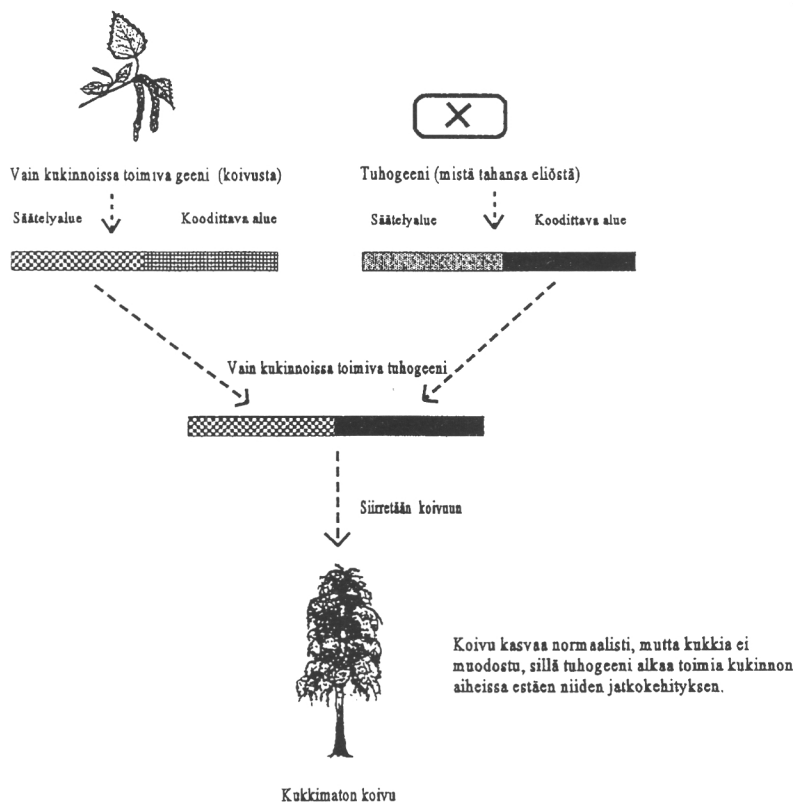
### **Miten koivun kukkiminen voidaan estää?**

Kukkiminen voidaan estää molekyylibiologisin menetelmin yhdistelmä-DNA-tekniikkaa soveltaen. Näin tuotettuja siirtogeenisiä kasveja voidaan lisätä kloonamalla. Periaatteessa paras menetelmä kukinnan estämiseksi olisi kukan kehitykselle välttämättömän geenin poistaminen tai sen rakenteen rikkominen. Menetelmää on käytetty mikro-organismeilla ja eläimillä, mutta tarvittavien tekniikoiden soveltamisesta kasveihin on vielä varsin vähän kokemusta. Halutun geenin ilmenemistä voidaan estää myös nk. antisense-RNA-tekniikan avulla. Parhaimmillaan geenin ilmeneminen voidaan tämän tekniikan avulla estää täysin, mutta usein voidaan havaita jonkin verran geenituotetta (mm. Cannon ym. 1990, van der Meer ym. 1992).

Toinen mahdollinen menetelmä kukkimisen estämiseksi on käyttää sytotoksiineihin perustuvaa tuhogeenikonstruktiota. Sytotoksiinit ovat entsyymejä, joiden synteesi solussa aiheuttaa sen kuoleman. Tuhogeenikonstruktiota voidaan tehdä liittämällä ainoastaan kohdesolukossa toimivan geenin säätelyalue sytotoksiinia koodittavaan rakennegeeniin. Säätelyalue aktivoituu kun kohdesolukko alkaa muodostua, jolloin solu alkaa tuottaa sytotoksiinia, joka aiheuttaa solun kuoleman. Kasveilla tähän tarkoitukseen käytettyjä sytotoksiineja ovat mm. eräät RNAsit ja erityisesti kurkkumätätoksiini A (DTA). Tällä menetelmällä onkin jo saatu aikaan esimerkiksi hede- ja emisteriilejä rapseja ja tupakoita (mm. Mariani ym. 1990, Goldman ym. 1994), sekä mm. lituruoho, jolta puuttuvat heteet ja emit (Thorsness ym. 1993).

Sopivan säätelyalueen löytämiseksi ryhmämme on eristämässä koivusta genejä, jotka toimivat ainoastaan koivun hede- ja emikukintojen kehityksen alkuvaiheessa, mutta eivät missään muissa solukoissa. Tavoitteena on irrottaa tällaisen geenin säätelyalue ja liittää se ohjaamaan tuhogeeniä. Näin saatu yhdistelmägeeni siirretään

koivuun *Agrobacterium*-välitteisesti. Kukintospesifisen säätelyalueen ohjaamana tuhogeeni toimisi ainoastaan muodostuvissa kukan aiheen soluissa. saaden aikaan näiden solujen kuoleman, jolloin kukkia ei muodostuisi (kuva 1).



Kuva 1. Koivusta eristetään kukintospesifisiä geenejä, joiden säätelyalueet liitetään ohjaamaan sytotoksiinia koodittavaa rakennegeeniä. Yhdistelmägeeni siirretään koivuun, jossa sytotoksiinin muodostuminen tuhoaa kehittyvien kukinnon aiheiden solut.

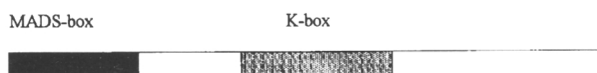
## Kukintospesifisten säätelyalueiden eristäminen

### a) Kukan kehityksen säätelystä mallikasveilla

Viime vuosien geneettisten ja molekyylibiologisten tutkimusten mukaan kukan kehitystä säätelevät mekanismit näyttävät geneettisesti erittäin tarkasti säädellyiltä ja hyvin samankaltaisilta eri kasvilajeissa. Kukinnan indusoituessa joko sisäisten tai ulkoisten tekijöiden vaikutuksesta muuntuu ensimmäisessä vaiheessa vegetatiivinen meristeemi kukintomeristeemiksi, tällöin lehtiasento ja haaroittuminen muuttuvat usein kukinnolle tyypillisiksi. Tämän jälkeen kehittyvät kukan aiheet ja niihin

edelleen kukan osat (verho- ja terälehdet, heteet ja emit) sisäkkäisiksi kehiksi järjestytyneinä. Kukan kehitys voidaan jakaa kahteen vaiheeseen: varhaiseen, jolloin kukkameristeemi ja kukan eri osien aiheet syntyvät ja myöhäiseen, jolloin kukat eri osat kehittyvät lopulliseen muotoonsa.

Kukan kehitystä ohjaavia geenejä on tutkittu erityisesti leijonankidalla (*Antirrhinum majus*, Schwarz-Sommer ym. 1990) ja lituruoholla (*Arabidopsis thaliana*, Bowman ym. 1991). On havaittu, että kukintomeristeemin muodostuminen aloittaa geenitoiminnan, jossa toisiaan seuraavat geenit aktivoituvat tarkasti tietyssä järjestyksessä ja tietyissä soluissa. Nämä hierarkkisesti aktivoituvat säätelygeenit tuottavat proteiineja, jotka säätelevät muiden geenien aktiivisuutta kehittyvässä kukassa (mm. Coen ja Meyerowitz 1991). Tämän geenien vuoropuhelun avulla jakautuvat meristeemisolut saavat tietoa sijainnistaan ja saavat aikaan ensiksi kukkameristeemien ja sitten kukan osien muodostumisen niiden oikeille paikoille. Useimmat näiden geenien koodittamista proteiineista näyttävät olevan rakenteeltaan samankaltaisia ja niille on yhteistä mm. erittäin hyvin säilynyt n. 57 aminohapon pituinen sekvenssi, nk. MADS-homologia-alue, puhutaankin MADS-geeniperheestä (kuva 2., mm. Coen ja Meyerowitz 1991). Kaikista tutkituista kasvilajeista on löydetty useita tämän geeniperheen jäseniä, joista suurin osa näyttää osallistuvan kukan kehitykseen. Puuvartisista lajeista MADS-geenejä on löydetty tähän mennessä mm. kuuselta, poppelilta ja eukalyptukselta (Tandre ym. 1995 sekä Strauss ym. 1995).

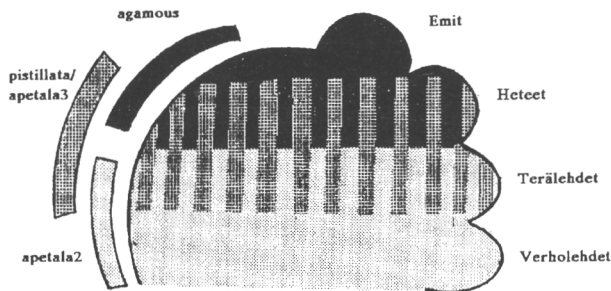


Kuva 2. MADS-proteiinin perusrakenne. Kuvaan on merkitty n. 57 aminohapon pituinen hyvin konservoitu MADS-alue sekä kasveista löydettyissä MADS-proteiineissa oleva n. 65 aminohapon mittainen vähemmän konservoitu nk. K-box-alue. Tyypillisen MADS-proteiinin kokonaispituus on kasveilla noin 250 aminohappoa.

Pyrittäessä tuottamaan täysin steriilejä puita ensisijaisen käyttökelpoisia ovat kukan kehityksen varhaisvaiheessa toimivat geenit. Tähän mennessä mallikasveista on kloonattu ja karakterisoitu useita kukan varhaisvaiheessa toimivia geenejä (Meeks-Wagner 1993). Varhaisimmat näistä ovat keskenään homologiset lituruohon *LEAFY*- ja leijonankidan *FLO*-geenit, jotka eivät ole MADS-geeniperheen jäseniä (Weigel ym. 1992 ja Coen ym. 1990). Nämä geenit ovat välttämättömiä kukan aiheen kehitykselle ja ilmeisesti säätelevät muiden kukan kehitystä ohjaavien geenien toimintaa. Myös lituruohon *API*- ja leijonankidan *SQUA*-geenit ovat tarpeen

kukka-aiheiden muodostuksessa. Ilman näiden geenien aktivaatiota kukkia ei muodostu (Hujser ym. 1992 sekä Mandel ym. 1992).

Varsinaisia kukan eri osien erilaistumista sääteleviä nk. homeoottisia geenejä tunnetaan myös useita. Esimerkiksi lituruoholla on havaittu vähintään neljän eri geenin (*APETALA2*, *APETALA3/PISTILLATA* ja *AGAMOUS*) toiminnan olevan välttämätöntä, jotta kukan eri osat muodostuvat normaalisti. Jokainen näistä geneistä toimii kahdella vierekkäisellä kehällä ja aktiivisina nämä geenit saavat yhdessä aikaan oikean kukan osan muodostumisen oikeaan paikkaan (mm. Bowman ym.1991 ja Coen & Meyerowitz 1991). Esimerkiksi verholehdet muodostuvat *APETALA 2*:n toimiessa yksinään, terälehtien muodostumiseen tarvitaan *APETALA2*:n lisäksi *APETALA3/PISTILLATA* -geenien aktiivisuus, heteiden muodostumiseen tarvitaan sekä *APETALA3/PISTILLATA* että *AGAMOUS*-geenien aktiivisuus ja emit erilaistuvat kun *AGAMOUS* toimii kehällä yksin (kuva 3). Kaikkien näiden geenien aktiivisuuden puuttuessa kukan eri osien paikalle muodostuu lehtiä. Vastaavia geenejä on löydetty myös useilta muilta kasvilajeilta (mm. Schmidt ym. 1993 ja Pnueli ym. 1991, Tandre ym. 1995). Kukan muodostukseen osallistuu em. lisäksi myös monia muita geenejä, esimerkiksi petunialta löydetty *FBP2* näyttää toimivan edellä mainituista poiketen kolmella eri kehällä: terälehdissä, heteissä ja emeissä (Angenent ym. 1992). Vastaava geeni on löydetty mm. kuuselta (*DALI*, Tandre ym. 1995).



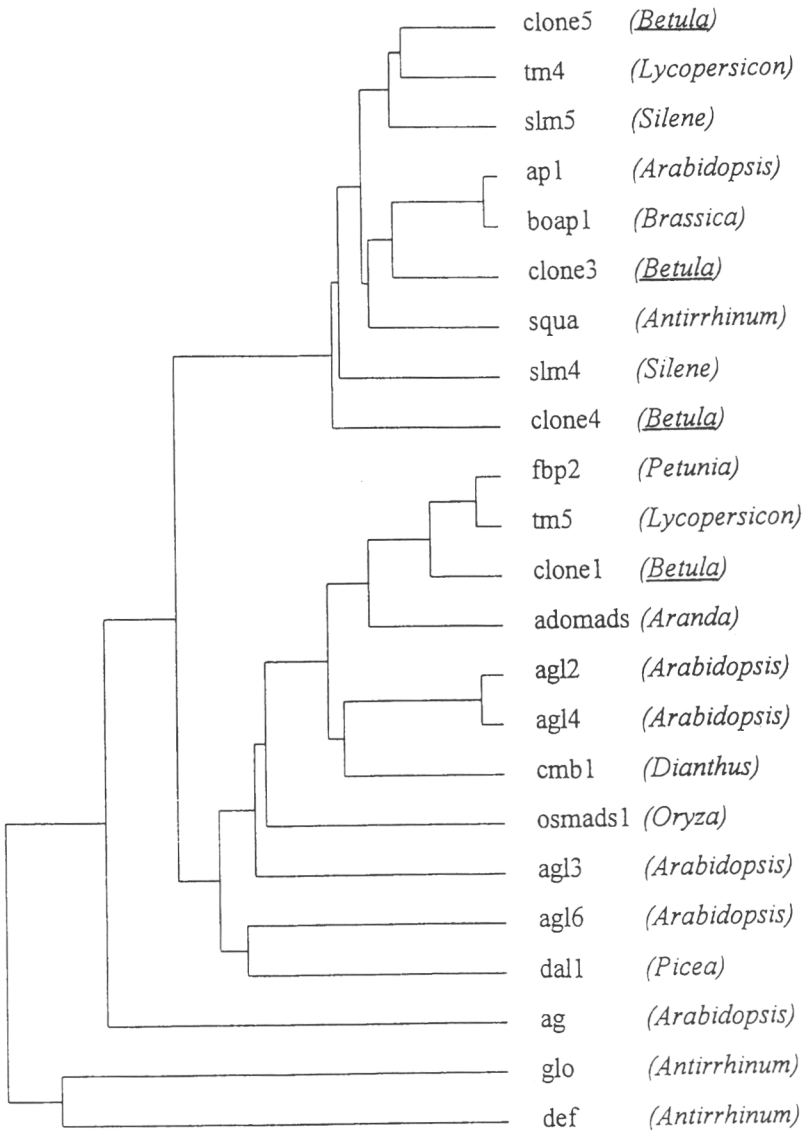
Kuva 3. Malli kukan osien erilaistumista säätelevien geenien toiminnasta lituruoholla. Kukan osien muodostukseen tarvitaan ainakin neljä geeniä, joista kukin vaikuttaa kahdella vierekkäisellä kehällä.

## b) MADS-geenien eristäminen koivusta

Tällä hetkellä ryhmämme on eristämässä rauduskoivun kukinnoista geenejä, joiden säätelyalueet toimivat vain kukinnoissa ja jotka siten soveltuisivat edellämainittujen tuho geenikonstruktioiden tekemiseen. Tutkimuksessa on käytetty apuna tunnettujen MADS-geenien hyvin säilyneitä DNA-sekvenssejä. Näiden sekvenssien perusteella suunniteltiin alukkeet, joiden avulla monistettiin kehittyvistä koivun kukinnoista eristetystä mRNA:sta RT-PCR:n (reverse transcription PCR) avulla 700-900 nukleotidin mittaisia cDNA-klooneja, joista osa sekvenssoitiin. Kolme kloonia osoittautui sekvenssivertailuissa keskenään samankaltaisiksi. Ne muistuttivat suuresti mm. leijonankidan *SQUA* ja lituruohon *API*-geenejä (kloonit 3,4 ja 5, kuva 4). Yksi klooneista (klooni 1) muistutti mm. petunian *FBP2*:ta (kuva 4). Näiden osittaisten cDNA-kloonien avulla on nyt eristetty vastaavat täysimittaiset cDNA-kloonit kehittyvistä emikukinnoista tehdyistä cDNA-kirjastoista.

Eristettyjä cDNA-klooneja vastaavien geenien ilmentymistä on tutkittu Northern-hybridisaatioiden avulla. Tulosten mukaan kahta kloonia (kloonit 1 ja 5) vastaavat geenit näyttäisivät ilmentyvän vain kukinnoissa. Sen sijaan kaksi geeniä (klooni 3 ja 4) näyttäisivät ilmentyvän kukintojen lisäksi heikosti myös kasvullisissa osissa. Kukinnon muodostumisen estävien geenikonstruktioiden laatimiseen valitaan kuitenkin vain täysin kukintospesifisiä geenejä.

Koivun kukkaspesifisten geenien tutkimuksen tekevät erityisen mielenkiintoiseksi myös useat koivun kukkien ominaispiirteet. Useimmista tutkituista lajeista poiketen koivun kukat ovat yksineuvoisia, ts. heteet ja emit kehittyvät erillisiin kukintoihin. Koivun tuulipölytteisten kukkien rakenne on useisiin muihin kasvilajeihin verrattuna hyvin pelkistynyt: hedekukka muodostuu kolmiosisaisen norkkosuomun alla olevista heteistä ja emikukka suojasuomun alla olevasta sikiäimestä luotteineen (Lagerberg ym. 1938). Varsinaisia verho- tai terälehtiä tai selvästi erottuvia kehä ei koivulla ole (Mäkinen ym. 1964). Kiinnostavaa onkin selvittää, missä koivun kukan osissa vaikuttavat sellaiset geenit, joiden homologien funktio on tarkkaan selvitetty muilla lajeilla ja mitkä geenit saavat aikaan yksineuvoisuuden. Tutkimuksen eräänä tavoitteena on seurata myös kukintaa ohjaavien geenien toimintaa koivun kukinnoissa niiden koko kehityksen ajan, joka kestää lähes vuoden.



Kuva 4. Eri kasvilajien MADS-proteiinien aminohappojärjestyksen vertailun perusteella laadittu dendrogrammi. Vertailussa keskenään samankaltaiset proteiinit ryhmittyvät lähekkäin. Vertailussa koivun lisäksi olevien lajien proteiinisekvenssit on saatu kansainvälisistä sekvenssitietokannoista.

## Jatkotutkimukset

Jatkossa pyrimme eristämään kukintopesifisiä cDNA-klooneja vastaavien geenien säätelyalueet, minkä jälkeen niiden toimintaa testataan esimerkiksi säätelyalue-GUS-reportterigeenikonstruktioiden avulla. Aluksi käytetään geenipysyviä ohimenevän ekspression selvittämiseen koivun eri osissa, myöhemmin tehdään pysyviä *Agrobacterium*-välitteisiä transformaatioita. Tällä varmistetaan, että alkuperäisestä yhteydestä irroitettunakin säätelyalue toimii tehokkaasti vain kehittyvässä kukassa muttei kasvullisissa osissa. Näiden kokeiden avulla saadaan myös perustietoa koivun kukintaan vaikuttavien geenien säätelystä ja toiminnasta. Vasta säätelyalueiden huolellisen karakterisoinnin ja testausten jälkeen voidaan aloittaa tuho-geenikonstruktioiden siirtäminen koivuun.

Koivut kukkivat luonnollisissa olosuhteissa vasta 5-10 vuoden ikäisinä, mikä hidastaa huomattavasti geenikonstruktioiden testausta luonnossa kasvavissa koivussa. Saksassa on kuitenkin risteyttämällä kehitetty varhain kukkivia rauduskoivuja (Stern 1961). Olemme kasvattaneet näiden koivujen siemenistä taimia, joista 11 varhaimin kukkivaa on mikrolisätty. Pyrimme edelleen nopeuttamaan näiden koivukloonien kukkimista kasvattamalla niitä korkeassa hiilidioksidipitoisuudessa (1500 ppm) ja jatkuvassa voimakkaassa valossa (>10 000 luksia, Altonen 1976). Tässä nk. vauhtikukituksessa varhaisimmat kloonit kukkivat keskimäärin 4-6 kk:n kuluttua juurruttamisesta alle metrin mittaisina. Alustavien tulosten perusteella nämä nk. minikoivukloonit toimivat hyvin myös geeninsiirroissa, joten ne näyttävät soveltuvan erinomaisesti geenikonstruktioiden testaukseen.

Tämän hetken molekyylibiologisen tietämyksen ja ryhmämme saamien tulosten perusteella kukkimattomien koivujen aikaansaamiselle on olemassa hyvät edellytykset: olemme identifioineet koivusta jo kaksi todennäköisesti vain kukinnoissa ilmenevää geeniä, joiden säätelyalueita voidaan nyt ryhtyä eristämään. Geeninsiirrot koivuun onnistuvat hyvin ja nuorena kukkivilla minikoivuilla voidaan varsin nopeasti testata erilaisia tuho-geenikonstrukteja.

## Kirjallisuus

- Altonen, M. 1976. Koivuun kukkasilmut jo 2 1/2 kuukautta kylvöstä. Metsälehti 18/6.5.1976.
- Angenent, G.C., Busscher, M., Franken, J., Mol, J.N.M. & van Tunen, A.J. 1992. Differential expression of MADS box genes in wild type and mutant petunia flowers. *Plant Cell* 4:983-993.

- Aronen, T., Hohtola, A., Laukkanen, H. & Häggman, H. 1994a. Seasonal changes in the transient expression of 35 S CaMV-GUS gene construct introduced into Scots pine buds. *Tree Physiology* 15:65-70.
- , Häggman, H. & Hohtola, A. 1994b. Transient  $\beta$ -glucuronidase expression in Scots pine tissues derived from mature trees. *Can. J. For. Res.* 24:2006-2011.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. & Meyerowitz, E.M. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112:1-20.
- Cannon, M., Platz, J., O'Leary, M., Sookdeo, C. & Cannon, K. 1990. Organ-specific modulation of gene expression in transgenic plants using antisense RNA. *Plant Mol. Biol.* 15:39-47.
- Coen, E.S. & Meyerowitz, E.M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31-37.
- , Romero, J., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G. & Carpenter, R. 1990. *floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63:1311-1322.
- Goldman, M.H.S., Goldberg, R.B. & Mariani, C. 1994. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J.* 13:2976-2984.
- Harper, J.L. 1977. Population biology of plants. Academic Press. London etc. 892 s.
- Huijser, P., Klein, J., Lönnig, W-E., Meijer, H., Saedler, H. & Sommer, H. 1992. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 11:1239-1249.
- Lagerberg, T., Linkola, K. & Väänänen, H. 1938. Pohjolan luonnonkasvit. WSOY.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. & Yanofsky, M.F. 1992. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA 1*. *Nature* 360:273-277.
- Mariani, C., Beuckeleer, M.D., Truettner, J., Leemans, J. & Goldberg, R.B. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.
- Meeks-Wagner, R. 1993: Gene expression in the Early Floral Meristem. *Plant Cell* 5:1167-1174.
- Mäkinen, Y., Laine, U. & Kalela, A. (toim.) 1964. Pohjolan kasvit. Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Pnueli, L., Abu-Abeid, M., Zamir, D., Nacken, W., Schwarz-Sommer, Z. and Lifschitz, E. 1991. The MADS box gene family in tomato: Temporal expression during flower development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant. J.* 1:255-266.
- Schmidt, R.J., Veit, B. Mandel, M.A., Mena, M., Hake, S. & Yanofsky, M.F. 1993. Identification and molecular characterization of *ZAG1*, the maize homolog of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Plant Cell* 5:729-737.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. & Sommer, H. 1990. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250:931-936.
- Stern, K. 1961. Über den Erfolg einer über drei Generationen geführten Auslese auf frühes Blühen bei *Betula verrucosa*. *Silvae Genetica* 10:48-51.
- Strauss, S.H., Rottmann, W.H., Brunner, A.M. & Sheppard, L.A. 1995. Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. *Molecular Breeding* 1:5-26.

- Tandre, K., Albert, V., Sundås, A. & Engström, P. 1995. Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Mol. Biol.* 27:69-78.
- Thorsness, M.K., Kandasamy, M.K., Nasrallah, M.E. & Nasrallah, J.B. 1993. Genetic ablation of floral cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5:253-261.
- van der Meer, I. M., Stam, M.E., van Tunen, A.J. Mol, J.N.M. & Stuitje, A.R. 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* 4:253-262.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. & Meyerowitz, E.M. 1992. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69:843-859.

Oksa, E. (toim.) 1995  
Metsäntutkimus uusissa puissa:  
monistusta ja molekyyilejä  
Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Koivun otsonivaurioiden mekanismeista**

Jaakko Kangasjärvi, Markus Kiiskinen, Riikka Pellinen ja Jaana Tuomainen  
Kuopion yliopisto, Ekologisen ympäristötieteen laitos

### **Johdanto**

Koivu, joka käsittää noin 16% metsäalasta, on ainoa taloudellisesti tärkeä lehtipuu Suomessa. Se on tärkeä vanerin, paperin ja huonekaluteollisuuden raaka-aine. Koivulla on myös tärkeä rooli metsäekosysteemeissä ja se tulee hyötymään ennustetusta ilmaston lämpenemisestä. Koivu on altis useille sienitaudeille ja herbivoreille ja tutkimuksissa on myös tunnistettu selvää herkkyyttä ilmakehän kohonneelle otsonipitoisuudelle. Näiden ominaisuuksien geneettinen ja molekulaarinen tausta koivussa on lähes tuntematon. Kyseisten ominaisuuksien ja niihin vastaavien puolustusmekanismien säätelyn tunteminen auttaa jalostustyössä ja suotuisien ominaisuuksien valinnassa, sillä jalostuksellisesti ominaisuuksiin pystytään vaikuttamaan parhaiten säätelytekijöiden kautta.

Ilmakehän kohonnut otsonipitoisuus on teollistuneiden maiden ilmaansaasteista laajimmalle levinnein (Krupa ja Manning 1988). Vallitsevat otsonipitoisuudet eivät tavallisesti aiheuta näkyviä vaurioita kasveissa mutta viime vuosina alemman ilmakehän otsonikonsentraatio Euroopassa on kohonnut (Penkett 1984) ja useissa maissa on myös mitattu lyhytkestoisia otsonipiikkejä (Derwent 1990), jotka voivat vaurioittaa herkkiä kasveja. Otsoni aiheuttaa kasveissa sadon alentumista ja sitä epäillään yhdeksi merkittäväksi tekijäksi Keski-Euroopan ns. "uudessa" metsävauriotyyppissä. Otsoni vaikuttaa kasveihin kahdella tavalla: pitkäkestoisen matalapitoisen altistuksen vaikutus kohdistuu pääasiassa kasvin fysiologisiin tapahumiiniin ja metaboliaan, kuten fotosynteesiin (=kasvun heikkeneminen, satotappiot), ilman havaittavien solukkovaurioiden syntyä (Darrall 1989), kun taas kasvin lyhytaikainen altistuminen korkeille otsonipitoisuuksille johtaa näkyviin vaurioihin (Kangasjärvi ym. 1994).

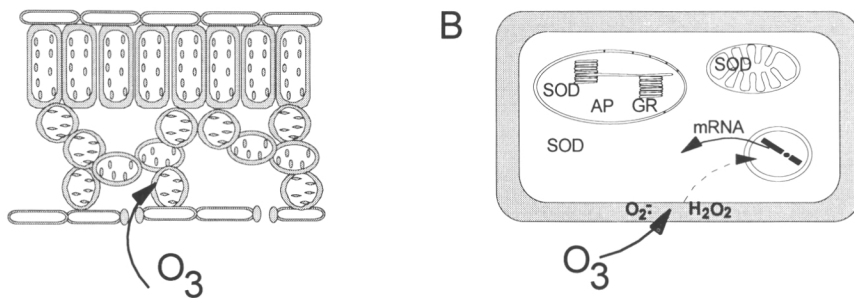
## **Otsoni aiheuttaa kasveissa solukkovaurioita - mekanismi on tuntematon**

Kasvien herkkyys otsonille vaihtelee sekä eri lajien että eri yksilöiden välillä. Osa vaihtelusta johtuu ympäröivistä olosuhteista mutta myös geneettisillä tekijöillä on suuri osuus. Otsonivaurioita on tutkittu kasveissa jo 50-luvulta saakka mutta vielä-kään ei kuitenkaan tiedetä, miten otsoni aiheuttaa solukon nekroosia kasveissa. Vaikutusmekanismiksi voidaan esittää neljää vaihtoehtoa (Kangasjärvi ym. 1994): 1) Otsonin tai sen sivutuotteiden aiheuttama suora fysikaalinen vaurio, joka johtaa solujen kuolemaan; 2) otsonin tai sen sivutuotteiden aiheuttamat haitalliset vaikutukset solujen metaboliaan johtaen solukuolemaan; 3) hypersensitiiviseen reaktioon liittyvän ohjelmoidun solukuoleman indusoituminen; tai 4) ennenaikaisen vanhenemisen indusoituminen.

Otsoni tunkeutuu lehtien solunväleihin ilmarakojen kautta (kuva 1. a). Soluväli-tilassa otsoni reagoi nopeasti soluseinän komponenttien kanssa, jolloin muodostuu erilaisia aktiivisia happiradikaaleja, kuten hydroksyyli-ioneja, superoksidi-hapetta ja vetyperoksidia (Kuva 1. b), jotka vaurioittavat solujen rakenteita. Kaikki nämä reaktiot tapahtuvat solukalvon ulkopuolella, eikä otsonin tai sen sivutuotteina syntyvien happiradikaalien uskota kulkeutuvan solukalvon läpi solujen sisään. Solukalvon ulkopuolelta, apoplastisesta tilasta välittyy tieto vaurioista solujen tumiin, joissa käynnistyy useita puolustusmekanismeja geenitasolla (Kangasjärvi ym. 1994). Eläinsolussa vetyperoksidi toimii toisiohjeena. Esimerkiksi useat hormonin ja reseptorin väliset vuorovaikutukset säätelevät solukalvon redox-entsyymejä, jotka kykenevät tuottamaan signaalia eteenpäin välittävää vetyperoksidia. Samankaltaisia solukalvon redox-komponentteja on kuvattu myös kasveilla (Mehdy 1994) ja ne voivat jopa olla läheisessä yhteydessä hormonireseptoreihin (Apostol ym. 1989). On siis mahdollista, että otsonin vaikutuksesta syntyvät happiradikaalit säätelevät kasvisolujen puolustusjärjestelmiä vastaavanlaisen mekanismin kautta.

### **Otsonin ja patogeenien herättämät puolustusreaktiot kasveissa ovat hyvin samankaltaisia**

Kasvisolun membraania ympäröivällä soluseinällä ja sen rakenteilla, apoplastilla, on keskeinen rooli kasvin puolustuksessa. Sen on todettu olevan toisaalta puolustusreaktioita indusoiden signaalien syntypaikka sekä toisaalta kohde, johon monet puolustukseen liittyvät proteiinit kerääntyvät. Paikalliset tapahtumat solukko-vaurion tai patogeenin invaasiokohdan läheisyydessä laukaisevat nopean ja voi-makkaan systeemisen vasteen, johon liittyy hyvin koordinoitu geenitoiminnan säätely. Paikalliseen puolustukseen liittyy monissa tapauksissa myös hypersensi



Kuva 1. Otsonin kulkeutuminen kasvien lehtiin ja happiradikaalien muodostuminen otsonista. A. Otsoni tunkeutuu lehteen ilmarakojen kautta. B. Otsoni reagoi soluseinän komponenttien kautta tuottaen happiradikaaleja ja vetyperoksidia plasmamembraanin ulkopuolella. Tästä välittyy katkoviivalla esitettyä, osittain tuntematonta signaalinvälitysmekanismia pitkin tieto tumaan, jossa useita puolustusyhteistyjä koodaavia geenejä aktivoituu. Kuvassa on myös osoitettu happiradikaaleja poistavien entsyymien solun sisäinen sijainti (SOD - superoksididismutaasi, AP - askorbaattiperoksidaasi, GR - glutationireduktaasi)

tiivinen vaste (HR =hypersensitive response), jossa vaurion tai infektion lähi-alueella tapahtuu nopea ohjelmoitu solukuolema sekä useiden puolustusgeenien aktivoituminen (Bowles 1990).

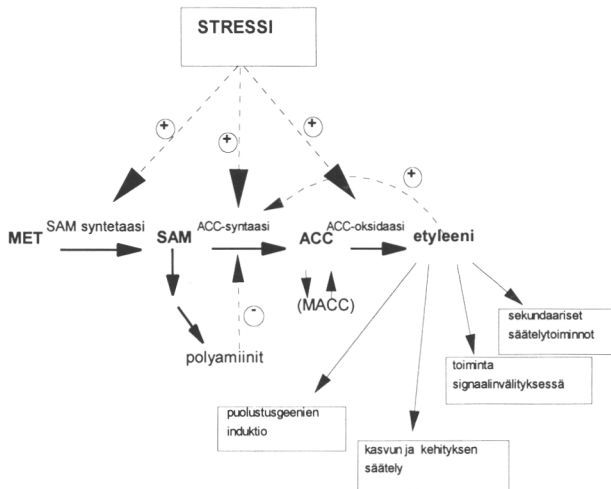
Otsonialtistuksen käynnistämät kasvin yleiset puolustusreaktiot (Kangasjärvi ym. 1994) ovat hyvin samanlaisia kuin muiden stressitekijöiden, kuten lämpö- tai kylmästressin, kuivuuden, tai haavoittamisen aiheuttamat reaktiot (Bowles 1990). Se myös vaikuttaa samoihin aineenvaihduntateihin ja indusoi samoja entsyymejä. Kohonneen otsonipitoisuuden on havaittu mm. lisäävän stressietyleenin tuottoa, vaikuttavan polyamiinien metaboliaan ja aiheuttavan useiden entsyymien (esim. superoksididismutaasi ja glutationireduktaasi, peroksidaasit ym.) aktivaatiotason nousua.

Kun tarkastellaan tilannetta, jossa ilman otsonipitoisuus kasvaa nopeasti, kasvin reaktiot otsonialtistukseen voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen (Eckey-Kaltenbach ym. 1994). Ensimmäiset, nopeimmat reaktiot tapahtuvat 0-3 ensimmäisen tunnin aikana. Toisen vaiheen reaktiot tapahtuvat tyypillisesti 6-12 tuntia otsonialtistuksen alkamisen jälkeen. Kolmannen, myöhäisimmän vaiheen reaktiot tapahtuvat 12-24 tuntia altistuksen alkamisen jälkeen ja liittyvät pääasiassa solukkovaurion muodostumiseen.



## Nopeat reaktiot - etyleenin synteesi

Stressietyleenin tuotto on yksi ensimmäisiä kasveissa havaittavia vasteita otsonialtistuksen jälkeen ja myös koivulla suorittamissa kokeissamme olemme havainneet yhtä etyleenisynteesiä säätelevää entsyymiä, ACC oksidaasia, koodaavan geenin (*aco*) nopean induktion. Etyleenin synteesi metioniinista tapahtuu S-adenosyyylimetioniinin (SAM) ja 1-aminosyklopropani-1-karboksylihapon (ACC) kautta (kuva 2.). SAM-syntetaasi muodostaa metioniinista S-adenosyyylimetioniinia, jota käytetään soluissa useaan eri tarkoitukseen. Etyleenisynteesiä pääasiassa kontrolloiva entsyymi on sytosolin liukoinen 1-aminosyklopropani-1-karboksylihappo-syntaasi (ACC-syntaasi), joka katalysoi ACC:n synteesiä SAM:sta. ACC-oksidaasi (ethylene forming enzyme, EFE) katalysoi edelleen ACC:n konversiota etyleeniksi.



Kuva 2. Etyleenin biosynteesireitti, sitä sääteleviä tekijöitä ja etyleenin vaikutuskohteita kasveissa. MET = metioniini; SAM = S-adenosyyylimetioniini; ACC = 1-aminosyklopropani-1-karboksylihappo; MACC = malonyyli-ACC.

ACC-syntaasin geenejä ja cDNA-klooneja on eristetty useista kasveista. ACC-syntaasi esiintyy useina eri tavoin säädeltynä isoentsyymeinä (Kende 1993). ACC-syntaasin isoentsyymien geenit responsoivat eri tavoin etyleenisynteesin induktoreihin, kuten auksiiniin ja haavoittamiseen, mutta myös koordinoitua aktivaatiota on havaittu. ACC-syntaasin geenit ovat paikoin hyvin konservoituneita ja geenien välinen homologia on suurempi eri kasvilajien samaan induktoriin responsoivien geenien välillä kuin yhden kasvilajin geeniperheen sisällä (Liang ym. 1992). Useimmissa tilanteissa etyleenisynteesin geneettinen säätely näyttäisi kohdistuvan ACC-syntaasin transkriptiovaiheeseen, mutta myös vähemmän tutkitulla ACC-oksidaasilla on havaittu eri tavoin geneettisesti säädeltäviä

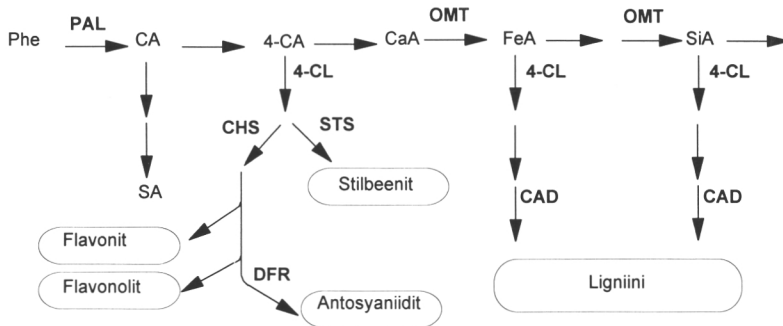
isoentsyymejä (Holdsworth ym. 1988), joita koodaavat geenit indusoituvat stressin seurauksena (Kim ja Yang 1994).

### **Stressietyleenin merkitys kasvin otsoniherkkyydessä ja puolustusvasteessa**

Kaasumainen kasvihormoni etyleeni on ns. stressihormoni. Sen synteesi kiihtyy lähes kaikkien stressitilanteiden seurauksena ja sillä on tärkeä rooli stresseihin vastaavien puolustusmekanismien säätelijänä (Kende 1993). Stressietyleenin muodostumisen on myös esitetty olevan eräs ratkaisevista kasvien otsoniherkkyyteen vaikuttavista tekijöistä (Mehlhorn ja Wellburn 1987; Langebartels ym. 1991), mutta geenitasolla tätä mekanismia ei ole vielä tutkittu. Otsonin lisäksi etyleenin synteesiä indusoivat monet muut stressitekijät, kuten haavoittaminen, patogeeni-infektio, UV-valo, hapettomuus, kuumuus, kylmyys ja kemialliset tekijät (Abeles ym 1992). Etyleenisynteesi on osallisena useiden puolustusvasteiden aktivoinnissa, mutta sen tarkkaa roolia näissä tilanteissa ei kuitenkaan vielä täysin ymmärretä (Dixon ja Lamb 1990). Etyleenin tiedetään aktivoivan useita puolustusgeenejä, kuten esimerkiksi happiradikaaleja tuhoavia entsyymejä koodaavia geenejä (Mehlhorn 1990), fenyylipropanoidien biosynteesiä sääteleviä geenejä (Ecker ja Davis 1987) ja patogeenisten sienten ja bakteerien soluseiniä hajoittavien lyyttisten entsyymien geenejä, ns. PR-proteiineja (Eyal ym. 1992). Myös otsonialtistuksen on havaittu indusoivan kaikkia näitä geenejä (Kangasjärvi ym. 1994). Etyleeni ei kuitenkaan ole ainoa näiden geenien aktivaattori, sillä näillä on myös etyleenistä riippumattomia säätelymekanismeja.

Etyleenin synteessin geenitason säätelyä on tutkittu viime vuosina erittäin runsaasti hedelmien kypsymisen ja kukkien lakastumisen yhteydessä, koska etyleeni toimii näiden prosessien käynnistäjänä. Tällä alalla tutkimus on ollut intensiivistä sovel-lutuksellisten näkökohtien vuoksi (Theologis 1992), joten suurin osa etyleeniin liit-tyvästä tutkimuksesta, ja siten myös etyleeniin liittyvä geenitutkimus, kohdistuu hedelmäkasveihin ja leikkokukkiin. Puista etyleenin synteesiä sääteleviä geenejä on eristetty vain omenasta, jossa kiinnostuksen kohteena on kuitenkin hedelmän kypsymisen säätely. Ryhmässämme on eristetty kolme koivun etyleenisynteesiä säätelevän entsyymin, ACC-oksidaasin cDNA-fragmenttia polymeerasiketjureak-tion avulla (kuva 3) käyttäen samoja alukkeita, joilla herneen ACC-oksidaasin cDNA on eristetty (Peck ym. 1993). Southern-analyysi osoittaa myös, että koivussa on kolme ACC-oksidaasin geeniä. Tämä tarjoaa erittäin hyvät lähtökohdat tutkia stressien aiheuttaman etyleenisynteesin geenitason säätelyä ja etyleenin merkitystä yleisten puolustusmekanismien säätelijänä koivussa.





Kuva 4. Fenyylipropanoidien biosynteesireitti kasveissa. Käytetyt lyhenteet: Phe, fenylalaniini; CA, kanelihappo; 4-CA, 4-kumaryylihappo; CaA, kahvihappo; FeA, ferulihappo; SiA, sinappihappo; SA, salisyylihappo. Entsyymit: PAL, fenylalaniiniammoniumlyyaasi; OMT, orto-metyylitransferaasi; 4-CL, 4-kumaraatti-CoA ligaasi; CHS, kalkonisyntaasi; STS, stilbeenisyntaasi; CAD, kinnamyylialkoholidehydrogenaasi; DFR, dihydroflavono-reduktaasi.

Otsoni indusoi useita fenyylipropanoidien biosynteesireitin haaroja. Otsonialtistuksen on todettu indusoivan kasveissa ligniinisynteesiä (Galliano ym. 1993), stilbeenisynteesiä (Rosemann ym. 1991) sekä flavonoidien ja kumariinien synteesiä (Eckey-Kaltenbach ym. 1993, 1994). Olemme eristäneet koivusta koko fenyylipropanoidireittiä säätelevän PAL:n ja flavonoidien haaraa säätelevän kalkonisyntaasin (CHS) geeneistä polymeraasiketjureaktiolla koettimet (Tuomainen ym. 1996). Näillä geenikoettimilla on analysoitu kyseisten geenien säätelyä otsonialtistetuissa, haavoitetuissa ja UV-B-altistetuissa koivun lehdissä.

Sekä otsoni, että haavoittaminen indusoiivat fenylalaniiniammoniumlyyaasia koodaavaa geeniä koivussa samalla tavalla. Ennen otsonialtistusta PAL:n lähetti-RNA-tasot olivat lähes havaitsemattomat. Altistuksen seurauksena PAL:n lähetti-RNA-tasot nousivat voimakkaasti kahdeksan tunnin kohdalla ja laskivat heti sen jälkeen (Taulukko 1). Toinen, matalampi mRNA-tasojen huippu oli 24 tunnin kuluttua altistuksen aloittamisesta, jolloin myös ensimmäiset näkyvät lehtivauriot olivat havaittavissa. *pal*-aktivaation ajoittuminen oli samanlainen kuin monissa muissa kasveissa on havaittu esimerkiksi patogeenialtistuksen yhteydessä yhtenä osana ohjelmoituja puolustusreaktioita.

## **Myöhäiset reaktiot - solujen kuolema otsonialtistuksen yhteydessä**

Otsoni saa aikaan voimakkaan happiradikaalien muodostumisen lehden solujen seinissä (kuva 1), joka puolestaan vaurioittaa plasmamembraania muuttaen sen läpäisevyyttä (Heath 1987). Tätä läpäisevyyden muutosta voidaan mitata usealla tavalla. Me olemme tarkastelleet koivussa otsonialtistuksen aiheuttamia plasmamembraanimuutoksia vitaalivärjäyksen avulla. Vitaalivärit, kuten käyttämämme Evan's Blue, eivät läpäise ehjää plasmamembraania, joten siniseksi värjäytyvien solujen plasmamembraanin läpäisevyys oli kasvanut, ts. solun plasmamembraani oli vaurioitunut. Otsonialtistetuissa koivuissa ei ollut havaittavissa eroja vaurioituneiden solujen suhteellisessa osuudessa kummassakaan kloonissa (Tuomainen ym. 1996). Membraanivaurioiden kasvu oli havaittavissa 12 tuntia altistuksen aloittamisen jälkeen ja 24 tunnin kohdalla vaurioituneiden solujen osuus oli korkeimmillaan. Otsonille herkässä kloonissa (KL-5-M) kuitenkin joissain lehdistä solujen vaurioituminen johti laajalle levinneeseen solukuolemaan, joka näkyi nekroottisina alueina lehdistä.

Happiradikaaleilla ja vetyperoksidilla, joiden muodostumista myös otsonialtistus kasveissa aiheuttaa, on todettu olevan tärkeä rooli kasvien ohjelmoidun solukuoleman käynnistämisessä (Greenberg ym. 1994; Levine ym. 1994). Aktiivisen hapen (AOS) eri muotoja muodostuu kasveissa useissa solun osissa myös solun normaalin metabolian aikana. Soluissa onkin entsyymeitä, kuten superoksididismutaasi, peroksidaasit ja glutationireduktaasi, jotka poistavat näitä monille solun rakenteille ja osille haitallisia yhdisteitä (Foyer ym. 1994a, b). Näiden entsyymien kapasiteetti on kuitenkin rajallinen ja ne myös sijaitsevat eri paikassa solua (kuva 1b) verrattuna otsonin aiheuttamaan AOS:n muodostumiseen. Kasvipatogeeni-interaktioissa muodostuu myös huomattava määrä happiradikaaleja plasmamembraanin ulkopuolelle, jossa niillä on tärkeä rooli puolustusmekanismien ja solukuoleman käynnistäjänä (Levine ym. 1994).

Superoksididismutaasilla (SOD), peroksidaaseilla (POX) ja glutationireduktaasilla (GR) on keskeinen rooli happiradikaalien poistajana kasvisoluissa (Foyer ym. 1994b). Usein on esitetty, että kyseisten entsyymien aktiivisuuksien nousu otsonialtistetuissa kasveissa saattaisi suojella niitä otsonin haitallisilta vaikutuksilta. Otsonialtistetuissa koivuklooneissa havaittiin myös kyseisten entsyymien aktiivisuuksien nousua (Taulukko 1), mutta tässä tapauksessa entsyymiaktiivisuudet kohosivat selvästi enemmän otsonille herkässä kloonissa. Entsyymiaktiivisuuksien huippu osui samaan aikaan, jolloin alkava solukkovaurio oli havaittavissa. Foyerin ym. mukaan (1994b) happiradikaaleja poistavien entsyymien aktiivisuudet nousevat vasta solukon vaurioitumisen seurauksena, jolloin myös vaurioituneissa soluissa muodostuu runsaasti happiradikaaleja. Yleensä SOD, POX ja GR aktiivisuudet

voivat nousta näissä yhteyksissä korkeintaan 2-3 kertaisiksi. Mikäli happiradikaaleja on enemmän kuin entsyymit kykenevät niitä poistamaan, seurauksena on solukuoleman käynnistyminen, muussa tapauksessa vain ohjelmoidut puolustusmekanismit käynnistyvät. Tämä on selkeästi havaittu myös kokeissa, joissa on kokeiltu vetyperoksidin pitoisuuksien vaikutuksia kasvisoluissa (Levine ym. 1994).

Otsonialtistetuissa koivuklooneissa puolustusreaktiot käynnistyivät molemmissa klooneissa (Taulukko 1), mutta vain herkässä kloonissa havaittiin laajoja solukko-vaurioita. Molemmissa klooneissa (herkässä kloonissa terveellä alueella) havaittiin yksittäisiä soluja, joiden plasmamembraani oli vaurioitunut. Otsonille herkässä kloonissa SOD-, POX- ja GR-aktiivisuudet kasvoivat 2-3 kertaisiksi, kestävässä kloonissa nousu oli vähäisempää. Nämä havainnot viittaavat siihen, että otsonialtistuksen jälkeen happiradikaalien muodostuminen jatkui molemmissa klooneissa, mutta kestävässä kloonissa muodostumisnopeus oli sellainen, että antioksidatiiviset puolustusentsyymit kykenivät pitämään pitoisuuden niin alhaisena, että solujen kuolema ei käynnistynyt - kuitenkin muut puolustusjärjestelmät, joista *pal* on esimerkkinä, käynnistyivät. Otsonille herkässä kloonissa happiradikaalien muodostuminen oli nähtävästi voimakkaampaa ylittäen entsyymien kapasiteetin ja samalla mahdollisesti käynnistäen ohjelmoidun solukuoleman. Tulevissa kokeissa aiomme selvittää tarkemmin etyleenin roolia näiden tapahtumien alkusäätelyssä. Stressietyleenin voimakas synteesi heti otsonialtistuksen alussa on ainoa yhteinen tekijä, joka on havaittu kaikissa otsonille herkässä lajikkeissa/kannoissa/klooneissa kun niitä on verrattu saman lajin kestäviin lajikkeisiin/kantoihin/klooneihin. Etyleenin merkityksestä kertoo myös se, että kun otsonille herkässä kasvissa etyleenin synteesi estettiin (ei-spesifisellä) inhibiittorilla (Mehlhorn ym. 1991) tai kun käytettiin siirtogeneistä kasvia, jossa etyleenisynteesiä oli vähennetty antisense tekniikalla (Tuomainen, Kangasjärvi, Betz, Ernst, Langebartels, Sandermann, julkaisematon), lehtivaurioiden määrä laski.

### **Kirjallisuus**

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E., Jr. 1992. Ethylene in plant biology. 2nd ed. Academic Press, San Diego
- Apostol, I., Heinstein, P.F. & Low, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiology* 90:109-116.
- Bowles, D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59:873-907.
- Darrall, N.M. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 12:1-30.
- Derwent, R.G. 1990. The long range transport of ozone within Europe and its control. *Environ. Pollut.* 63:299-318.

- Dixon, R.A. & Lamb C.J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:339-367.
- Ecker, J.R. & Davis, R.W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 84:5202-5206.
- Eckey-Kaltenbach, H., Heller, W., Sonnenbichler, J., Zetl, I., Schäfer, W., Ernst, D. & Sandermann, H., Jr. 1993. Oxidative stress and plant secondary metabolism: 6"-*O*-malonylapiin in parsley. *Phytochemistry* 34:687-691.
- , Ernst, D., Heller, W. & Sandermann, H., Jr. 1994. Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley plants. *Plant Physiology* 104:67-74.
- Eyal, Y., Sagee, O. & Fluhr, R. 1992. Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene. *Plant Molecular Biology* 19:589-599.
- Foyer, C.H., Descourvières, P. & Kunert, K. 1994a. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17:507-523.
- , Lelandais, M. & Kunert, K.J. 1994b. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92:696-717.
- Galliano, H., Cabané, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Sandermann, H., Jr. & Ernst, D. 1993. Molecular cloning, sequence analysis and elicitor/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Molecular Biology* 23:145-156.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F. & Ausubel, F.M. 1994. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77:551-563.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W. & Grierson, D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284-287.
- Heath, R.L. (1987) The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of the plant cells. Ks. . Saunders, J.A. Kosak-Channing, L. & Conn, E.E. (toim). *Recent Advances in Phytochemistry*. 21 *Phytochemical Effects of Environmental Compounds*, Plenum Press, New York. s. 29-54.
- Holdsworth, M.J., Schuch, W. & Grierson, D. 1988. Organisation and expression of a wound/ripening-related small multigene family from tomato. *Plant Molecular Biology* 11:81-88.
- Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. & Karjalainen, R. 1994. Plant defense systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17:783-794.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44:283-307.
- Kim, W.T. & Yang, S.F. 1994. Structure and expression of cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs isolated from excised mung bean hypocotyls. *Planta* 194:223-229.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J. 1988. Atmospheric ozone: Formation and effects on vegetation. *Environ. Pollut.* 50:101-137.

- Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W. & Sandermann, H., Jr. 1991. Biochemical plant responses to ozone I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 95:882-889.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Liang, X., Abel, S., Keller, J.A., Shen, N.F. & Theologis, A. 1992. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 89:11046-11050.
- Mehdy, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105:467-472.
- Mehlhorn, H. 1990. Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant, Cell and Environment* 13:971-976.
- & Wellburn, A.R. 1987. Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature* 327:417-418.
- , O'Shea, J.M. & Wellburn, A.R. 1991. Atmospheric ozone interacts with stress ethylene formation by plants to cause visible plant injury. *Journal of Experimental Botany* 42:17-24.
- Peck, S.C., Olson, D.C. & Kende, H. 1993. A cDNA sequence encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from pea. *Plant Physiology* 101:689-690.
- Pellinen, R., Talvinen, J., Julkunen-Tiitto, R., Eloranta, T. & Kangasjärvi, J. (1993) Ozone-induced changes in gene expression and defence reactions in ozone tolerant and sensitive birch (*Betula pendula*) clones. Ks. Tuomisto, J. & Ruuskanen J. (toim). *Proceedings of First Finnish Conference of Environmental Sciences, University of Kuopio, Kuopio.* s. 131-134.
- Penkett, S.A. 1984. Ozone increases in ground-level European air. *Nature* 311:14-15.
- Rosemann, D., Heller, W. & Sandermann, H., Jr. 1991. Biochemical plant responses to ozone II. Induction of stilbene biosynthesis in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiology* 97:1280-1286.
- Theologis A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181-184.
- Tuomainen J., Pellinen R., Roy S., Kiiskinen M., Eloranta T., Karjalainen R. & Kangasjärvi J. 1996. Ozone affects birch (*Betula pendula* Roth) phenylpropanoid, polyamine and active oxygen detoxifying pathways at biochemical and gene expression level. *Journal of Plant Physiology* Painossa.

Oksa, E. (toim.) 1995  
 Metsäntutkimus uusissa puissa:  
 monistusta ja molekyyliä  
 Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## Männyn genomin koon määrittäminen virtausytometrilla

Anne Ylönen<sup>1)</sup> & Markku Nygren<sup>2)</sup>  
 Helsingin yliopisto, <sup>1)</sup>Biokemian laitos ja <sup>2)</sup>Metsäekologian laitos

### Johdanto

Puiden kasvu ja ontogeneettinen kehitys perustuu meristeemisolujen jakautumiseen, laajenemiseen ja erilaistumiseen. Näillä soluilla on yhteinen alkuperä - hedelmöittynyt siemenaihe - ja niissä on sama geneettinen informaatio. Emosolujen mitoottisesti jakautuessa geneettinen koodi, DNA, siirtyy muuttumattomana tytärsoluihin.

Solujen toistuva jakautuminen, solusykli, muodostuu välivaiheesta eli interfaasista sekä varsinaisesta mitoosista, jonka aikana solun kromosomisto ja sytoplasma jakautuvat syntyviin uusiin soluihin. Solukoiden kasvunopeus (cell doubling time, cdt) riippuu mitoottisten jakautumisten määrästä eli mitoosiaktiivisuudesta aikayksikköä kohden. Mitoosiaktiivisuuteen ja samalla solusyklin pituuteen vaikuttavat monet tekijät: kasvuun allokoituvien hiilihydraattien määrä, kasvusolukoiden fysiologinen tila, veden saatavuus jne. Ympäristötekijöistä syklin kestoon vaikuttaa erityisesti lämpötila. Esimerkiksi sipulin (*Allium cepa*) juurimeristeemissä solusykli lyhenee 50 tunnista noin 12 tuntiin, kun ympäristön lämpötila kohoaa 10 °C:sta 30 °C:een (Francis ja Barlow 1988).

Olemme kuluneen vuoden aikana selvittäneet tutkijaryhmässä (ks. Valkonen ym. 1994) männyn siementen kasvusolukoiden mitoosin ja solusyklin perusteita. Päähuomio on ollut genomin koon määrittämisessä, koska solujen generaatioajan (solusyklin pituuden) ja genomin koon välillä on positiivinen korrelaatio (Van't Hof ja Sparrow 1963, Bennett 1987): mitä suurempi on emosolun DNA-määrä, sitä kauemmin kestää sen mitoottinen jakautuminen kahdeksi uudeksi tytärsoluksi.

## Genomin kokovaihtelut

Koppisiemenisillä kasveilla diploidin tuman DNA-määrä vaihtelee yli satakertaisesti alle yhdestä pikogrammmasta 125:een pikogrammaan ja sukujen sisälläkin vaihtelu on yli 40-kertaista (Price 1988). Myös lajinsisäisen genomin kokovaihtelun on havaittu olevan huomattavan - jopa yli sadan prosentin luokkaa (Cavallini ja Natali 1991).

Havupuilla genomin koko on varsin suuri, mutta polyploidiaa esiintyy vain harvoin. Sen sijaan repetetiivisen DNA:n suuri määrä on tyypillistä nimenomaan suurilla genomeilla (Miksche ja Hotta 1973). Emäsparisuhteen taas ei ole havaittu vaihtelevan genomin koon mukaan. Ohrin ja Khoshoon (1986) määritettyä 57 paljassiemennisen kasvin genomin koon, havaittiin niiden kesken genomin kokovaihtelun olevan vain 12-kertaista - ja jos *Gnetumia* ei lasketa mukaan vain 4-kertaista - mikä on vähäistä verrattuna koppisiemenisten yli satakertaiseen vaihteluun. Paljassiemennisten on havaittu muutenkin olevan konservatiivisia. Tutkimuksen mukaan trooppisten mäntylajien genomi on selvästi pienempi kuin viileiden alueiden männyllä.

Ensimmäiset tutkimukset havupuiden lajinsisäisistä genomien kokovaihteluista ovat olleet tuloksiltaan ristiriitaisia. Mergen ja Thielges (1967) ja Miksche (1967, 1968, 1971) havaitsivat suuria vaihteluita kasvupaikan mukaisesti eri havupuiden genomin määrissä kun taas Teoh'in ja Rees'in (1976) sekä Dhillon'in ym. (1978) mukaan havaittavia eroja ei ollut osoitettavissa ainakaan valkokuusella (*Picea glauca*) ja pikimännyllä (*Pinus rigida*). Varhaisten mittausmenetelmien epätarkkuus on osaltaan varmasti vaikuttanut näihin eroavaisuuksiin. Hesemann (1980) onkin kiinnittänyt suurta huomiota mittausmenetelmien tarkkuuteen ja tulosten luotettavuuteen.

Kasvigenomien kokovaihtelusta on esitetty kaksi mielenkiintoista ekologista tulkin-  
taa, jotka ovat osittain toistensa vastakohtia. Grime'n ja Moworth'n (1982) esittämän hypoteesin mukaan suuri genomin koko olisi tyypillinen viileissä olosuhteissa kasvaville lajeille ja näiden lajien kasvustrategia perustuisi enemmän solujen laajenemiseen kuin niiden jakautumiseen. Francis ja Barlow'n (1988) mukaan viileissä oloissa menestyville lajeille on usein tyypillistä pieni genomin koko ja lyhyt solusykli; näiden lajien edustajat ehtisivät kasvaa ja tuleentua viileinä ja lyhyinä kasvukausina.

Genomin koon vaihtelu ja sen riippumattomuus eliöiden kehittyneisyydestä sekä proteiineja koodaavan DNA:n vähäinen osuus koko tuman DNA-määrästä tunnetaan ilmiönä C-arvo paradoksi (Thomas 1971). Ilmiön selitykseksi on esitetty kahta teoriaa, joilla kummallakin on omat vahvat puolensa, mutta kumpaakaan ei ole vielä todistettu oikeaksi tai vääräksi.

Nukleotyyppi-teoriassa ylimääräisen DNA:n tehtävänä on olla eräänlaisena tukirakenteena tumassa, jotta tuman ja solun koko säilyisi vakaana. Cavalier-Smith (1985) esittää suurten solujen tarvitsevan suuremman tuman pinta-alan RNA:n kuljetukseen. Ylimääräinen DNA toimisi tällöin tumassa eräänlaisena selkärangana ja genomin koko olisi suhteessa solujen kokoon.

Orgelin ja Crickin (1980) teorian mukaan tuma sisältää koodaavaa DNA:ta ja roska-DNA:ta (engl. junk, parasitic, selfish DNA). Hitaammin kehittyvät yksilöt sietävät roska-DNA:ta paremmin. Roska-DNA:n syntymekanismiksi on esitetty epätasaista crossing-overia ja transpositiota. DNA:n ylimäärä kulkee soluissa mukana niin kauan kunnes sen replikointi käy ylivoimaiseksi soluille ja tapahtuu valikoiva mutaatio, joka poistaa ylimääräistä DNA:ta. Genomin koko olisi suhteessa solujen jakautumisnopeuteen (Pagel ja Johnstone 1992).

### **Virtausytometria genomin koon määrittämisessä**

Lyhyesti määriteltynä virtausytometri on eräänlainen mikroskooppi, jossa erityisessä virtauskammiossa virtaavan vaipanesteen avulla mitattavat partikkelit kuljetetaan yksitellen mittauskohtaan. Mittauskohdassa partikkelit valaistaan herätevalolla, jolloin ne virittyvät ja alkavat säteillä fluoresoivaa tai sironnutta valoa. Partikkelit voivat olla solurykelmiä, soluja, tumia tai yksittäisiä kromosomeja. Fluoresoiva valo muunnetaan sähköimpulsseiksi ja ne tallennetaan tietokoneelle voimakkuuden mukaan, jolloin niistä saadaan kuvallinen esitys - histogrammi. Fluoresenssi saadaan aikaan värjäämällä partikkelit halutulla fluoresoivalla värillä. Läheisesti virtausytometriaan liittyy myös partikkelien erottelumahdollisuus eri ominaisuuksien mukaan, mutta se ei ole mahdollista kaikilla laitteilla. Virtausytometrian etuina pidetään nopeutta, tarkkuutta ja mahdollisuutta suurten solupopulaatioiden analysoimiseen kerralla.

Genomin koon määrittäminen virtausytometrillä on nopea ja tarkka perinteisiin menetelmiin esim. Feulgen-mikrodensitometriaan verrattuna. Galbraithin ym. (1983) (ks. myös Arumuganathan ja Earle, 1991) kehittämällä tekniikalla voidaan analysoida nopeasti suuria näytemääriä, jolloin tulosten luotettavuus paranee. Määrittäminen eristetyistä tumista, jotka on värjätty sopivalla fluoresoivalla

DNA-väriaineella. Samaan aikaan tutkittavan näytteen kanssa analysoidaan samalla tavoin käsiteltyä ja värjättyä tunnettua materiaalia ns. standardia, jonka DNA-pitoisuus tunnetaan. Virtausytometri mittaa tumien fluoresenssin, joka on siis verrannollinen niiden DNA-määrään ja esittää pitoisuudet histogrammina, josta voidaan laskea tunnetun materiaalin perusteella tuntemattoman näytteen DNA-määrä.

### **Männyn genomin kokomääritys**

Kokeellisessa osuudessa määritimme männyn (*Pinus sylvestris*) genomin koon Partec PAS II virtausytometrillä. Työssä analysoitiin kolmea eri alkuperää olevaa siemenerää tarkoituksena selvittää onko alkuperien välillä eroja. Lisäksi mukana oli yhdeltä alueelta kahden eri tuleentumisvuoden siemeniä.

Männyn siemenet olivat peräisin standardimetsiköistä Kolarista (G3-88-876), Suomussalmelta (G01-88-877 ja G01-91-877) ja Ristiinasta (G3-85-0239). Männyn DNA-määrän mittauksissa vertailumateriaalina käytettiin ohran - *Hordeum vulgare* cv. Sultan - tumia, joiden diploidin tuman DNA-määrä on 11,12 pg (Michaelson ym. 1991).

Ennen analyysin alkua virtausytometrin toiminta tarkastettiin standarditumilla. Männyn siemenerät oli kooditettu siten että erien alkuperä ei ollut tiedossa analyysin aikana. DAPI-värjättyjen männyn tumien fluoresenssin voimakkuus analysoitiin Partec PAS II virtausytometrillä satunnaisessa järjestyksessä yhtäaikaan ohran tumien kanssa 3 tunnin kuluttua värjäyksestä. Jokaista histogrammia varten analysoitiin vähintään 10 000 tumaa virtausnopeuden ollessa korkeintaan 100 tumaa sekunnissa.

### **Tulokset ja tarkastelu**

Männyn genomin kokovaihtelut osoittautuivat pieniksi (Taulukko 1). Suomussalmen mäntyjen genomissa ei kahden eri kasvukauden siemenissä ollut eroa. Ristiinan mäntyjen genomi osoittautui pienimmäksi kaikista tutkituista ja sen koko poikkesi tilastollisesti melkein merkitsevästi ( $p=0,067$ ) Suomussalmen mäntyjen genomista, mutta ei Kolarin mäntyjen genomista.

*Taulukko 1. Virtaussytometrilla määritetty männyn diploidin genomien koko (pg±s.d.) neljässä eri näytteessä. Luvut ovat 30 riippumattoman analyysin keskiarvoja; kukin analyysi perustuu vähintään 10 000 tuman analyysiin per kymmenen alkioita.*

<u>Näyte</u>	<u>Genomin koko, pg</u>
Kolari, G3-88-876	68,8±1,4
Suomussalmi, G3-88-877	69,2±1,5
Suomussalmi, G3-91-877	69,0±1,9
Ristiina, G01-85-0239	68,1±2,0

Kaikkien alkuperien diploidin genomien keskiarvoksi saadaan 68,8 pg, mikä on lähes 20 % enemmän kuin Valkosen ym. (1994) männyn alkiosta määrittämä 55,6 pg. Poikkeavien tulosten syynä on todennäköisesti käytettyjen DNA-värien erilaiset sitoutumismekanismit. Rayburnin ym. (1992) mukaan DAPI värjää tuman DNA:n riippumatta sen kromatiinin rakenteesta kun taas propidiumjodidi ei pysty värjäämään konstitutiivisen heterokromatiinin DNA:ta, mikä selittäisi sillä saadut pienemmät arvot.

Eräs tulosten tarkkuuteen vaikuttava tekijä on molemmissa tutkimuksissa käytetty ohrastandardi. Ohran genomi on kooltaan selvästi mäntyä pienempi ja koska lajit ovat hyvin erilaisia on mahdollista, että niiden kromatiinirakenteet ja myös emäsparisuhteet poikkeavat toisistaan merkittävästi. Oikean standardin valintaa ovat pohtineet myös Birstein ym. (1993) päätyen siihen, että fylogeneettisesti kaukaisten lajien kromatiinirakenteen erot voivat ratkaisevasti vaikuttaa DNA-määrien mittaustuloksiin.

Genomin koon vaihtelu ei näyttänyt seuraavan alkuperien maantieteellistä sijaintia, vaikka eteläisin alkuperä osoittautuikin Grimen ja Mowforthin (1982) teorian mukaisesti genomiltaan pienimmäksi. Ehkä enemmän huomiota olisikin kiinnitettävä kasvupaikan sijainnin asemasta varsinaisiin kasvuolosuhteisiin - kosteuteen ja lämpötilaan (vrt. Wakamiya ym. 1993). Mielenkiintoista olisi tietää levinneisyysalueen ääriolosuhteista peräisin olevien mäntyjen genomien koko.

Genomin kokoa määritettäessä olisi syytä ottaa huomioon myös populaation sisäinen vaihtelu ja analysoida riittävä määrä kyseisen populaation edustajia, jotta tulokset olisivat todellisia (Lockwood ja Derr 1992). Lisäksi tiedetään, että kasveilla genomien koko voi vaihdella lajin sisäisesti ja jopa saman yksilön eri kehitysvaiheiden mukaan (Bassi 1990), joten yksiselitteistä arvoa genomien koolle tuskin edes pystytään määrittämään.

## Päätelmät

Tutkittava aineisto on peräisin varsin suppealta alalta männyn levinneisyysaluetta ajatellen. Erojen voisi olettaa olevan selvemmin havaittavissa, mikäli olisi tutkittu mahdollisimman eteläisiä ja pohjoisia alkuperiä.

Genomin koon määrittämiä tehdään nykyisin monesta eri syystä; halutaan tehdä luetteloita eri lajien genomeista, tutkitaan lajien kehitystä suhteessa genomin koon tai kasvuolosuhteiden vaikutusta. Genomin kokoa voidaan käyttää hyväksi taksonomiassa, lajintunnistuksessa ja biodiversiteetin tutkimisessa sekä molekyylibiologiassa. Uusia sovelluksia kehitetään jatkuvasti. Myös jotkut vanhoilla menetelmillä tehdyt määrittämiset kaipaavat varmuutta. Genomin koolla on monia ulottuvuuksia luonnontieteessä ja kokomäärittämiä tarvitaan.

Tähänastisista genomin koon määrittämismenetelmistä virtaussytometri on nopein ja luotettavin. Menetelmän rajoitukset on kuitenkin syytä tuntea, jotta eri tutkimusten tuloksia pystyy tarkastelemaan kriittisesti.

Eri tulosten vertailukelpoisuutta haittaa se, etteivät menetelmät ole yhtenäisiä. Periaate kaikissa virtaussytometrisissä genomin kokomäärittämisissä on kyllä sama; DNA-värillä värjättyä tumaa fluoresenssia mitataan ja tuntemattoman näytteen tumaa sisältävä DNA-määrä määritetään tunnettuun standardiin vertaamalla. Erot syntyvät erilaisista käytetyistä väreistä, standardeista ja näytteenvalmistusmenetelmistä.

Oikean värin valinta genomin kokomäärittämiin on hankalaa. Ongelmia aiheuttavat värien erilaiset emässpesifisyydet ja sitoutumismekanismit. Mielenkiintoista värien luotettavuudesta vaihtelevat suuresti. Myös värin määrällä voi olla joissakin tapauksissa merkitystä. Turvallisinta olisi todennäköisesti käyttää rinnakkain kahta eri emässpesifistä väriä kuten Vinogradov (1994) esittää.

Standardeiksi sanotaan genomikooltaan tunnettuja lajeja. On kuitenkin mahdollista, että liian suuren tai pienen standardin käyttö vääristää tuloksia samoin kuin toisistaan hyvin poikkeavien lajien vertaaminen keskenään, esimerkiksi käytettäessä kanan punasoluja standardina männylle. Joidenkin standardilajien genomin koosta on esitetty useita eri lukuarvoja.

Näytteenvalmistusmenetelmissä on eroja. Virtaussytometri analysoi yhtä hyvin tuoreita tai fiksoituja soluja, viiltelemällä tai entsyymaattisesti eristettyjä tumia. Varsinkin kasveilla on huomattava, että kokonaisista protoplasteista genomin kokoa mitattaessa saattaa vakuolin suuri osuus solussa heikentää mittaustarkkuutta. Eris-

tettyjen tumien osalta on varmistettava tumien eheys. Myös fiksaatio vaikuttaa värin sitoutumiseen.

Eri laboratorioiden välisiä tuloksia ei siis voida suoraan verrata ennenkuin on saatu aikaan standardimenetelmä, joka ottaa huomioon mahdollisimman monta tulosten tarkkuuteen vaikuttavaa tekijää. Kun saadaan selville kromatiinirakenteen vaikutus eri värien sitoutumiseen ja selvitetään lisää luotettavia standardilajeja, on virtaus-sytometrinen genomien kokomääritys rutiinia ja voidaan paremmin keskittyä pohtimaan genomien kokoon liittyviä, vielä vastaamattomia kysymyksiä.

*Tutkimus on tehty työryhmässä jossa ovat olleet mukana Anne Ylönen (HY, Biokemian laitos), Leena Mannonen (VTT/BEL), Jari Valkonen (HY, Kasvintuotantotieteen laitos) ja Markku Nygren (HY, Metsäekologian laitos). Koemateriaalia ovat auliisti luovuttaneet käyttöömmme Seppo Ruotsalainen (Metla, Kolari) ja Teijo Nikkanen (Metla, Punkaharju). Virtaus-sytometrijot on tehty VTT:n Bio- ja elintarviketekniikan laboratoriossa Kemira Oy:n Säätiön myöntämällä apurahalla. Tämä esitys perustuu Anne Ylösen pro gradu-työhön.*

## Kirjallisuus

- Arumuganathan, K. & Earle, E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:208-218.
- Bassi, P. 1990. Quantitative variations of nuclear DNA during plant development: a critical analysis. *Biol. Rev.* 65:185-225.
- Bennett, M.D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol.* 106 (Suppl.): 177-200.
- Birstein, V.J., Poletaev, A.I. & Goncharov, B.F. 1993. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry. *Cytometry* 14:377-83.
- Cavalier-Smith, T. (toim.) 1985. The evolution of genome size. John Wiley & Sons, Chichester. 523 s.
- Cavallini, A. & Natali, L. 1991. Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. *Caryologia* 44:93-107.
- Dhillon, S.S., Berlyn, G.P. & Miksche, J.P. 1978. Requirement of an internal standard for microspectrophotometric measurements of DNA. *Am. J. Bot.* 64:117-121.
- Francis, D. & Barlow, P.W. 1988. Temperature and cell cycle. Teoksessa: Long, S.P. & Woodward, F.I. (toim.), *Plants and Temperature*, Symp. Soc. Exp. Biol. 42:181-202.
- Galbraith, D.W., Harkins, J.M., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. & Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytophotometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049-51.
- Grime, J.P. & Mowforth, M.A. 1982. Variation in genome size - an ecological interpretation. *Nature* 299:151-152.
- Hesemann, C.U. 1980. Cytophotometrical measurement of nuclear DNA content in some coniferous and deciduous trees. *Theor. Appl. Genet.* 57:187-91.

- Lockwood, S.F. & Derr, J.N. 1992. Intra- and interspecific genome-size variation in the Salmonidae. *Cytogenet. Cell Genet.* 59:303-6.
- Mergen, F. & Thielges, B.A. 1967. Intraspecific variation in nuclear volume in four conifers. *Evolution* 21:720-24.
- Michaelson, M.J., Price, H.J., Ellison, J.R. & Johnston, J.S. 1991. Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *Am. J. Bot.* 78:183-188.
- Miksche, J.P. 1967. Variation in DNA content of several gymnosperms. *Can. J. Genet. Cytol.* 9:717-22.
- 1968. Quantitative study of intraspecific variation of DNA per cell in *Picea glauca* and *Pinus banksiana*. *Can. J. Genet. Cytol.* 10:590-600.
- 1971. Intraspecific variation of DNA per cell between *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. provenances. *Chromosoma* 33:343-52.
- & Hotta, Y. 1973. DNA base composition and repetitious DNA in several conifers. *Chromosoma* 41:29-36.
- Ohri, D. & Khoshoo, T.N. 1986. Genome size in gymnosperms. *Pl. Syst. Evol.* 153:119-32.
- Orgel, L.E. & Crick, F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-7.
- Pagel, M. & Johnstone, R.A. 1992. Variation across species in the size of the nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the C-value paradox. *Proc. R. Soc. Lond.* B249:119-24.
- Price, H.J. 1988. Nuclear DNA content variation within angiosperm species. *Evol. Trends in Plants* 2:53-60.
- Rayburn, A.L., Auger, J.A. & McMurphy, L.M. 1992. Estimating percentage constitutive heterochromatin by flow cytometry. *Exp. Cell Res.* 198:175-78.
- Teoh, S.B. & Rees, H. 1976. Nuclear DNA amounts in populations of *Picea* and *Pinus* species. *Heredity* 36:123-37.
- Thomas, C.A. 1971. The genetic organization of chromosomes. *Ann. Rev. Genet.* 5:237-56.
- Wakamiya, I., Newton, R.J., Johnston, J.S. & Price, H.J. 1993. Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*. *Am. J. Bot.* 80:1235-41.
- Valkonen, J.P.T., Nygren, M., Ylönen, A. & Mannonen, L. 1994. Nuclear DNA content of *Pinus sylvestris* (L.) as determined by laser flow cytometry. *Genetica* 92:203-7.
- Van't Hof, J. & Sparrow, A.H. 1963. A relationship between DNA content, nuclear volume, and minimum mitotic cycle time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49:879-902.
- Vinogradov A.E. 1994. Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry* 16:34-40.
- Ylönen, A. 1995. Männyn genomin koon määrittäminen virtausytometrillä. Pro gradu-tutkielma, Helsingin yliopisto, Biokemian laitos, 27 + 4 s.

Oksa, E. (toim.) 1995  
 Metsäntutkimus uusissa puissa:  
 monistusta ja molekyyilejä  
 Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574

## **Puuvartisten kasvien biotekniikkatutkimus Norjassa**

Olavi Junttila

Tromssan Yliopisto, Kasvifysiologian laitos

### **Johdanto**

Puihin kohdistuva fysiologinen tutkimus on perinteisesti ollut suhteellisen vähäistä Norjassa. Myös puiden molekyylibiologinen ja biotekninen tutkimus on sekä Suomeen että Ruotsiin verrattuna vähäistä. Tällaista tutkimusta tehdään pääasiassa Norjan metsäntutkimuslaitoksella (NISK) Åsissa, jossa on tällä hetkellä käynnissä kaksi projektia. Tromssan yliopistossa on myös meneillään kaksi puihin liittyvää tutkimusprojektia. Sen lisäksi Tromssan yliopiston kasvifysiologian laitos on osallistunut yhteispohjoismaiseen projektiin "Gene transfer to Nordic forest trees". Tromssan osaprojektissa tutkittiin kuusen siitepölyn fysiologiaa, siitepölyn käyttöä molekyylibiologisessa tutkimuksessa ja mahdollisuuksia käyttää siitepölyä geeniirtovektorina. Tutkimustulokset on julkaistu väitöskirjana (Martinussen 1994). Näitä siitepölytutkimuksia ei kuitenkaan tällä hetkellä jatketa.

### **Kuusen embryogeneesi**

Kuusen embryogeneesiä on NISK'issä tutkittu jo joitakin vuosia ja näistä tutkimuksista on valmistunut väitöskirja (Kvaalen 1994). Projektia johtaa Harald Kvaalen ja tutkimuksissa keskitytään tällä hetkellä seuraaviin kysymyksiin:

- (1) Mitkä tekijät säätelevät alkioiden kehittymistä, kypsymistä ja itämistä?
- (2) Mikä merkitys on varastolipideillä alkioiden itämiselle?
- (3) Onko kypsymisjakson lämpö- ja valo-olosuhteilla jälkivaikutusta taimien kasvuun?

Alkioiden kehittyminen bioreaktorissa alkaa olla suhteellisen hyvin selvitetty. Niiden kypsymistä säädellään sokerien, osmomolaarisuuden ja ABAn (abskissihappo) avulla. Tavoitteena on tuottaa alkioita, jotka voidaan kuivattaa 5%:n vesipitoisuuteen, pakastaa, varastoida -20°C ja idättää sulattamisen jälkeen. Tämä tavoite alkaa jo olla lähes saavutettu. Suurimmat ongelmat liittyvät alkioiden itämiseen. Somaattisista alkiosta itäneillä siementaimilla on usein vaillinaisesti kehittyneet sirkka-lehdet ja sekä verson että juurten kasvu on heikompaa kuin siementaimilla. Valo-

olosuhteilla, mm. valon laadulla, näyttää olevan merkittävä vaikutus itämiseen ja kasvuun. Sen lisäksi tulokset viittaavat siihen, että gametofyytti erittää ainetta (aineita), jolla on suuri merkitys itämiselle. Tämä gametofyyttitekijä on toistaiseksi tunnistamaton, mutta todennäköisesti se ei ole mikään tavallisista kasvuhormoneista.

Tutkimuksessa selvitetään myös eri tekijöiden (ABA, osmomolarteetti, happi) vaikutusta varastolipidien muodostumiseen kypsymisvaiheen aikana. Sen lisäksi on tarkoitus puhdistaa ja sekvenssoida kuusen siementen oleosiinejä, sekä verrata somaattisten ja tsygoottisten alkioiden lipidimetaboliaa ja lipidien vaikutusta alkioiden itämiseen.

Jälkivaikutusten tutkimukset ovat osa pohjoismaista projektia. Nämä tutkimukset ovat vielä alkuvaiheessa, mutta alustavat tulokset viittaavat siihen, että alhainen lämpötila kypsymisvaiheen aikana edistää alkioiden itämistä.

### **Kuusen resistenssimekanismit**

Toinen molekyylibiologinen projekti NISK'issä liittyy kuusen resistenssi-mekanismiin (Sharma et al. 1992). Projektin vetäjänä toimii Anders Lønneborg. Resistenssitutkimus liittyy sekä pohjoismaiseen että kansainväliseen yhteistyöhön. Tutkimuksen yhtenä tavoitteena on selvittää *Pythium dimorphum*-sieni-infektion aktivoimia geenejä. Useita cDNA klooneja on jo eristetty tarkempia tutkimuksia varten. Yksi niistä näyttää olevan tioniinigeeni, toinen peroksidaasigeeni. Pohjoismaisen projektin puitteissa näiden geenien vaikutuksia on tarkoitus tutkia geenisiirtojen avulla.

Tähän projektiin liittyy myös tutkimus, jossa selvitetään ns. PR-proteiinien (pathogen related) merkitystä kestävyysmekanismeissa. Lønneborgin ryhmä on eristänyt kuusen juurista PR-proteiineja, jotka muodostavat komplekseja polyfenolien kanssa. Infektion yhteydessä nämä kompleksit hajoavat ja PR- proteiinit vapautuvat ja aktivoituvat. Nämä proteiini-polyfenoli-kompleksit voivatkin edustaa uutta resistenssimekanismia.

Kansainvälisen projektin tavoitteena on kehittää testimenetelmiä, joiden avulla voidaan määrittää kuusen taimien kestävyys *Ophistoma ulmi*-sientä vastaan. Norjalaisen osuus tässä projektissa liittyy kuusen kitinaasien eristämiseen ja karakterisoimiseen (Sharma et al. 1993).

### *Alnus/Frankia* symbioosi

Tromssan yliopiston kasvifysiologian ja mikrobiologian osaston yhtenä pääprojektina on tutkia kasvien ja mikrobien välisten symbioosien fysiologista ja molekyylibiologista perustaa. Tutkimukset ovat kohdistuneet ennen kaikkea palkokasvien ja *Rhizobium*-bakteerien välisiin vuorovaikutussuhteisiin ja näissä tutkimuksissa onkin viime vuosina tapahtunut huomattavaa edistymistä. Myös *Alnus/Frankia* symbioosia on jonkin verran tutkittu, mutta sen molekyylibiologinen tausta on vielä huonosti tunnettu. *Frankian* aiheuttamat juurinystyrät poikkeavat kehityksensä ja rakenteensa puolesta *Rhizobium*-nystyröistä. Niiden kehityksessä on yhteispiirteitä sivujuurten kehittymisen kanssa mikä tekeekin niiden molekyylibiologisen taustan tutkimisen varsin mielenkiintoiseksi. Tämä tutkimus on ollut osa eurooppalaista yhteisprojektia, johon on osallistunut tutkimusryhmiä Hollannista ja Ruotsista. Tromssassa tehty tutkimus on keskittynyt selvittämään symbioosin kehittymiseen liittyvien signaalimolekyylien merkitystä ja rakennetta. Pääosa tuloksista on julkaistu väitöskirjana (Van Ghelue 1994).

### Fytokromi ja kasvun säätely

Päivänpituudella on keskeinen osuus pohjoisten puulajien kasvun säätelyssä. Lyhyt päivä käynnistää prosessit, jotka johtavat kasvun päättymiseen ja talveentumiseen. Näiden prosessien fysiologia ja molekyylibiologia on heikosti tunnettua. Kasvit havaitsevat sekä päivänpituuden että valon laadun muutokset fytokromi-systeemin avulla (Smith 1995). Fytokromitutkimus edistyy tällä hetkellä varsin ripeästi. Kasveissa on vähintään viisi erilaista fytokromia, A, B, C, D ja E. Fytokromiperheen jäsenistä tunnetaan parhaiten fytokromi A ja B, joiden geenit on eristetty ja kloonattu jo useista kasveista. Tromssan yliopiston kasvifysiologian osastolla on nyt käynnissä tutkimusprojekti, jossa selvitetään fytokromi A ja B geenien vaikutusta hybridihaavan (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) taimien kasvuun, karaistumiseen ja hormonifysiologiaan. Tutkimus suoritetaan yhteistyönä ruotsalaisen ryhmän kanssa (prof. Göran Sandberg ja prof. Olle Olsson, Umeå). Tutkimukseen sisältyy kasvatuskokeita siirtogeenisillä taimilla. Toistaiseksi kokeissa on käytetty taimia, jotka tuottavat normaalia enemmän joko fytokromi A:ta tai fytokromi B:tä. Projektin tarkoituksena on myös tutkia puumaisten kasvien (haapa, koivu, paju) endogeenisiä fytokromeja. Toistaiseksi fytokromigeenejä on eristetty vain ruohomaisista kasveista. Alustavat tulokset fytokromi A:ta ylimääräintuottavilla taimilla viittaavat siihen, että fytokromi A vaikuttaa sekä nivelvälien pituuskasvuun että kasvin kykyyn reagoida päivänpituuteen.

Puulajien provenienssien väliset erot liittyvät läheisesti siihen, kuinka kasvit reagoivat päivänpituuteen. Niin kutsuttu kasvun kannalta kriittinen päivänpituus riippuu provenienssien kasvupaikan leveysasteesta, mitä pohjoisempi alkuperä, sen pitempi on kasvuun tarvittava päivänpituus. On mahdollista, että tällaiset erot liittyvät osaksi kasvien fytochromin laatuun ja/tai määrään. Fytokromi-tutkimus avaa uusia mahdollisuuksia selvittää provenienssien välisten erojen fysiologista taustaa.

Kasvuhormoneilla on ilmeisesti merkittävä osuus kasvun päättymiseen liittyvien tapahtumien säätelyssä. Gibberelliinin vaikutus liittyy lähinnä kasvun ja kasvun päättymisen säätelyyn (Junttila 1991, Olsen 1995), abskisiinihappo taas näyttää osallistuvan karaistumisen ja mahdollisesti myös lepotilan säätelyyn (Powell 1987). Lehtipuiden pituuskasvu näyttää olevan riippuvainen gibberelliini A1:stä ja on mahdollista, että päivänpituus säätelää gibberelliinin biosynteesiä. Useat tutkimustulokset viittaavat fytochromin ja hormonien väliseen yhteisvaikutukseen ja riippuvuuteen, mutta mahdollisten yhteisvaikutusten tarkempi luonne on selvittämättä. Käynnissä olevassa fytochromiprojektissa on tarkoitus lähestyä kysymystä m.m. tutkimalla siirtogeenisten taimien hormonitasapainoa, etenkin gibberelliinin, abskisiinon ja auksiinien osuutta.

### Kirjallisuutta

- Junttila, O. 1991. Gibberellins and regulation of shoot elongation in woody plants. Ks. Takahashi, N., Phinney, B. O. & MacMillan, J. (toim.): Gibberellins., Springer-Verlag, New York, s. 199-210.
- Kvaalen, H. 1994. Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Interactions between the gaseous environment and growth regulators. Ph. D. Thesis, NLH, s, Norway. ISBN 82-575-0223-5.
- Martinussen, I. B. 1994. Characterization of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) pollen as a system for transformation and molecular studies. Ph. D. Thesis, University of Tromsø, Tromsø. ISBN 82-902-5604-3.
- Olsen, J. E. 1995. Gibberellins and the photoperiodic control of shoot elongation in *Salix pentandra*. Ph. D. Thesis, NLH. ISBN 82-575-0246-4.
- Powell, L. E. 1987. Hormonal aspects of bud and seed dormancy on temperate-zone woody plants. HortScience 22:845-850.
- Sharma, P., Børja, D., Stougaard, P. & Lønneborg, A. 1992. Host-pathogene interactions in roots of Norway spruce. Ks. Fritig, B. and Legrand, M. (toim.): Mechanisms in Plant Defence Responses. s. 372.
- , Stougaard, P. & Lønneborg, A. 1993. Induction of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases in roots of Norway spruce after infection with a pathogenic *Pythium* sp. isolate. Physiol. Mol. Plant Pathol. 43: 57-67.
- Smith, H. 1995. Physiological and ecological function within the phytochrome family. Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol. 46:289-316.
- Van Ghelue, M. 1994. Interactions in actinorhizal symbioses. I. Root hair deformation factor(s) produced by *Frankia* strain Ar13. II. Expression of sucrose synthase and enolase in root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Ph. D. thesis, University of Tromsø, Tromsø, Norway. ISBN 82-993222-0-0.





**Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja sarjassa julkaistut Punkaharjun tutkimusaseman tiedonannot:**

Nro 263. Punkaharjun metsänjalostuspäivä 1986.

Nro 372. Teijo Nikkanen. Punkaharjun puulajipuiston kehittäminen. 1991.

Nro 525 Juhani Häggman ja Esko Oksa (toim.) Metsänjalostusta Punkaharjulla jo  
70 vuotta. Metsäntutkimuspäivä Olavinlinnassa 1993

**Muita saatavilla olevia Punkaharjun tutkimusasemaan ja alueeseen liittyviä painotuotteita:**

Punkaharjun tutkimusalue. 1992.

Montellin reitti - kohdeselosteet. 1992

Punkaharjun luonnonsuojelualue ja tutkimuspuisto. 1994.

KT-Paino, Punkaharju 1995

ISBN 951-40-1475-8  
ISSN 0358-4283