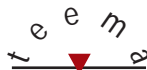


Tuija Aronen

# Biotekniikan sovellukset tulevat – muuttuvatko metsänjalostuksen mallit?



## Jalostuksen perusmalli ja biotekniikan menetelmät

Metsäpuiden jalostus perustuu olemassa olevan muuntelun hyödyntämiseen; jalostaja pyrkii valitsemaan parhaat puut sukua jatkamaan. Puiden ilmiössä näkyvästä muuntelusta ( $V_P$ ) kuitenkin vain osa, perimästä johtuva muuntelu ( $V_G$ ) on jalostajan käytettävissä metsänviljelyaineiston parantamiseksi. Jalostuksen ”perusmallin”  $V_P = V_G + V_E + V_{GE}$  muut tekijät  $V_E$  ja  $V_{GE}$  kuvaavatkin ympäristöstä ja ympäristön ja perimän yhdysvaikutuksesta aiheutuvaa muuntelua, jonka erottaminen perinnöllisestä muuntelusta on jalostuksen keskeinen ongelma. Jalostustyötä mutkistaa vielä se, että perinnöllisestäkin muuntelusta vain osa, ns. additiivinen eli geenien ”hyvyydestä” tai ”huonoudesta” itsestään johtuva muuntelu ( $V_A$ ) on suoraan hyödynnettävissä. Perinnöllistä muuntelua kokonaisuudessaan voidaan kuvata mallilla  $V_G = V_A + V_D + V_I$ , jossa  $V_D$  on saman geenin eri muotojen, alleelien, keskinäisestä dominanssista johtuva muuntelu ja  $V_I$  kuvaa eri geenien keskinäisiä yhdysvaikutuksia. Suvullisessa lisääntymisessä perintötekijät yhdistyvät uudelleen, ja suotuisat  $V_D + V_I$ -vaikutukset liittyvät näin syntyneisiin edullisiin geeniyhdistelmiin.

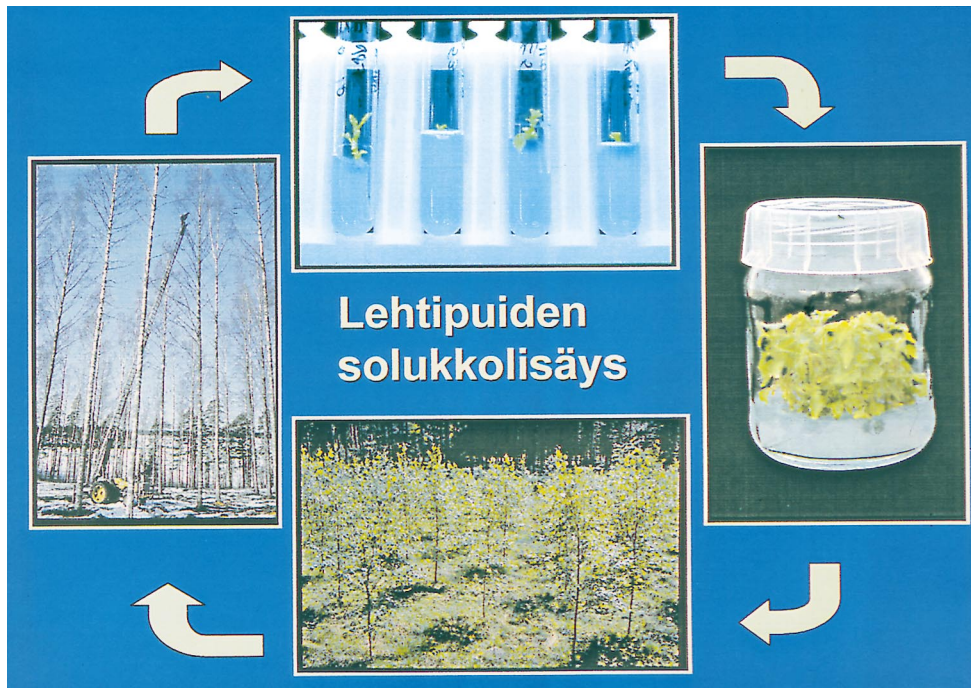
Metsäpuiden biotekniikkaan kuuluu puiden solukoviljely, materiaalin säilytys syväjäädätyksen avulla, geenitekniikan menetelmät ja erilaiset molekyyli- ja geenimarkkereiden sovellukset. Kasvullisen lisäyksen tekniikoista myös pistokasmonistusta voidaan tehostaa biotekniikan keinoin kuten käyttämällä kasvi-

hormonikäsittelyjä, agrobakteereja tai sienijuurisieniä apuna juurrutuksessa. Geenitekniikka puolestaan sisältää eri ominaisuuksiin vaikuttavien perintötekijöiden tunnistamisen, eristämisen, toimintatavan tutkimisen ja sen mahdollisen muokkaamisen tai ko. geenien siirtämisen toisiin yksilöihin tai lajeihin. Molekyyli- ja geenimarkkerit ovat helposti ja luotettavasti havaittavissa olevia biokemiallisia merkkejä, jotka vaihtelevat eri puuyksilöissä ja voivat myös kytkeytyä johonkin tiettyyn ominaisuuteen. Perinteisesti markkereina on käytetty esimerkiksi terpeenejä ja isoentsyymejä. Nykyään valtaosa käytetyistä markkereista on perintöaineksesta itsestään eri menetelmillä löydettävissä olevia DNA-merkkejä.

Biotekniikkaa ei toistaiseksi ole juuri hyödynnetty metsäpuiden jalostuksessa, lähinnä koska osa menetelmistä on kotoisilla lajeillamme vielä tutkimus- ja kehittämisvaiheessa. Uudet menetelmät tuovat mukanaan uusia mahdollisuuksia, joten on syytä pohtia, miten biotekniikkaa voitaisiin soveltaa käytännön metsänjalostuksessa ja kuinka uusien menetelmien käyttö vaikuttaisi metsänjalostusohjelmiin. Romuttuvatko vanhat mallit vai tarjoavatko ne sittenkin tukevan rungon biotekniikan tuoreille versoille?

## Kloonimateriaalilla tarkempaa tietoa entistä nopeammin

Puissa esiintyvän muuntelun eri lähteitä ja yksittäisten puiden jalostusarvoja on perinteisesti arvioitu



**Kuva 1.** Lehtipuiden solukkolisäys perustuu organogeneesiin eli elinsyntyiseen menetelmään. Koivun solukkolisäys voidaan aloittaa talvisista kasvusilmuista, jotka saadaan kasvamaan solukkoviljelyalustalla. Niistä tuotetaan edelleen jälkisilmuja, jotka monistetaan versoiksi ja juurrutetaan. Kuvat Jouko Lehto.

niiden jälkeläisten ominaisuuksien perusteella. Kloonitestausta tarjoaa vaihtoehdon puiden asettamiseksi paremmuusjärjestykseen ja valitsemiseksi seuraavan polven jalostus- ja lisäyspopulaatioihin. Edellytyksenä kloonitestaukselle on käytännön mittakaavassa toimiva kasvullisen lisäyksen menetelmä. Tärkeimmistä metsäpuistamme tällainen on olemassa koivulle, kuuselle ja haavalle. Lehtipuiden solukkolisäys onnistuu vanhoistakin puista (kuva 1), sen sijaan kuusen kasvullinen lisäys on aloitettava nuoresta materiaalista käytettiin menetelmänä siten pistokaslisyästä tai kasvullisten alkioiden tuotantoa solukkoviljelyllä. Männyllekin on kehitetty sekä pistokkaiden juurrutusmenetelmiä että erilaisia solukkoviljelymenetelmiä (kuva 2), mutta yksikään näistä ei ole vielä kyllin tehokas käytännön metsänviljely- tai kloonitestausta aineiston tuottamiseksi.

Arvioitaessa muuntelun eri osatekijöitä kloonitestausta on monia etuja verrattuna perinteisiin joko

puoli- tai täyssisarperheillä tehtyihin jälkeläiskokeisiin (Burdon ja Shelbourne 1974). Ensimmäkin ympäristöstä johtuva muuntelu ( $V_E$ ) nähdään suoraan kloonien sisäisenä vaihteluna. Toisaalta kloonien sisäinen vaihtelu on paljon pienempää kuin siemenperheiden sisäinen vaihtelu, jolloin kloonien väliset erot tulevat selvemmin esille kuin vastaavat siemenperheiden väliset erot ja  $V_G$  pystytään arvioimaan suhteellisesti tarkemmin kloonikokeesta kuin  $V_A$  jälkeläiskokeesta. Toisin sanoen, halutun tarkkuuden saavuttamiseksi tarvitaan vähemmän kloonin- kuin siementaimia, mikä pienentää sekä kentäkokeiden fyysistä tilantarvetta että kustannuksia. Kun ominaisuuden periytyvyys eli perinnöllisen muuntelun osuus kokonaismuuntelusta ( $V_G/V_P$  tai  $V_A/V_P$ ) on pieni, korostuu kloonitestausta tehokkuus. Kloonikokeissa voidaan myös arvioida ympäristön ja perimän yhdysvaikutusta ( $V_{GE}$ ) yksilötasolla, jolloin saadaan tietoa genotyyppien sopeutumisesta erilaisiin oloihin. Tästä voi puolestaan olla



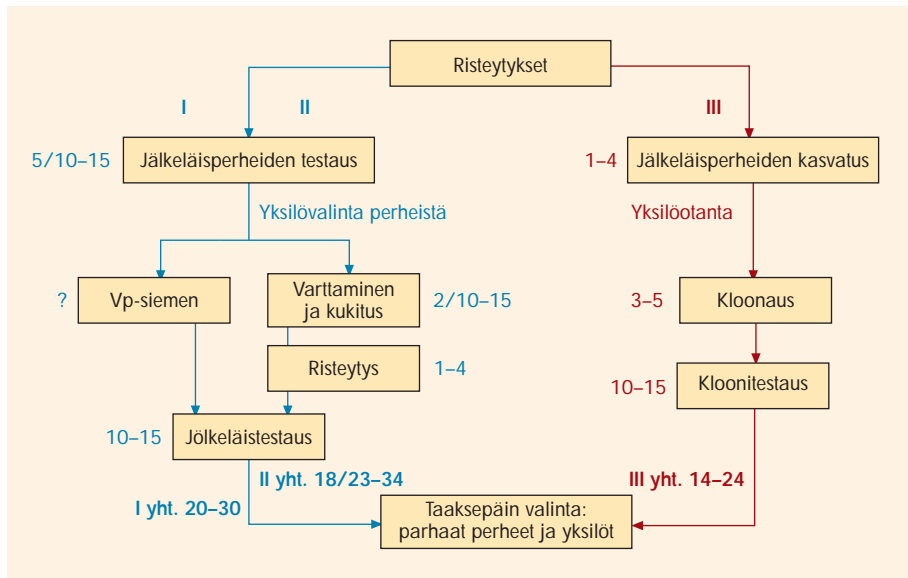
**Kuva 2.** Havupuiden solukkolisäyksessä yleisin menetelmä on kasvullisten alkioiden tuotanto. Männyn tapauksessa lähtömateriaalina käytetään epäkypsää siemenalkiota, josta tuotetaan alkionmuodostuskykyistä solukkoa. Solukkuun syntyneet kokonaiset alkiot idätetään ja koulitaan kasvihuoneoloihin. Kuvat Jouko Lehto.

hyötyä, jos pyritään valitsemaan joko tietyille kasvupaikoille sopivia puita tai vaihtoehtoisesti aineistoa, joka on mahdollisimman hyvin sopeutunut muuttuviin ympäristöoloihin.

Kloonitestausta voi paitsi tehostaa valintaa, myös nopeuttaa sitä. Metsänjalostusohjelmien etenemiseksi on olemassa useita vaihtoehtoisia malleja, joista suurin osa perustuu risteytyksistä syntyneiden perheiden ja niistä valittujen yksilöiden jälkeläisten testaamiseen. Suomessa näitä malleja on laatinut mm. Jouni Mikola Metsänjalostussäätiössä. Vertailemalla oheisia hänen malleistaan poimittuja esimerkkejä, joissa kaikissa päämääränä on parhaiden perheiden ja yksilöiden taaksepäin valinta, voidaan havaita, että puulajista riippuen aikaa säästetään 4–10 vuotta yhtä jalostuskierrosta kohden, kun testattavien puiden kukitus ja jälkeläistestaus korvataan niiden kloonitestauksella (kuva 3). Ruotsissa on tutkittu käytännön mittakaavassa myös kasvullisen lisäyksen eri menetelmien soveltuvuutta

kuusen jalostusohjelmaan. Högbergin ym. (1998) mukaan kuusen kloonimateriaali kannattaa tuottaa solukkoviljelyllä pistokaslisäyksen sijasta, sillä näin voidaan edelleen säästää aikaa kolme vuotta jalostuskierrosta kohti.

Kloonitestausta on ehdottomasti tehokkain tapa valita parhaat puut, jos niitä myös jatkossa lisätään kasvullisesti. Kasvullinen viljelyaineiston tuottaminen takaa samalla myös sen, että koko  $V_G$  pystytään hyödyntämään käytännössä. Tehokkuuden vastapainona kloonimetsätaloudessa on perinnöllisen monimuotoisuuden kaventuminen. Suvullista metsänviljelyaineiston lisäystä käytettäessä  $V_D + V_I$ -vaikutukset voivat muuttaa kloonitestauksen tuloksia – yksilöinä parhaat puut eivät välttämättä tuotakaan parhaita jälkeläisiä risteytyessään keskenään. Kloonitestaukseen liittyy myös tahattoman valinnan riski, erityisesti havupuiden kasvullisten alkioiden tuoton kautta tapahtuvan solukkolisäyksen yhteydessä. Puuyksilöiden solukkoviljeltävyys vaihtelee



**Kuva 3.** Jouni Mikolan laatimista malleista poimittuja esimerkkejä valintajalostuksen etenemisvaihtoehdoista metsänjalostusohjelmissä: I) valinta vapaapölytyssiemenellä tehtyjen jälkeläiskokeiden perusteella, II) valinta kontrolloituja risteytyksiä seuraavien jälkeläiskokeiden perusteella ja III) valinta kloonitestauksen perusteella. Kaavion luvut kertovat arvion eri vaiheisiin kuluva ajasta vuosina eri puulajeilla (koivu/havupuut).

eikä kaikista puista saada monistettua taimia lainkaan. Tietoa siitä, kytkeytykö solukkoviljeltävyyden jalostuksen kohteena oleviin tai muuten tärkeisiin ominaisuuksiin on vielä niukalti. Kuusella tehdyn tutkimuksen mukaan korrelaatioita kasvullisten alkioiden tuottokyvyn ja kloonien kasvu- tai fenologiaominaisuuksien välillä ei kuitenkaan ole (Högborg ym. 1998).

### Geeniteknikka – muuntelun rajat rikki

Geeniteknikan avulla voidaan jalostustyön pohjana olevaa perinnöllistä muuntelua ( $V_G$ ) laajentaa joko siirtämällä puihin aivan uusia geenejä tai muokkaamalla olemassa olevien toimintaa. Kotoisista lajeistamme geeninsiirtotekniikka toimii suhteellisen varmasti koivulla ja haavalla. Myös kuusesta on saatu tuotettua siirtogeenisiä taimia, joskaan tuloksia ei ole julkaistu. Männyllä tekniikka on edelleen kehitteillä. Metsänjalostuksen ja kotoisten lajien kannalta mielenkiintoisimpia tutkimuskoh-

teita ovat puiden lisääntymisjärjestelmät (Strauss ym. 1995, Walter ym. 1998) ja puuraaka-aineen tekniseen ja kemialliseen laatuun liittyvät ominaisuudet, kuten rungon ja latvuksen rakenne (Lehner ym. 1995, Aronen 1996) sekä ligniinin määrä ja laatu (Boerjan ym. 1997, Baucher ym. 1998).

Puuraaka-aineen laatuominaisuuksien geenitekni- nen muokkaaminen ei sinällään vaikuttane metsänjalostuksen toimintamalleihin vaan lähinnä jalostuksen lopputuotteena olevan viljelymateriaalin laatuun eli saavutettavaan jalostushyötyyn. Sen sijaan jos havupuumme voitaisiin geenitekniikan keinoin saada kukkimaan jo hyvin nuorina, vain muutaman vuoden ikäisinä, lyhentäisi se jokaista jälkeläistestaukseen perustuvaa jalostuskierrosta (ks. kuva 3) jopa 10–15 vuodella. Varhaisen kukkimisen aiheuttavien siirtogeenien tulisi kuitenkin periytyä mendelistisesti, jolloin siirtogeenisen kloonin ja tavallisen puun risteytyksessä puolet jälkeläisistä pitäisi olla normaaleja. Tällöin niiden ominaisuuksia voitaisiin luotettavasti arvioida ja siten saada oikea kuva testattavien yksilöiden keskinäisestä paremmuudesta.

Tässä ajatusrakennelmassa siirtogeenisiä kloonveja käytettäisiin siis vain jalostuksen testausvaiheen nopeuttamiseen, normaali viljelyaineisto sen sijaan tuotettaisiin perinteiseen tapaan käyttäen alkuperäisiä yksilöitä, joista varhain kukkivat kloonit tehtiin.

Geenitekniikka on erinomainen tutkimusväline, mutta siirtogeenisen materiaalin käyttämisessä metsänjalostuksessa ja edelleen viljelymetsätaloudessa on vielä monia avoimia kysymyksiä. Ensinnäkin geenitekniikka kohdistuu aina yksilöihin. Parhaita kohteita geeninsiirroille olisivat ominaisuuksiltaan hyvin tunnetut ja hyväksi havaitut puut. Nykyisin käytössä olevat geeninsiirtomenetelmät perustuvat kuitenkin taimien tuottamiseen solukkoviljelyllä, mikä ei onnistu aikuisilla havupuilla. Geeninsiirtoja voidaan tehdä myös alkuiden tai nuorten taimien solukoihin tai siitepölyyn, mutta tällöin kohdeyksilöt eivät välttämättä ole muilta ominaisuuksiltaan toivotunlaisia. Myös siirtogeenisten puiden hyödyntäminen käytännön viljelyssä edellyttäisi lajin kasvullisen lisäyksen hallintaa, sillä vielä ei ole olemassa tietoa siitä, miten siirtogeenit käyttäytyvät siirtogeenisten puiden risteytyessä keskenään tai muiden puiden kanssa.

Metsäpuiden ominaispiirteet ja metsäluonnon monimuotoisuus tulee myös ottaa huomioon sovellettaessa geenitekniikkaa. Tärkeimpien metsäpuidemme populaatioissa on paljon perinnöllistä muuntelua ja ne ovat sopeutuneet hyvin monenlaisiin ympäristöihin. Tämän monimuotoisuuden ylläpito siirtogeenisessä aineistossa edellyttäisi, että sama geenitekkinen muunnos pystyttäisiin tekemään moniin eri yksilöihin. Puut ovat pitkäikäisiä, joten siirtogeenin tulisi toimia halutulla tavalla vuosikymmeniä ja siitä korjuuhetkellä saatavan hyödyn pitäisi vastata kehittämiskustannuksia. Puiden ristisiittoisuus ja tuulipölytteisyys puolestaan levittävät siirtogeenit ympäröiviin luonnonmetsiin, jollei siirtogeenisistä puista tehdä kukkimattomia. Ylipäänsä siirtogeenien vaikutuksia ympäröivään eliöyhteisöön tulisi metsäpuiden kysymyksessä ollen pohtia tarkoin – metsää, toisin kuin peltoviljelmiä, ei uudisteta kerran vuodessa. Siirtogeenien mahdolliset vaikutukset metsäekosysteemiin riippuvat tietenkin paljon geneeistä itsestään: esimerkiksi puiden ominen, latvuksen muotoon vaikuttavien geenien tai bakteeriperäisten hyönteiskestävyyttä lisäävien geenien yleistyminen edustavat ekologisesti eri riskitasoja.

## Rajattomien mahdollisuuksien molekyyli-markkerit

Molekyyli-markkerien käytöllä on ainakin teoriassa liki rajattomat sovellusmahdollisuudet metsänjalostuksessa. Ensinnäkin markkeritekniikoiden avulla saadaan tietoa puupopulaatioissa olevasta perinnöllisestä muuntelusta. Tätä tietoa tarvitaan valittaessa puita metsänjalostusohjelmien piiriin, esimerkiksi kun tavoitteena on koota olemassa oleva muuntelu mahdollisimman edustavasti yhteen joukkoon tai välttää sukulaisten valitsemista. Markkereita käyttämällä voidaan myös yksittäiset puut tunnistaa, olipa kyseessä sitten siemenviljelyksille vartettujen kloonien tai tehtyjen risteytysten tarkistaminen. Markkereiden tunnistusominaisuuksia voidaan edelleen hyödyntää myös valvottaessa kloonaineiston kauppaa. Suurimmat odotukset markkeritekniikoiden soveltamisesta metsänjalostukseen kohdistuvat kuitenkin niiden avulla tehtävään valintaan.

Markkeriavusteisen valinnan ideana on, ettei puita tai niiden jälkeläisiä enää tarvitsisi kasvattaa kentäkokeissa perinnöllisten ominaisuuksien selville saamiseksi. Sen sijaan valinta voitaisiin tehdä heti, kun taimet ovat kyllin isoja, jotta niistä voidaan eristää DNA:ta ja tutkia siitä jalostettavaan ominaisuuteen kytkeytyneitä merkkigenejä. Markkeriavusteinen valinta sopisi metsänjalostuksen menetelmäksi erityisesti silloin kun valinnan kohteena ovat ominaisuudet, jotka ovat useiden geenien säätelemiä, huonosti periytyviä tai joita on vaikeaa luotettavasti mitata nuorista puista. Ominaisuuksia, joille esimerkiksi poppeli-, eukalyptus- ja mäntylajeista on löydetty DNA-merkkejä, ovat mm. tiettyjen sienitautien kestävyys, puun tiheys ja pituus- tai tilavuuskasvu. Kotimaisista lajeistamme molekyyli-markkereita on tutkittu niin koivulla, kuusella kuin männylläkin, mutta jalostuksen kohteena oleviin ominaisuuksiin kytkeytyneitä merkkigeneistä ei ole toistaiseksi raportoitu.

Luotettavien merkkigeenien löytäminen vie kuitenkin oman aikansa ja aiheuttaa myös kustannuksia. Ensin on laadittava riittävän tiheä geenikartta, josta markkereita sitten etsitään. Geenikarttoja tehtäessä puolestaan käytetään usein jostakin tietystä risteytyksestä polveutuvaa puuaineistoa. Markkereiden löytämisen jälkeenkin on vielä varmistuttava niiden käyttökelpoisuudesta erilaisessa perinnöllisessä

taustassa eli toisista risteytyksistä syntyneissä perheissä ja myös eri-ikäisessä ja erilaisessa ympäristössä kasvaneessa aineistossa. Ranskalaiset Plomion ym. (1998) ovat vertailleet markkeriavusteisen valinnan ja perinteisen kenttäkokeisiin perustuvan testauksen tehoa rannikkomännyn (*Pinus pinaster*) pituuskasvun jalostamisessa huomioiden myös kustannukset. Kun valinta tehdään perheiden sisällä kenttäkokeen 10-vuotiaista puista ja 80 perheestä valitaan kustakin kolme parasta 70 taimesta, saadaan pituuskasvua parannettua 8,2 %. Markkeriavusteista valintaa käyttäen kasvun parannus olisi 13,3 %, mikä vastaa perinteistä testausta käyttäen yhden yksilön valitsemista 11 800 taimen perheestä. On kuitenkin syytä muistaa, että useamman ominaisuuden jalostaminen merkikgeenejä hyödyntäen vaatii myös moninkertaisen panostuksen markkerien kehittämiseen ja lisäksi on mahdollista, ettei kaikille ominaisuuksille löydy luotettavia markkereita.

### Muuttuvatko metsänjalostuksen mallit?

Biotekniikan sovellukset, erityisesti kloonimateriaalin käyttö testauksessa ja markkeriavusteisen valinta voivat sekä tehostaa että nopeuttaa metsänjalostusta ja siltä osin siis myös muuttaa nykyisiä toimintamalleja. Jalostuksen perustana olevia biologisia malleja biotekniikan soveltaminen ei muuta, vaikka se voikin vaikuttaa sen tiedon laatuun ja tarkkuuteen, jota pystymme näiden mallien tekijöistä hankkimaan. Uusilla tekniikoilla on myös rajoituksensa ja niitä sovellettaessa tulee ottaa huomioon metsänjalostuksen ja -viljelyn muodostama kokonaisuus. Pohjoisissa oloissamme tärkeä osa metsänjalostusta on puiden ilmastollisesta sopeutuneisuudesta ja riittävästä perinnöllisestä monimuotoisuudesta huolehtiminen. Toistaiseksi myös suurin osa jalostetusta metsänviljelyaineistosta tuotetaan suvullisen lisäämisen kautta. Perinteinen valintajalostus jälkeläistestauksineen pysyneeikin metsänjalostuksen perusmenetelmänä, johon puulajista ja jalostustavoitteista riippuen voidaan yhdistää biotekniikan sovelluksia suuremman jalostushyödyn saavuttamiseksi entistä nopeammin.

### Kirjallisuus

- Aronen, T. 1996. Genetic transformation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 595 – The Finnish Forest Research Institute, Research Papers 595. 53 s. + 6 alkuperäisartikkeliä.
- Baucher, M., Monties, B., van Montagu, M. & Boerjan, W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 125–197.
- Boerjan, W., Baucher, M., Chabbert, B., Petit-Conil, M., Leple, J.C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., van Montagu, M., van Doorselaere, J., Inze, D., Jouanin, L., Tsai, C.-J., Podila, G.K., Joshi, C.P. & Chiang, V.L. 1997. Genetic modification of lignin biosynthesis in quaking aspen (*Populus tremuloides* × *P. alba*). Julkaisussa: Klopfenstein, N.B., Chun, Y.W., Kim, M.-S. & Ahuja, M.R. (toim.). *Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus*. USDA Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. General Technical Report RM-GTR-297. s. 193–205.
- Burdon, R.D. & Shelbourne, C.J.A. 1974. The use of vegetative propagules for obtaining genetic information. *New Zealand Journal of Forestry Science* 4(2): 418–425.
- Högberg, K.-A., Ekberg, I., Norell, L. & von Arnold, S. 1998. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 1536–1545.
- Lehner, A., Campbell, M.A., Wheeler, N.C., Pöykkö, T., Glössl, J., Kreike, J. & Neale, D.B. 1995. Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. f. *pendula*). *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1092–1094.
- Plomion, C., Durel, C.É. & Verhaegen, D. 1996. Utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers: exemple du pin maritime et de l'eucalyptus. *Annales des Sciences Forestières* 53: 819–848.
- Strauss, S.H., Rottmann, W.H., Brunner, A.M. & Shepard, L.A. 1995. Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. *Molecular Breeding* 1: 5–26.
- Walter C., Carson S.D., Menzies M.I., Richardson T. & Carson M. 1998. Review: Application of biotechnology to forestry – molecular biology of conifers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 321–330.

■ MMT Tuija Aronen (tuija.aronen@metla.fi) toimii tutkijana Metlan Punkaharjun tutkimusasemalla.