

Nurmikasvien geneettinen tutkimus – haasteena timotei

Maria Erkkilä¹⁾, Pirjo Tanhuanpää¹⁾ ja Outi Manninen¹⁾

¹⁾ MTT Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Kasvigenomiikka, Myllytie 1, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

Tiivistelmä

Bioteknisillä menetelmillä, kuten DNA-merkeillä, pystytään nopeuttamaan myös nurmikasvien jalostusta. Nurmikasveista tutkituimpia ovat raiheinät (*Lolium*) ja nadat (*Festuca*), joilla on diploidi perimä (kaksinkertainen kromosomisto). Tutkimuksen kannalta haasteellisempia ovat polyploidiset kasvit, koska niiden periytyminen on monimutkaisempaa. Tämän tutkimuksen kohteena oli timotei (*Phleum pratense*), joka on heksaploidi (kuusinkertainen kromosomisto) ja jonka periyttämistapa on vielä epäselvä. Tutkimuksen pitkän tähtäimen tavoitteena on tehostaa timotein lajikejalostusta siten, että viljelijöillä olisi tulevaisuudessa käytössään satoisa, talvenkestävä, kasvurytmiltään optimaalinen ja sulavuudeltaan korkeatasoinen timoteilajike. Yhtenä tavoitteena oli tuottaa timoteijalostajien käyttöön valintatyökaluiksi DNA-merkkejä, jotka liittyvät soluseinän sulavuuteen ja talvituhosienten kestävyteen. Tutkimusmateriaalina käytettiin kahta Boreal Kasvinjalostuksessa tuotettua timoteijälkeläistöä. Toisessa jälkeläistössä vaihteli rehun sulavuus. Kandidaattigeenianalyysin avulla haettiin rehun sulavuuteen liittyvien geenien edullisia geenimuotoja eli alleeleita. Toinen jälkeläistö testattiin *Typhula ishikariensis* -talvituhosienenkestävyyden suhteen, johon liittyviä kromosomialueita etsittiin bulkkianalyysin avulla. Kummankaan em. analyysin käytöstä timoteilla ei ole aiempaa kokemusta. Löytyneet DNA-merkit selittivät vain pienen osan ominaisuuksissa havaitusta vaihtelusta, mikä ei ole yllättävää ottaen huomioon timotein heksaploidin ja heterotsygoottisen perimän. Kuitenkin edulliseen alleeliin liittyvää DNA-merkkiä on mahdollista käyttää valintatyökaluna lajikejalostuksessa. Projektissa selvitettyjen rehun sulavuuteen vaikuttavien timotein ligniinibiosynteesigeenien sekvenssit tallennettiin Geenipankin tietokantaan. Tämä on merkittävä lisä timotein geenitietoon, sillä aiemmat timoteisekvenssit geenipankeissa ovat lähinnä siitepölyallergeenien genejä. Nyt päättyneen hankkeen materiaalia ja tuloksia voi jatkossa käyttää paitsi käytännön kasvinjalostustyössä myös kotimaisissa ja pohjoismaisessa nurmitutkimuksessa.

Asiasanat

DNA-merkit, rehun sulavuus, talvehtiminen, timotei

Johdanto

Tutkimuksen pitkän tähtäimen tavoitteena on tehostaa timotein lajikejalostusta siten, että viljelijöillä olisi tulevaisuudessa käytössään satoisa, talvenkestävä, kasvurytmiltään optimaalinen ja sulavuudeltaan hyvä timoteilajike. Timotein tärkein jalostustavoite on satotason kohottaminen. Rehusato koostuu pääsadosta sekä niiton jälkeisestä jälkikasvusadosta. Erityisesti jälkikasvukyvyssä esiintyy suurta perinnöllistä vaihtelua. Monivuotisen timotein talvenkestävyyden parantaminen on tärkeällä sijalla jalostusohjelmissa. Talvenkestävyysvalinta tehdään perinteisesti kentällä. Tärkein yksittäinen jalostustavoite on mustapahkulasien (*Typhula ishikariensis*) kestävyys. Talvenkestävyyden jalostusta vaikeuttaa jälkikasvukyvyn ja talvehtimiskyvyn välinen negatiivinen korrelaatio.

Kasvigenomiikka tarjoaa uudenlaisen näkökulman kasvin kehityksen kaikkiin vaiheisiin: itämiseen, erilaistumiseen, kasvuun ja stressin sietoon. Kasvigenomiikan kautta saatava tieto tulee suuresti muuttamaan kasvinjalostusprosesseja. Timotein DNA-tieto on kuitenkin vähäistä eikä sen geenien rakennetta tunneta tarkasti. Timotein perimärakennetta voidaan kuitenkin pyrkiä ymmärtämään muiden ns. mallilajien geenitietouden kautta. Tässä tutkimuksessa käytimme useita toisiaan täydentäviä bioteknisiä menetelmiä, kuten bulkianalyysi (bulked segregant analysis), kandidaattigeenianalyysi sekä vertaileva genomiikka. Bulkianalyysiä käytetään etsittäessä haluttuun ominaisuuteen liittyviä DNA-merkkejä. Kaksi bulkkinäytettä (esim. altis bulkki ja kestävä bulkki) muodostetaan yhdistämällä DNA:ta useammasta yksilöstä ominaisuusjakauman ääripäistä (esim. mahdollisimman alttiit ja kestävät yksilöt). DNA-merkki, joka esiintyy vain toisessa bulkissa, sijaitsee mahdollisesti lähellä ominaisuuteen vaikuttavaa geeniä ja analysoidaan koko jälkeläistössä tuloksen varmistamiseksi. Kandidaattigeenianalyysissä pyritään etsimään DNA-merkkejä geneistä, jotka vaikuttavat tai joiden arvellaan vaikuttavan tutkittuun ominaisuuteen. Tässä tutkimuksessa haettiin eroavaisuuksia ligniinibiosynteesitien geneistä cinnamyylialkoholidehydrogenaasi ja ortometyylitransferaasi, jotka vaikuttavat soluseinän rakenteeseen ja sitä kautta rehun sulavuuteen. Vertailevaa genomiikkaa käytettiin hyväksi suunnittelemalla alukkeet raiheinän ja nadan geenitietoon perustuen. Näillä alukkeilla saatiin vastaavat geenit monistettua timoteista.

Kasvigenomiikkatutkimuksen tavoitteena oli tuottaa timotein jalostajien käyttöön valintatyökaluiksi DNA-merkkejä, jotka liittyvät soluseinän sulavuuteen ja talvituhosienten kestävyteen.

Aineisto ja menetelmät

Tutkimusmateriaalina käytettiin kahta aiemmin Boreal Kasvinjalostuksessa tuotettua timoteijälkeläistöä. Timoteiyksilöiden KAS8 ja KAS9 risteytysjälkeläisissä (laatu-jälkeläistö) vaihteli rehun sulavuus. Toinen jälkeläistö (risteytys Tammisto II x Nosappu) testattiin *Typhula-talvituhosienenkestävyyden* suhteen.

Kesällä 2006 kerättiin laatu-jälkeläistön ensimmäisestä sadosta näytteet tähkälle tulon aikaan (optimikorjuu) ja 10 päivää sen jälkeen (myöhästetty korjuu). Laatu-jälkeläistön jokaisesta jälkeläisestä määritettiin Boreal Kasvinjalostuksessa NIRS-tekniikan avulla useita rehulaatua kuvaavia arvoja [raakavalkuainen, kuitu (iNDF, NDF ja ADF), D-arvo]. Genotyypin vaikutus kaikkiin tutkittuihin ominaisuuksiin oli tilastollisesti erittäin merkitsevä ($P < 0.001$) ja genotyyppi selitti 38 - 74% näytteiden välisestä vaihtelusta riippuen ominaisuudesta sekä siitä, oliko kyseessä lehti-, korsi- vai kokonaisnäyte.

Rehun sulavuuteen liittyviä DNA-merkkejä etsittiin kandidaattigeenianalyysin avulla. Kandidaattigeneiksi valittiin ligniinibiosynteesitien geneistä cinnamyylialkoholidehydrogenaasi ja ortometyylitransferaasi. Raiheinän ja nadan geenitietoa käytettiin hyväksi suunnittelemalla alukkeet *omt-* ja *cad-*geenien monistamiseksi timoteista. Timotein geenit sekvenssoitiin käyttämällä Amersham Biosciences MegaBace-laitetta ja Sequencher-ohjelmaa. SNP (single nucleotide polymorphism) –analysoinnissa käytettiin MegaBace SNP profiler –ohjelmaa yhdessä MegaBace SNUpe Genotyping kitin kanssa.

Timoteijälkeläistön Tammisto II x Nosappu tauditestaukset mustapahkulasienellä tehtiin MTT Rovaniemen tutkimusasemalla (Oiva Nissinen). Timoteijälkeläistö tartutettiin sekä sklerootioilla että sienisuspensiolla. Oraat havainnoitiin kolmesti. Havaintojen perusteella laskettiin kullekin jälkeläiselle taudinkestävyysindeksi, joka perustui sekä elossa olevien kasvien määrään että kasvien toipumisnopeuteen.

DNA-analyysien haettiin *Typhula*-kestävyyteen ja rehun sulavuuteen liittyvien geenien edullisia geenimuotoja eli alleleita. *Typhula*-kestävyyteen liittyvien merkkien etsinnässä käytettiin bulkianalyysia ja kestävyysindeksin perusteella valittiin kestävään ja alttiiseen bulkkiin tietyt kahdeksan yksilöä kumpaankin. DNA-merkkeinä käytettiin AFLP (amplified fragment length polymorphism), REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism), SRAP (sequence-related amplified polymorphism) ja SSR (simple sequence repeat) -merkkejä. Merkkien liittyminen kestävyteen testattiin t-testillä tai Mann-Whitneyn U-testillä. Joinmap-ohjelmalla laskettiin DNA-merkkien väliset kytkennät ja NQTL-ohjelmalla paikallistettiin kestävyteen liittyvä alue kytkentäryhmässä.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

DNA-merkkien kehittäminen rehun sulavuuteen

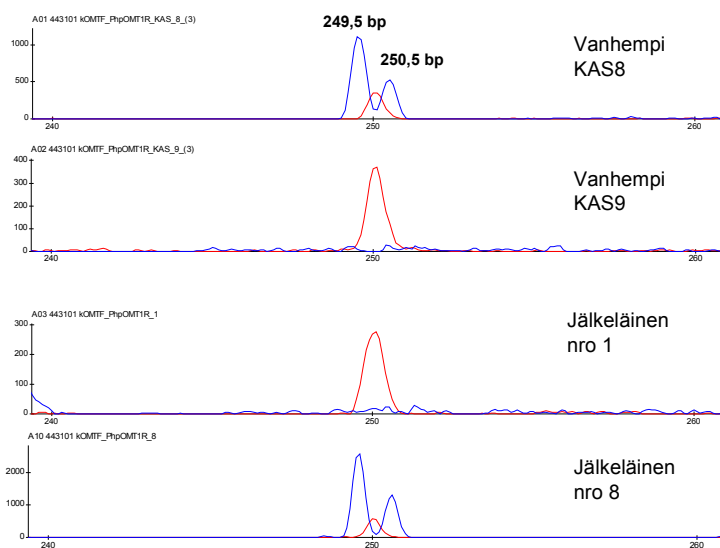
Cinnamyylialkoholidehydrogenaasi (*cad*)-geeni kloonattiin ja sekvenssoitiin vanhemmista KAS8 ja KAS9. Geenipankkiin tallennettiin KAS9:n genomisen sekvenssi numerolla DQ358689. Sekvenssi on 1074 bp pitkä ja sisältää kolme eksonia sekä kaksi intronia. Verrattaessa timotein eksonisekvenssiä raiheinän (*Lolium perenne*) kolmeen mRNA-sekvenssiin nähdään, että timotein *cad*-geeni vastaa raiheinän *cad1*-geeniä. Vanhempien *cad*-geenisekvensseistä löydettiin 17 yhden emäksen eroavaisuutta eli SNP -kohtaa, joista 7:llä testattiin koko jälkeläistö eli 86 yksilöä. SNP-kohdat ovat eksonissa, paitsi SNP6 on intronissa. Timoteilta löysimme kaksi ortometyyliitransferaasi (*omt*)-geeniä. Toinen vastaa raiheinän geeniä *omt1* sekä ruokonadan (*Festuca arundinacea*) geeniä *comt1b* ja *c*. Toinen löytämämme geeni on raiheinän *omt3*-geenin kaltainen. Geenipankkiin tallennettiin KAS8:n genomisen sekvenssi (1330 bp) numerolla FJ211269. Vanhempien välillä löydettiin 16 SNP-kohtaa, joista 5:llä testattiin koko jälkeläistö. Kehitetyt SNP-merkit eivät toimineet toivotulla tavalla. Kummastakaan geenistä ei kyetty löytämään yksittäistä SNP-eroa, jolla olisi kyetty identifioimaan tietty KAS8 tai KAS9 spesifinen alleeli. Opimme, että polyploidin kasvin kohdalla SNP-merkkien luotettava käyttö edellyttää genomisepesifisten SNP-merkkien kehittämistä.

KAS8:n *omt*-geenin 3 kloonista löytyi poikkeavaa sekvenssiä verrattuna muihin KAS8 klooneihin. Kohdassa 250 bp on kaksi kertaa toistojakso GAA, mutta 3 poikkeavassa kloonissa vain kerran. Deleetio vaikuttaa todennäköisesti siten, että se poistaa aminohapon lysiini (AAG). Kapillaarielektroforeesissa KAS8:lla nähdään 249,5 ja 250,5 bp:n kokoiset monistustuotteet. KAS9 ei tee tämän kokoista tuotetta lainkaan. (Kuva 1.) Sulavuusjälkeläistön 18 jälkeläisellä 86:sta havaittiin KAS8:lle tyypillinen deleetio *omt*-geenissä. Deleetion ja laatuominaisuuksien välillä löytyi useita tilastollisesti merkitseviä yhteyksiä, mutta parhaimmillaankin selitysasteet jäivät alhaisiksi. Myöhästetyssä niitossa ko. DNA-fragmenttien esiintyminen selitti noin 9 % lehtien sulavuudessa havaitusta vaihtelusta eli noin 12 % ominaisuuden geneettisestä vaihtelusta. Timotein kuusinkertainen perimä todennäköisesti heikentää mahdollisuuksia löytää suurivaikutteisia alleleita.

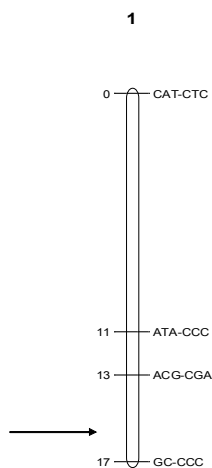
DNA-merkit talvituhosientenkestävyydelle

Typhula-kestävyysindeksin perusteella muodostetut kestävä ja altis bulkki testattiin yhteensä 139 AFLP-, 90 REMAP- ja 36 SRAP-alukeyhdistelmällä sekä 27 mikrosatelliitilla. Etsimme DNA-merkkejä, jotka monistuvat vain toisesta bulkista. Lupaavilta näyttävät alukeyhdistelmät testattiin useammassa jälkeläisessä. Seitsemän parasta DNA-merkkiä (5 AFLP:tä ja kaksi SRAPia) analysoitiin koko jälkeläistössä (164 kpl). Kuusi merkeistä liittyi *Typhula*-kestävyyteen ja kestävyteen liittyvä merkki oli peräisin Tammisto II:lta, jonka kestävyys on parempi kuin Nosappu-vanhemman.

SRAP-merkit olivat kytketyneet vain toisiinsa, mutta AFLP:t muodostivat oman kytkentäryhmänsä, joka sisälsi *Typhula*-kestävyyteen vaikuttavan kromosomialueen. Lähin merkki sijaitsi 1.6 cM:n päässä ominaisuuteen vaikuttavasta lokuksesta (QTL eli *quantitative trait locus*, kuva 2.). QTL selittää 9 % *Typhula*-kestävyyden vaihtelusta.

OMT

Kuva 1. Ortometyyli transferaasi-geenissä löytyvä ero risteytysvanhempien välillä sekä esimerkkinä kaksi jälkeläistä kapillaarielektroforeesijossa. Sinisellä merkitty monistuva PCR-tuote, joka liittyy rehun sulavuuteen ja punaisella kokostandardi 250 bp.



Kuva 2. Kytkentäryhmä sisältää talvituhosienten kestävyyyteen vaikuttavan QTL:n, joka selittää ominaisuuksien vaihtelusta 9 %. Nuoli osoittaa QTL-kohdan.

Johtopäätökset

Löysimme timoteinjalostajille sulavuuteen ja *Typhula*-kestävyyteen liittyviä DNA-merkkejä. *Typhula*-kestävyyteen liittyvät merkit löytyivät bulkianalyysin avulla ja sulavuuteen liittyvät kandidaattigeenianalyysin avulla. Kummankaan menetelmän käytöstä timoteilla ei ole koko maailmassa aiempaa kokemusta. Löytyneet merkit eivät kuitenkaan selittäneet kovin merkittävää osaa ominaisuuksissa havaitusta vaihtelusta. Toisaalta timotein heksaploidin, heterotsygoottisen perimän huomioiden tämä ei ole kovin yllättävää. Projektissa selvitetty timotein ligniinisynteesigeenien sekvenssit tallennettiin Geenipankin tietokantaan. Tämä on merkittävä lisä timotein geenitietoon, sillä aiemmat timoteisekvenssit geenipankeissa ovat lähinnä siitepölyallergeenien geenejä. Nyt päättyneen hankkeen materiaalia ja tuloksia voi jatkossa käyttää paitsi käytännön kasvinjalostustyössä myös kotimaisissa ja pohjoismaisissa nurmitutkimuksissa.