

## Uusia puolustusaineita gerberasta

Miia Ainasoja, Ursula Malm, Anja Lampio, Satu Koskela ja Teemu Teeri

*Gerberalaboratorio, Soveltavan biologian laitos, Latokartanonkaari 7, PL27, 00014 Helsingin yliopisto; teemu.teeri@helsinki.fi*

### Tiivistelmä

Kasvien syntetisoimien kemiallisten yhdisteiden (sekundäärimetaboliittien) kirjo on laaja ja suhteessa tähän monimuotoisuuteen vain muutamien yhdisteiden biokemiallinen synteeseireitti tunnetaan. Leikko- ja ruukkukasvina kasvatettava sädelatva eli gerbera (*Gerbera hybrida*, Asteraceae) tuottaa maanpäällisiin osiinsa kahta glukosidista karvasainetta, gerberiiniä ja parasorbosidia. Jälkimmäinen tunnetaan myös pihlajan karvasaineena. Glukosidit sellaisenaan torjuvat hyönteistuhoilta, ja sieniperäisten taudinaiheuttajien läsnäollessa ne hajotetaan aglykoneiksi joilla on sienitauteja torjuva vaikutus. Olemme tutkineet gerberan sekundääriaineenvaihdunnan tuotteita ja niistä vastaavia geenejä, ja löytäneet avaingeenin, joka johtaa gerberiinin ja parasorbosidin biosynteesiin. Yhdisteet muodostuvat asetyyli-CoA:sta ja malonyyli-CoA:sta reaktiossa, jonka ensimmäistä vaihetta katalysoi kasveille tyypillinen polyketidisyntaasiperheeseen kuuluva entsyymi. Vastaavanlaisia yhdisteitä tunnetaan sienistä ja bakteereista, mutta aiemmin ei tiedetty niitä esiintyvän myös kasveilla.

Uutettavan gerberiiniaglykonin määrä eri gerberalajikkeissa korreloi harmaahomeen (*Botrytis cinerea*) kestävyuden kanssa. Gerberiini/parasorbosidireitin aktiivisuus toimii siten merkkiominaisuutena taudinkestävyydelle ja mahdollistaa kestävyystestauksen ilman taudinaiheuttajaa. Tutkimuksemme yhtenä tavoitteena on selvittää miten tämä merkkiominaisuus on helpoin mitata lajiketestauksessa. Vaihtoehdot ovat metaboliittien kemiallinen analyysi, lähetti-RNA:n analyysi tai DNA-testi.

Tutkimuksemme laajempaan tavoitteeseen on osoittaa gerberasta löydetyn gerberiini/parasorbosidireitin hyödynnettävyys pelto- ja puutarhakasvien kestävyysjalostuksessa. Mikäli reitti saadaan koottua toimivaksi uudessa kohdekasvissa, on odotettavissa että se toimii hyvin laajasti lähötömetaboliittien ollessa perusaineenvaihdunnan välituotteita.

Esitetyllä metabolisella kestävyysjalostuksella on todennäköisesti laaja sovellettavuusala, joka viime kädessä riippuu kunkin hyötykasvin tautien ja tuholaisten herkkyydestä k.o. aineille. Ensimmäinen sovellusala olisi puutarhassa ja kasvihuoneella viljeltävät koristekasvit. Soveltaminen elintarvikkeiden raaka-aineisiin edellyttää toksikologisia tutkimuksia, mutta lähtökohtana on merkillepantavaa, että parasorbosidia esiintyy luonnostaan pihlajanmarjoissa, marja-aroniassa ja amerikkaisessa karpalossa.

### Asiasanat

Sädelatva, gerbera, asterikasvit, harmaahome, sekundääriaineenvaihdunta, polyketidisyntaasi, geeninsiirto, GM-jalostus

## Johdanto

Kasvinsuojelun perinteisiin keinoihin kuuluu pelto- ja puutarhakasvien jalostaminen kasvitauteja ja tuhohyönteisiä kestäviksi. Perinteinen jalostustyö on pitkäjänteistä ja aikaa vievää, mutta sillä saadaan edelleen erinomaisia tuloksia uusien kestävien lajikkeiden muodossa. Kestävyysojalostus on luonteeltaan jatkuvaa ja riippuvaista kunkin viljelykasvilajin geneettisestä monimuotoisuudesta.

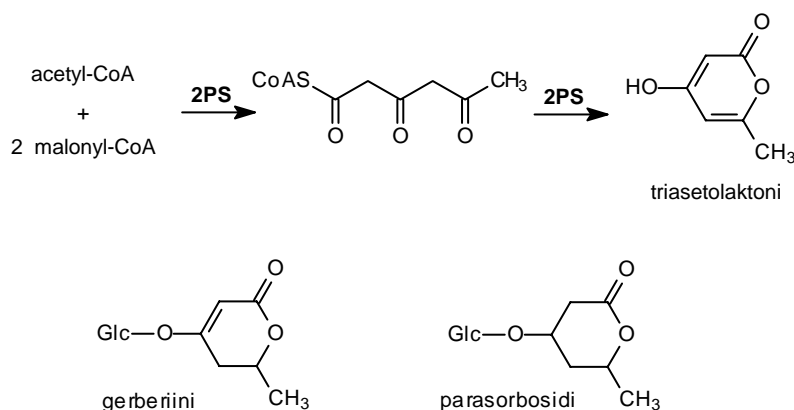
Taudin- ja tuholaiskestävyyden suora mittaaminen viljelykasveilla on ongelmallista monista syistä. Kestävyyden mittaaminen vaatii erikoisolosuhteet esim. kasvihuoneissa, ja tuotantokasvihuoneiden läheisyydessä taudinaiheuttajien ja tuholaisten laajamittainen käsittely ei useinkaan tule kysymykseen. Erityisesti nopeakiertoisilla koristekasveilla, joiden lajikkeet saattavat vaihtua jopa vuosittain, nopea laboratoripohjainen menetelmä uusien lajikkeiden arvioimiseksi olisi arvokas. Paitsi viljelijöiden kannalta, myös jalostajan kannalta taudin- ja tuholaiskestävyyden kytkeminen helposti mitattaviin parametreihin olisi erittäin hyödyllinen apuväline.

Perinteisen kestävyysjalostuksen rinnalle on viime aikoina kehittynyt geeninsiirtotekniikoihin perustuva GM-jalostus. Tunnetuin esimerkki on Bt-toksiinin tuotto viljelykasvissa, jolloin kasvi on (kohdennetusti) kestävä tuhohyönteisiä vastaan. Myös GM-jalostettuja viruksenkestäviä kasveja on viljelyssä, kun taas sieni- ja bakteeritauteja vastaan ei ole onnistuttu kehittämään samalla tavalla tehokkaita GM-menetelmiä. GM-jalostusta on pääosin sovellettu Yhdysvalloissa ja erityisesti EU:n alueella tekniikkaan on suhtauduttu varauksella. Ilmapiiiri on kuitenkin muuttumassa. GM-lupien käsittelyssä pidetyn pitkän tauon aikana on alan riskien tutkimus edistynyt ja Eurooppalaiset tuntuvat olevan valmiita punnitsemaan uudelleen GM-menetelmien hyötyjä kasvinjalostuksessa.

Tähän mennessä GM-tekniikoilla suoritetun kestävyysjalostuksen johtolankana on ollut tuottaa kasvissa bakteeriperäisiä haittaproteiineja (Bt-toksiineja) tai käyttää jalostuksessa virusperäisiä genejä. Tässä esitetyssä tutkimuksessa sovelletaan kasvien omien geenien käyttöä kestävyysjalostuksessa, jolloin yhdessä hyötykasvissa toimiva kestävyystekijä siirretään toiseen hyötykasviin. Vaikka jalostusmenetelmässä käytetään geenitekniikkaa, lopputuloksen kannalta uudet GM-lajikkeet muistuttavat enemmän perinteisillä (kauko)risteytyksillä aikaansaatuja lajikkeita, kuten Euroopassa laajalti viljeltyjä rukiin genejä sisältäviä rehuvehnälaajikkeita. Tämän tutkimuksen johtolankana on käyttää kasvien omia genejä hyötykasvien kestävyysjalostuksessa.

## Gerberan karvasaineet

Leikko- ja ruukkukasvina kasvatettava sädelatva eli gerbera tuottaa maanpäällisiin osiinsa kahta glukosidista karvasainetta, gerberiiniä ja parasorbosidia. Jälkimmäinen tunnetaan myös pihlajan karvasaineena. Glukosidit sellaisenaan torjuvat hyönteistuhoilta, ja sieniperäisten taudinaiheuttajien läsnäollessa ne hajotetaan aglykoneiksi joilla on sienitauteja torjuva vaikutus. Olemme tutkineet gerberan sekundääriaineenvaihdunnan tuotteita ja niistä vastaavia genejä, ja löytäneet avaingeenin, joka johtaa gerberiiniin ja parasorbosidin biosynteesiin.



### Kuva 1

Gerberiini ja parasorbosidi ovat gerberassa esiintyviä karvasaineita. 2-pyroneisyntaasi (2PS) vastaa niiden esiasteen triasetolaktonein biosynteesistä. 2PS, 2-pyroneisyntaasi; Glc, glukoosi.

Olemme tutkineet gerberan sekundääriaineenvaihduntaan liittyvää geenitoimintaa kahden eri yhdisteryhmän suhteen. Kukinnan värityksen kannalta tärkeiden antosyaanien ja muiden flavonoidien biosynteesiin liittyvien geenien kautta olemme selvittäneet kukinnan anatomian suhteen säädellyn geenitoiminnan periaatteita (Helariutta ym. 1993, Kotilainen ym. 1994, Helariutta ym. 1995a, Elomaa ym. 1998, Elomaa ym. 2003). Flavonoidireitin avainentsyymiä kalkonisyntaasia (CHS) koodaavia geenejä eristäessämme löysimme gerberasta yhteensä kolme sukulaisgeeniä, joista vain kaksi koodasi CHS-entsyymiä. Kolmas osoittautui CHS:n tapaan polyketidisyntaasiksi, mutta katalysoi eri reaktiota ja sai sen mukaan nimekseen 2-pyronisyntaasi (2PS) (Helariutta ym. 1995b, Helariutta ym. 1996, Eckermann ym. 1998). 2PS entsyymiä muodostuu lähes kaikkiin gerberan maanpäällisiin solukkoihin (Kuva 1).

### **Siirtogeenisistä gerberalinjoista karvasaineet puuttuvat**

Gerberan geenien toiminnallisessa tutkimuksessa siirtogeenitekniikat ovat avainasemassa. Geeninsiirron avulla tutkittava geeni voidaan sammuttaa ns. antisense-menetelmällä, jolloin voidaan tutkia kasveja, joilta kyseinen geeniaktiivisuus puuttuu. Antisense-tekniikalla tehdyissä siirtogeenisissä gerberalinjoissa 2PS entsyymiä ei muodostu lainkaan. Linjojen metaboliittianalyyysien perusteella niistä puuttuvat erityisesti gerberassa runsaana esiintyvät glukosidiset laktonit gerberiini ja parasorbosidi, joiden esiaste triasetolaktoni muodostuu 2PS reaktiossa (Kuva 1). Gerberiinin ja parasorbosidin lisäksi kasveissa on kahden muun metaboliitin määrä dramaattisesti vähentynyt. Flavoneihin kuuluvaa apigeniiniä ja kumariineihin kuuluvaa 4-hydroksi-5-metyyliikumariinia (HMC) ei muodostu juuri lainkaan (Koskela ym. 2005). On tarkemmin selvittämättä miksi myös nämä metaboliitit puuttuvat, mutta molemmat kuuluvat polyketidiryhmään gerberiinin ja parasorbosidin tapaan. Niin ikään polyketideihin kuuluvien antosyaanien määrä ei ole anti-2PS kasveissa vähentynyt (Eckermann ym. 1998).

Kirjallisuuden perusteella gerberiini ja parasorbosidi ovat karvasaineita, joilla on hyönteisherbivoriaa torjuvia ominaisuuksia (Pyysalo ja Kuusi 1971, Numata ym. 1990). Alustavat havainnot kasvihuoneella tukevat tätä käsitystä, anti-2PS linjat ovat helposti hyönteisten kiusaamia (Kuva 2). Kasvit ovat myös herkkiä harmaahomeelle laboratoriotutkimuksemme perusteella (Koskela ym. 2005). Kirjallisuuden sekä omien tutkimustemme mukaan yhdisteiden aglykonit ovat fungisidisia (Buston ja Roy 1949, Koskela ym. 2005).

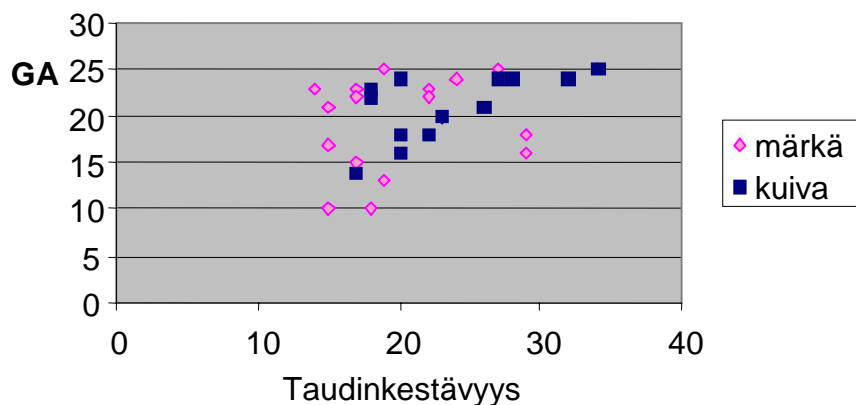


#### **Kuva 2**

Siirtogeenisen anti-2PS gerberalinjan (vasemmalla) kasvu kasvihuoneella on häiriintynyt ripsiäisvaurioiden takia verrattuna ei-siirtogeeniseen kontrolliin (oikealla). Anti-2PS linjassa 2PS entsyymiä eikä metaboliitteja gerberiini, parasorbosidi, apigeniini ja HMC muodostu lainkaan. Tämä viittaa siihen, että k.o. yhdisteillä on merkitystä hyönteisherbivorian torjumisessa

### Gerberalajikkeiden harmaahomeenkesto korreloi gerberiinin kanssa

Siirtogeeniset kokeet viittaavat siihen, että gerberiini ja parasorbosidi, mahdollisesti myös apigeniini ja HMC, liittyvät kasvin puolustukseen mm. harmaahometta vastaan. Olemme määrittäneet parasorbosidia lukuun ottamatta näiden metaboliittien (aglykoniset) pitoisuudet neljässäkympessä kaupallisessa tai kehitteillä olevassa gerberalajikkeissa. Alustavien hometestausten perusteella gerberiiniaglykonin pitoisuus kasvissa korreloi harmaahomeenkeston kanssa (Kuva 3), joka voi antaa mahdollisuuden seuloa uusia lajikkeita niiden kemiallisen profiilin perusteella.



**Kuva 3**

Harmaahomeinfektion etenemisen ja kukintojen gerberiiniaglykonin (GA) määrän välinen riippuvuus (molemmat asteikot kvalitatiivisia luokka-asteikkoja). Kun kokeesta hylätään sumutuksen kastelemat kukinnot ('märät'), saadaan selvä riippuvuus missä muutama lajike muodostaa poikkeuksen.

### Viljelykasvien metaboliamuokkaus

Siirtogeenisillä gerberalajikkeilla tehdyt kokeet osoittavat, että gerberiini ja parasorbosidi sekä niiden aglykonit ovat tärkeä osa gerberan puolustusmekanismia. 2-pyronisyntaasin lisäksi metaboliareitin muita entsyymejä ei vielä tunneta, mutta niiden selvittäessä gerberiini/parasorbosidireittiä voitaneen hyödyntää pelto- ja puutarhakasvien kestävyysjalostuksessa yleisemminkin GM-jalostusta soveltaen. 2-pyronisyntaasi käyttää substraattinaan perusaineenvaihdunnan yhdisteitä (asetyyli-CoA ja malonyyli-CoA), joten metaboliareitti saadaan todennäköisesti toimimaan missä tahansa kasvissa.

Gerberiiniin ja parasorbosidiin liittyvällä metabolisella kestävyysjalostuksella on todennäköisesti laaja sovellettavuusala, joka viime kädessä kuitenkin riippuu kunkin hyötykasvin tautien ja tuholaisien herkkyydestä k.o. aineille. Ensimmäinen sovellusala olisi puutarhassa ja kasvihuoneella viljeltävät koristekasvit. Soveltaminen elintarvikkeiden raaka-aineisiin edellyttää toksikologisia tutkimuksia, mutta lähtökohdana on merkillepantavaa, että parasorbosidia esiintyy luonnostaan pihlajanmarjoissa, marja-aroniassa ja amerikkaisessa karpalossa.

### Kirjallisuusluettelo

Buston, H.W. & Roy, S.K. 1949. The physiological activity of some simple unsaturated lactones. I. Effect on the growth of certain microorganisms. Arch. Biochem. 22: 1-7.

Eckermann, S., Schröder, G., Schmidt, J., Strack, D., Edrada, R.A., Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Kilpeläinen, I., Proksch, P., Teeri, T.H. & Schröder, J. 1998. New pathway to polyketides in plants. Nature 396: 387-390.

- Elomaa, P., Mehto, M., Kotilainen, M., Helariutta, Y., Nevalainen, L. & Teeri, T.H.** 1998. A bHLH transcription factor mediates organ-, region- and flower type specific signals on dihydroflavonol-4-reductase (*dfr*) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J.* 16: 93-99.
- Elomaa, P., Uimari, A., Mehto, M., Albert, V.A., Laitinen, R.A.E. & Teeri, T.H.** 2003. Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots. *Plant Phys.* 133: 1831-1842.
- Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Seppänen, P. & Teeri, T.H.** 1993. Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol 4 reductase (DFR) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). *Plant Mol. Biol.* 22: 183-193.
- Helariutta, Y., Kotilainen, M., Elomaa, P. & Teeri, T.H.** 1995a. *Gerbera hybrida* (Asteraceae) imposes regulation at several anatomical levels during inflorescence development on the gene for dihydroflavonol-4-reductase. *Plant Mol. Biol.* 28: 935-941.
- Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Griesbach, R.J., Schröder, J. & Teeri, T.H.** 1995b. Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.* 28: 47-60.
- Helariutta, Y., Kotilainen, M., Elomaa, P., Kalkkinen, N., Bremer, K., Teeri, T.H. & Albert, V.** 1996. Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of Asteraceae: evolution with substrate change and catalytic simplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 9033-9038.
- Koskela, S., Ainasoja, M., Söderholm, P., Wennberg, T., Klika, K.D., Ovcharenko, V.V., Kylänlahti, I., Harjunpää, T., Yli-Kauhaluoma, J., Pihlaja, K., Vuorela, P. & Teeri, T.H.** 2005. Polyketide derivatives active against *Botrytis cinerea* in *Gerbera hybrida*. *Käsikirjoitus*.
- Kotilainen, M., Helariutta, Y., Elomaa, P., Paulin, L. & Teeri, T.H.** 1994. A corolla- and carpel-abundant, non-specific lipid transfer protein gene is expressed in the epidermis and parenchyma of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). *Plant Mol. Biol.* 26: 971-978.
- Numata, A., Takahashi, C., Fujiki, R., Kitano, E., Kitajima, A. & Takemura, T.** 1990. Plant constituents biologically active to insects. VI. Antifeedants for larvae of the yellow butterfly *Eurema hecabe mandarina* in *Osmunda japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 28: 2862-2865.
- Pyysalo, H. & Kuusi, T.** 1971. The taste in the berries of mountain ash. The glycosidic precursor of sorbic acid, *Suomen kemistilehti*: 393-396.