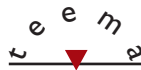


Tapio Palva

Koivun funktionaalinen genomitutkimus – perusta tulevaisuuden metsänjalostukselle



Metsänjalostus – kohti genomiikan aikakautta

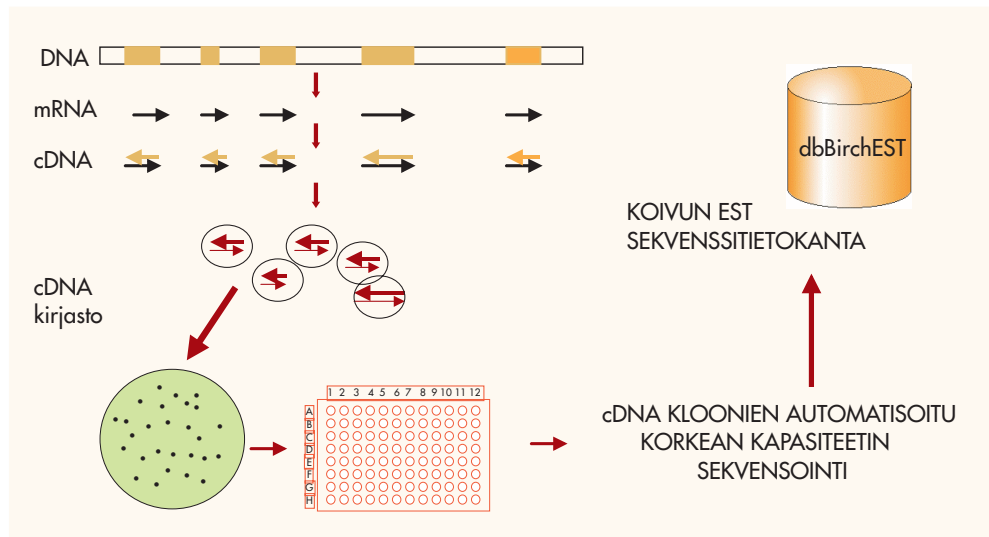
Verrattuna maatalouskasvien pitkäaikaiseen ja tehokkaaseen jalostukseen, joka on nostanut näiden satotasoa monikymmenkertaiseksi, parantanut kasvien viljelyominaisuuksia sekä sadon laatua, metsänjalostus kulkee vielä lapsenkengissä. Kun monet viljelykasvit ovat läpikäyneet satojen sukupolvien valinta- ja risteytysjalostuksen, monet metsäpuut ovat olleet vasta muutaman sukupolven jalostuksen kohteena. Eräänä pääongelmana on puiden pitkä sukupolvenväli ja se, että halutut ominaisuudet voidaan traditionaalisin menetelmin todeta usein vasta täysikasvuisista yksilöistä; perinteisessä metsänjalostuksessa tutkija ei aina edes elinaikanaan ehdi nähdä, miten jalostettavat ominaisuudet ovat siirtyneet jälkeläisille, koska puiden kasvu täysikäiseksi voi kestää vuosikymmeniä. Metsäpuissa on siten valtava käyttämätön jalostuspotentiaali, jonka hyödyntämiseksi modernit molekyyli­genetiikan ja genomiikan menetelmät ovat avaamassa aivan uusia mahdollisuuksia.

Tätä jalostuspotentiaalia ollaan nyt hyödyntämässä funktionaalisen genomitutkimuksen avulla. Maailmassa on viime vuosina käynnistetty useita metsäpuiden genomien selvittämiseen ja genomitiedon hyödyntämiseen tähtäviä projekteja esim Ruotsissa poppelin, USAssa loblollymännyn ja Suomessa koivun geenistön tunnistamiseen johtavat projektit. Metsäpuiden genomien selvittäminen tulee mullista-

maan koivun ja muiden metsäpuiden jalostuksen. Genomitiedon avulla voidaan tunnistaa keskeiset geenit, jotka vaikuttavat puun eri ominaisuuksiin kuten kasvuun, taudinvastustus­kykyyn ja puuaineksen muodostumiseen. Tunnistettuja genejä voidaan siten käyttää merkkeinä jalostettaville ominaisuuksille, jolloin jo pienestä taimesta voidaan todeta sisältääkö se halutuista ominaisuuksista vastaavat geenit ja valita tulevat pluspuut jo taimitasolla.

Genomien tuntemus modernin biologian perusta

Eri eliöiden kuten bakteerien, kasvien ja eläinten perimän eli genomien rakenteen ja toiminnan analysointi etenee maailmalla kiihtyvällä vauhdilla ja yhä uusien lajien perimän emäs­järjestyksen selvittämisestä raportoidaan lähes viikottain. Genomitutkimuksesta on tullut oleellinen osa modernia biologiaa ja se on keskeisessä asemassa selvitetessä solujen ja eliöiden toimintaa sekä pyrittäessä hyödyntämään tätä tietoa erilaisissa bioteknisissä sovelluksissa. Useiden malliorganismien genomit on jo selvitetty tai valmistuvat lähivuosina (esim. monet kymmenet bakteerigenomit, hiiva, lituruoho, riisi, banaanikärpänen, ihminen) ja geenistön emäs­järjestyksen analysointi on nopeasti laajenemassa muihin lajeihin ja ryhmiin esimerkkinä monet hyötykasvit (maissi, poppeli, koivu). Geenien rakenteen ja toiminnan tunteminen tulee olemaan se perustieto, jo-



Kuva 1. EST, oikotie geenien löytämiseen.

hon koko moderni biologia yhä enenevässä määrin nojaa ja johon monet biologian sovellukset tulevat perustumaan.

Kasvun ja laatuominaisuuksien geenit, genomitutkimus avuksi

Voidaksemme tulevaisuudessa vaikuttaa puiden kasvuun, kestävyysominaisuuksiin ja puuaineksen laatuun, meidän on ensinnäkin tunnettava ne geenit, jotka kontrolloivat näitä ominaisuuksia. Jotta geneejä voitaisiin tutkia, on ne ensin löydettävä ja eristettävä. Haluttujen yksittäisten geenien eristäminen jostain tietystä eliöstä, kuten koivusta on kuitenkin työlästä ja aikaa vievää. Genomitutkimuksen odotettua nopeampi kehitys on kuitenkin antanut käsiimme aivan uusia työkaluja geenien eristämiseen ja tunnistamiseen. Sen sijaan, että lähdetäisiin hakemaan yksittäisiä geneejä, selvitetäänkin ensin tutkittavan lajin koko aktiivinen genomi ja sitten tutkitaan, mitkä tunnistetut geenit liittyvät tiettyyn ominaisuuteen, esim. kylmänkestävyyteen ja talvehtimiseen. Keskeinen virstanpylväs kasvien genomitutkimuksessa saavutettiin vuonna 2000 kun mallikasvin, lituruohon noin 125 miljoonan emäsparin ja 26 000 geenin perimä selvitettiin kansainvälisenä yhteishankkeena. Näin kasvitkin on liitetty niiden eliöiden kasvavaan jouk-

koon, joiden koko perimä on selvitetty. Tähän joukkoon on muutama kuukausi sitten liitetty myös eräs tärkeimmistä viljelyskasveista, riisi.

EST-tekniikka – nimilaput geneille.

Kokonaisten genomien sekvensointi, eli perimän koko emäsjärjestyksen määrittäminen, on vielä nykyisillä tekniikoillakin kallista ja aikaa vievää työtä korkeammilla eliöillä kuten kasveilla. Koko genomien sekvensoinnin sijasta voidaan kuitenkin keskittyä pelkästään sen aktiiviseen osaan, geneihin. Korkeampien eliöiden perimästä vain murto-osa on aktiivista eli sisältää proteiineja koodaavia geneejä. Loppuosan merkitystä emme vielä tiedä, mutta sen osallistuminen solun fysiologisiin prosesseihin lieenee nykytietämyksen valossa melko vähäinen. Esimerkiksi koivun genomissa on noin 470 miljoonaa emäsparia. Näistä vajaa kymmenen prosenttia sijaitsee aktiivisissa geneeissa, joita koivulla arvioidaan olevan noin 30 000.

EST (*expressed sequence tag*) -tekniikka mahdollistaa pelkästään geenien sekvensoinnin jättäen genomien muun DNA:n huomioimatta. EST-tekniikassa lähdetään liikkeelle DNA:n sijasta lähetti-RNA:sta, jota solussa valmistavat ainoastaan toimivat geenit. Eristetystä RNA:sta puolestaan valmiste-

taan käänteiskopioinnilla DNA-kopiot, jotka kloonataan niin sanotuksi cDNA-kirjastoksi. Kirjaston sisältämät kloonit edustavat solukossa aktiivisina olleita geenejä ja niistä on suoraan luettavissa alkupe-
räisten geenien emäsjärjestys. EST-sekvensoinnissa määritetään kirjaston kustakin cDNA kloonista osittainen sekvenssi, joka useimmiten riittää cDNA:ta vastaavan geenin tunnistamiseen. Sekvensointi toteutetaan automatisoidun, korkean kapasiteetin sekvensointilaitteiston ja robottien avulla, jolloin vuorokaudessa voidaan tuottaa sekvenssitietoa sadoista geneista. Tällainen laitteisto on Suomessa hankittu Helsingin yliopiston Viikin biokeskukseen.

Sekvensoinnin jälkeen geenit pyritään tunnistamaan yksilöllisesti. Niitä muun muassa verrataan olemassaoleviin tietokantoihin talletettuihin geenisekvensseihin. Geenin yksiselitteiseen tunnistamiseen riittää usein jo se, että osa sekvenssistä on onnistuttu määrittämään, geneille saadaan nimilaput (tags). Tämä informaatio tallennetaan tietokantaan, joka esim. koivulla tulee olemaan keskeinen referenssi metsäpuiden biologisten prosessien ymmärtämiseksi ja geenien hyödyntämiseksi metsänjalostuksessa.

Funktionaalinen genomiikka – avain geenitoiminnan ymmärtämiseksi

Geenien tunnistaminen ja rakenteen määrittäminen on siten vasta ensimmäinen askel niiden toiminnan ymmärtämiseksi. Genomiprojektien tuottaman rakenteellisen informaation hyödyntäminen funktionaalisen genomiikan keinoin biologisten prosessien toiminnan ja mekanismien selvittämiseksi tulee olemaan tämän vuosikymmenen biologian keskeisin tehtävä. Funktionaalisen genomiikan tärkeimpiä työkaluja ovat mm. koko genomien laajuinen geenien ilmentymisen selvittäminen (geenien ekspressioprofilointi) mikrosiruteknologiaa hyväksikäyttäen ja geenien sammuttaminen siirtogeenitekniikoiden ja/tai mutaatioiden avulla.

Mikrosirutekniikan kehitys on mullistanut geenitoiminnan analysoinnin. Kun viime vuosiin asti tutkijat ovat voineet seurata vain muutamien, parhaassa tapauksessa muutamien kymmenien geenien ilmenemistä samanaikaisesti, voidaan nyt mikrosiruja hyväksikäyttäen selvittää jonkin lajin kaikkien tai

lähes kaikkien geenien samanaikainen ilmenemisaktiivisuus tutkittavissa olosuhteissa. Analyysissä hyödynnetään EST-kloonien sitoutumista niitä vastaaviin lähetti-RNA-molekyyleihin. Värjäämällä kahden erilaisista olosuhteista eristetyn lähetti-RNA-populaation DNA-kopiot eri väreillä ja antamalla näiden kilpailla sitoutumisesta lasilevyille kiinnitettyjen EST-sekvenssien kanssa, voidaan määrittää kunkin geenin suhteellinen aktiivisuustaso eri tilanteissa. Täten voidaan tunnistaa ne säätelyperheet, regulonit, jotka osallistuvat tiettyyn prosessiin. Esimerkiksi voimme tunnistaa kaikki geenit, jotka osallistuvat koivun talvehtimisen ja pakkasenkestävyyden säätelyyn niiden ilmenemisaktiivisuuden perusteella.

Siirtogeeniset kasvit – välttämätön työkalu geenien toiminnan selvittämisessä

Geenitoiminnan ymmärtämiseksi tarvitaan yllä kuvattun ekspressioprofiloinnin lisäksi erityisesti siirtogeenitekniikoita, joiden avulla voidaan testata ilmenemisprofiilin perusteella valittujen geenien vaikutus esim. koivun ominaisuuksiin. Siirtämällä eristetty geeni koivuun nurinpäin käännettynä (ns. antisense-muodossa) voidaan alkuperäinen geeni sammuttaa ja saada siten selville geenituotteen merkitys ja vaikutukset kasvin ilmiasuun (fenotyyppiin), esim. talvenkestävyyden kehittymiseen. Vastaavasti voidaan geenin vaikutusta ilmiasuun selvittää tuottamalla siirretyn geenin tuotetta normaalia enemmän. Nämä tavat sopivat erityisesti säätelygeenien toiminnan tutkimiseen, jolloin voidaan vaikuttaa koko säätelyperheeseen samanaikaisesti ja vaikutukset ilmiasuun ovat myös suuremmat.

Vastaavaa analyysiä voidaan tehdä myös mutanttien avulla hyödyntäen mallikasvia, lituruohoa (*Arabidopsis*). Tällöin voidaan minkä tahansa koivun geenin, mikäli sille löytyy vastineeni lituruohon genomista, ja sen mahdollisesti kontrolloiman säätelyperheen toimintaa tutkia lituruohon mutanttien avulla käyttäen hyväksi olemassa olevia järjestettyjä mutanttikokoelmia. Vaikka metsäpuista kuten koivusta ei ole olemassa mutanttikokoelmia voidaan vastaavantyyppistä geenitoiminnan profiilointia tehdä esim. hyödyntäen eri ilmastollisia ekotyyppisiä. Lisäksi selvärajaisten ekotyyppien ole-

massaolo mahdollistaa tärkeimpien geenien paikantamisen koivun genomiin, niihin liittyvien kvantitatiivisten geenilokusten (QTL, *quantitative trait loci*) suhteen.

Koivun genomitutkimus Suomessa – kansainvälistä metsäpuiden genomiikan kärkeä

Suomessakin on ymmärretty genomitutkimuksen valtava merkitys tulevaisuuden metsänjalostukselle ja käynnistetty Viikin Biokeskuksessa kolme vuotta sitten Tekesin ja Suomen Akatemian rahoituksella laajamittainen koivun EST sekvensointi -projekti. Vaikka projekti käynnistyi jonkin verran myöhemmin kuin vastaavat projektit Ruotsissa ja USA:ssa olemme sekvensoinnin suhteen kirineet heidät kiinni ja projektien välille onkin syntyneessä tiivis yhteistyö. Koivun EST -projekti, jota nyt tehdään kasvimolekyylibiologian ja metsäpuiden biotekniikan huippuyksikössä neljän tutkimusryhmän yhteistyönä (Palva, Heino, Helariutta, Kangasjärvi), on jo varsin pitkällä, yli 70 000 koivun geenisekvenssiä on jo tuotettu ja tavoitteena on vuoden loppuun mennessä tuottaa kokoelma, joka sisältää suurimman osan koivun geneeistä. Seuraavana vaiheena on sekvenssitiedon hyödyntäminen mikrosirujen ja siirtogeenisten kasvien avulla.

Tutkimusohjelmamme ja tutkimusyksikkömme pää tavoitteena on selvittää puiden kasvun, puunmuodostuksen, stressinsiedon ja fysiologisen sopeutumisen sekä kukkimisen (yhteistyössä Joensuun yliopiston kanssa) molekulaarinen tausta ja hyödyntää saatua tietoa metsäpuiden jalostuksessa. Siten EST-projekti on erityisesti keskittynyt näihin prosesseihin liittyvien geenien identifiointiin. Haluttujen geenien rikastaminen on toteutettu tekemällä spesifiset cDNA-kirjastot mm. alhaiselle lämpötilalle, lyhyelle päivänpituudelle, taudinaiheuttajille tai oksidatiiviselle stressille altistettujen koivujen lehdistä ja varsista, koivun puuta muodostavasta jälsikudoksesta sekä kukista. Sekvenssivertailujen avulla on voitu alustavasti jaotella geenit toiminnallisiin ryhmiin ja tunnistaa lukuisia mielenkiintoisia tutkittaville prosesseille diagnostisia rakenne- ja säätelygenejä. Erityisen mielenkiintoista on geenien toimintaa ohjaavien säätelygeenien tunnistaminen, joi-

den avulla voidaan määrittää ne säätelyperheet, regulonit, jotka ovat oleellisia esim. stressivasteelle tai puuaineksen muodustumiselle. Tunnistamattomien geenien suuri joukko koivun kirjastoissa (lähes kolmannes) puolestaan viittaa siihen, että mm. koivulla tutkittaviin prosesseihin liittyy monia uusia ennen tunnistamattomia mekanismeja. Tästä ryhmästä löytyy todennäköisesti aivan uudentyyppisiä genejä, joilla voi olla suuri merkitys esim. koivun kasvun säätelylle ja talvehtimiselle.

Koivusiru – metsänjalostuksen perustyökalu

Tutkimusyksikkömme tavoitteena on tuottaa seuraavassa vaiheessa suuren osan koivun geneeistä sisältävä mikrosiru tutkijoiden ja jalostajien käyttöön. Tämä siru tulee olemaan perustyökalu, jonka avulla voidaan tutkia mitä tahansa koivun ominaisuutta ja tunnistaa siihen liittyvät geenit ja säätelyperheet, ja jolla tulee olemaan erittäin suuri merkitys kaikelle Suomessa tehtävälle metsäpuiden molekylibiologiselle tutkimukselle. Lisäksi se tulee olemaan erittäin hyödyllinen myös jalostajille identifioitaessa haluttuihin ominaisuuksiin liittyviä genejä. Tällä hetkellä testaamme pientä, alle tuhannen koivun geenin sisältävää koesirua ja varsinaisen koko geenistön sisältävää sirua aletaan kehittää ensi vuoden aikana. Sirututkimuksen tulosten perusteella tullaan sitten myös valitsemaan ne kandidaattigeenit, joilla on oletettavasti suuri merkitys tutkittaviin prosesseihin kuten puun kasvuun tai talvehtimiseen, ja joiden toiminta ja rooli näiden ominaisuuksien määräytymisessä selvitetään tarkemmin siirtogeenisten koivujen avulla. Saatua informaatio ei ole suinkaan käyttökelpoista pelkästään koivulle vaan sitä voidaan hyödyntää vastaavien geenien ja ominaisuuksien tutkimiseen ja jalostustoimintaan muissa metsäpuissa.

Koivu – erinomainen metsäpuumalli

Mallikasvina tutkimuksissa käytämme kansallispuutamme koivua, joka soveltuu havupuita huomattavasti paremmin biologisten mekanismien ja prosessien molekyylitason selvittämiseen. Metsäalan tutkimusohjelmassa juuri koivu onkin valittu erään-

laiseksi metsäpuumalliksi. Koivu on tärkein lehtipuumme, jonka merkitys talouspuuna on kasvussa; oletettu ilmaston lämpeneminen tulee myös suosimaan koivua. Se on geneettisesti hyvä mallikasvi, josta on olemassa erinomaista risteytysaineistoa. Koivusta on myös olemassa hyvin karakterisoitua kloonimateriaalia ja sitä on erittäin helppo ja nopea kasvattaa myös laboratorio-olosuhteissa, mm. solukkoviljely- ja geeninsiirtomenetelmät ovat jo rutiinia. Vauhtikukittamalla saadaan koivun sukupolvenväli jäämään alle vuoden pituiseksi. Koivun genomi on havupuiden genomiin verrattuna pieni, mikä helpottaa suuresti molekyylogeneettistä työtä. Koivusta eristettävät geenit ovat suoraan hyödynnettävissä myös muilla metsäpuilla tehtävässä työssä.

Metsäpuiden funktionaalisen genomitutkimuksen merkitys

Metsätalous muodostaa edelleen Suomen talouden perustan, joten sen tuottavuuden ja kilpailukykyyn parantamiseen tähtävällä strategisella tutkimuksella on suuri merkitys koko kansantaloudelle. Kuten edellä on kuvattu, tarjoaa moderni genomitutkimus aivan uusia mahdollisuuksia metsänjalostukseen ja puuraaka-aineen ominaisuuksien parantamiseen. Koko biologisen tutkimuksen mullistanut genomiikan valtava kehitys on johtanut siihen, että voimme lähivuosina tunnistaa keskeiset solujen ja organismien toimintaa säätelevät geenit sekä selvittää molekyyllitasolla niiden toimintamekanismit. EST-sekvensointi ja vastaavien geenien toiminnallinen analyysi mahdollistaa puun kasvuun, stressivasteisiin ja puuaineen muodostumiseen vaikuttavien keskeisten geenien tunnistamisen ja toiminnan ymmärtämisen. Saatu tieto on suoraan hyödynnettävissä metsänjalostukseen; toisaalta geenejä voidaan yhteistyössä metsänjalostajien kanssa käyttää

kiinnostavien ominaisuuksien molekyyli-markkereinä perinteisessä jalostuksessa, geenimerkkien avulla voidaan helposti valita halutunlaiset ominaisuudet sisältävät puuyksilöt jo taimitasolla ja saadaan nopeasti tuotettua taimimateriaalia eri käyttötarkoituksiin. Toisaalta geenejä voidaan haluttaessa hyödyntää myös ominaisuuksien jalostamiseen siirtogeneenteillä. Tavoitteena on saada mm. ilmastolisiin muutoksiin paremmin sopeutuvaa, taudeille vastustuskykyistä hyvälaatuista puuta, räätälöitynä eri käyttötarkoituksiin.

Viitteitä

- Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A. & Shinozaki, K. 2002. Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science* 296: 141–145.
- , Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. & Shinozaki, K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61–72.
- Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J. & al. (1998) Gene discovery in the wood forming tissue of poplar: Analysis of 5692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13330–13335.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408: 796–815.
- Akatemiaprofessori Tapio Palva, Biotieteiden laitos, Perinnöllisyystieteen osasto ja Biotekniikan instituutti. Sähköposti tapio.palva@helsinki.fi www.biocenter.helsinki.fi/