

## Kasvihormonit ja lakan marjojen kehitys

Olavi Junttila

*Soveltavan biologian laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto, olavi.junttila@helsinki.fi*

### Johdanto

Lakka (hilla, muurain; *Rubus chamaemorus* L.) on varsinkin pohjoisessa arvokas luonnonmarja. Lakan kaupallisen merkityksen takia sen viljelymahdollisuuksia on tutkittu varsinkin Norjassa mutta myös Suomessa (Rapp 1991, Pirinen 1998). Varhaisempi tutkimus pyrki selvittämään mahdollisuuksia lisätä lakkasatoja luontaisilla kasvupaikoilla mm. lannoituksen avulla, mutta viime vuosina tutkimuksessa on keskitytty lakan viljelymahdollisuuksien selvittämiseen. Norjassa on jo aloitettu kahden hede- ('Apollen' ja 'Apollto') ja kahden emilajikkeen ('Fjordgull' ja 'Fjellgull') kaupallinen monistus. Suomessa lakkatutkimusta tehdään Kuopion yliopistossa, jossa tutkitaan mm. mahdollisuuksia kehittää yksikotinen lakkalajike (Kokko, suullinen tiedonanto). Lakan kaksikotisuus ja onnistuneen pölytyksen riippuvuus sääolosuhteista ovat tekijöitä, jotka vaikeuttavat lakan viljelyyn ottoa. Yksikotinen lajike saattaa ratkaista nämä ongelmat. Partenokarpainen lajike, joka kehittää marjan ilman pölytystä, olisi toinen mahdollinen ratkaisu. Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että auksiini- ja/tai gibberelliinikäsittely indusoi partenokarpaisen hedelmän useissa ruusukasvien heimon kuuluvissa lajeissa (Moore and Ecklund 1975). Mainittujen kasvihormonien keskeinen merkitys hedelmänkehityksen säätelyssä on osoitettu lukuisissa tutkimuksissa ja tähän tietämykseen perustuen on partenokarpisuutta alettu kehittää myös geeniteknologian avulla (Varoquaux et al. 2000). Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tehdä alustava selvitys kasvihormonien vaikutuksesta lakan marjojen kehittymiseen ja luoda siten perusta mahdollisen partenokarpaisen lajikkeen kehittämiseksi.

### Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksissa käytettiin sekä lajiketta 'Fjellgull' että useita luonnonvaraisia lakkakantoja. Pääosa käsittelykokeista tehtiin kasvihuoneessa. Taimet hyödettiin fytotronissa (15°C, jatkuva valo, PAR 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ja auenneet kukat käsiteltiin etanoliin liuotetuilla hormoneilla (10  $\mu\text{l}$ /kukka). Käsittelyissä käytettiin kaikkiaan yhdeksää erilaista gibberelliiniä ja kolmea erilaista auksiinia (indolyyli-3-etikkahappo, IAA, naftaleenietikkahappo, NAA, 2,4-dikloorifenoksihappo, 2,4-D). Kukkaa kohti annetut hormonimäärät vaihtelivat 0,1 ja 10  $\mu\text{g:n}$  välillä. Kussakin käsittelyssä oli 6-12 kukkaa ja useimmat käsittelyt testattiin kahdessa tai useammassa kokeessa. Osa kukista käsiteltiin vain etanolilla (negatiivinen kontrolli), osa pölytettiin käsin (positiivinen kontrolli). Marjat kypsyivät noin viisi viikkoa käsittelyn jälkeen.

Marjanaiheiden kehittymistä tutkittiin myös alustavissa *in vitro* kokeissa. Pintasterilisoidut hedelmänaiheet irrotettiin toisistaan ja kasvatettiin 20°C lämpötilassa MS-alustalla, johon oli lisätty auksiinia (NAA) ja/tai gibberelliiniä ( $\text{GA}_3$ ).

Marjanaiheiden hormonipitoisuuksia tutkittiin näytteistä, jotka kerättiin pölytyksen jälkeen neljän päivän välein kolmen viikon ajan. Näytteet puhdistettiin ja niistä mitattiin IAA ja useiden gibberelliinien ( $\text{GA}_{19}$ ,  $\text{GA}_{20}$ ,  $\text{GA}_1$ ,  $\text{GA}_{29}$ ,  $\text{GA}_8$  ja  $\text{GA}_4$ ) pitoisuudet kaasukromatografia-massaspektrometrillä.

### Tulokset ja tulosten tarkastelu

Ensimmäisessä käsittelykokeessa käytettiin vain yhtä gibberelliiniä,  $\text{GA}_3$ , joka on tavallisin kaupallinen gibberelliini.  $\text{GA}_3$ -käsittely (2,5–10  $\mu\text{g}$ /kukka) indusoi samanlaisen marjojen kehityksen kuin pölytys. Hormonikäsitelyjen ja pölytettyjen marjojen välillä ei ollut tilastollisesti merkittäviä eroja kypsien marjojen painossa, mutta kylläkin siemenen painossa ( $P < 0.05$ ). Pölytettyjen marjojen siemenen tuorepaino oli noin 12 mg, mutta  $\text{GA}_3$ :lla indusoitujen marjojen siemenet painoivat vain noin 2 mg. Ero johtui ennen kaikkea siitä, että partenokarpisten marjojen siemenissä ei ollut alkia,

mutta myös siementä ympäröivä kuori, endokarppi, oli pienempi partenokarpissa ( $2,5 \pm 0,22$  mg) kuin pölytetyissä ( $5,4 \pm 0,51$  mg) siemenissä.

Nykyisin tunnetaan jo yli sata erilaista gibberelliiniä, mutta vain harva gibberelliini on itsessään biologisesti aktiivinen.  $GA_1$  on tärkein kasveista eristetty aktiivinen gibberelliini, sen lisäksi  $GA_4$  on biologisesti aktiivinen joissakin lajeissa. Näiden aktiivisten gibberelliinien synteesi perustuu pääasiassa kahteen erilaiseen synteesireittiin ja  $GA_1$ :n lähimpiä esiasteita ovat  $GA_{19}$  ja  $GA_{20}$ , kun taas  $GA_{24}$  ja  $GA_9$  ovat vastaavasti  $GA_4$ :n esiasteita (Hedden and Kamiya 1999). Myös  $GA_3$  on biologisesti aktiivinen ja sekin on eristetty joistakin kasveista, mutta sekä sen synteesireitti että biologinen merkitys on epäselvä.  $GA_5$  voi olla yksi mahdollinen  $GA_3$ :n esiaste. Näille kolmelle biologisesti aktiiviselle gibberelliinille ( $GA_1$ ,  $GA_4$  ja  $GA_3$ ) on yhteistä se, että niiden hiiliatomissa numero kolme on hydroksyyli-ryhmä  $\beta$ -asemassa. Kaikkien mainittujen gibberelliinien vaikutus lakan marjojen kehittymiseen tutkittiin kahdessa erillisessä kokeessa. Kokeissa oli mukana myös synteettinen dimetyyli- $GA_4$ . Ainoastaan  $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$  ja dimetyyli- $GA_4$  indusoi partenokarpin marjan kehittymisen. Muiden testattujen gibberelliinien inaktiivisuus viittaa siihen, että lakan sikiäin ei pysty muuntamaan esiasteita aktiivisiksi gibberelliineiksi. Useissa gibberelliinien aktiivisuutta mittaavissa testeissä esimerkiksi  $GA_{19}$  ja  $GA_{20}$  ovat lähes yhtä aktiivisia kuin  $GA_1$  (Crozier et al. 1970, Junttila and Jensen 1988). Aktiivisten gibberelliinien välillä ei ollut tilastollisesti merkittäviä eroja, mutta dimetyyli- $GA_4$  oli kaikissa kokeissa hieman tehokkaampi kuin muut gibberelliinit. Dimetyyli- $GA_4$ :n suurempi aktiivisuus voi johtua siitä, että metyyli-ryhmät estävät hormonin metaboolista hajoamista.

$GA_3$  testattiin myös kenttäkokeessa, jossa kukat ruiskutettiin hormoniliuoksella. Ruiskutus liuoksella, jonka väkevyys oli  $500 \text{ mg l}^{-1}$  indusoi partenokarpin marjojen kehittymisen.

Auksiinilla on keskeinen vaikutus hedelmien kehittymiseen ja säätelemällä hedelmänaiheiden auksiinisynteesiä geeniteknikan avulla on jo saatu kehitettyä partenokarpisia kasveja esimerkiksi munakoisosta (Rotino et al. 1997) ja vadelmasta (Mezzetti et al. 2001). Käytetyt auksiinit eivät indusoineet partenokarpin marjojen kehittymistä lakkalla, vaikka joissakin tapauksissa auksiini-käsittely aiheutti marjanaiheiden osittaista kehittymistä. Alustavat *in vitro* kokeet, joissa eristettyjä marjanaiheita kasvatettiin MS-alustalla, viittaavat siihen, että marjanaiheet vaativat kehittyäkseen sekä auksiinia että gibberelliiniä. Tässä yhteydessä on mielenkiintoista todeta, että vaikka auksiinikäsittelyllä ei ole saatu indusoitua partenokarpisuutta vadelmalla, tällainen vaikutus on todettu siirtogeenisissä taimissa joissa on lisätty auksiinisynteesiä marjanaiheissa (Mezzetti et al. 2001). Auksiinin ja gibberelliinin mahdollista yhteisvaikutusta lakan marjojen kehittymiseen tullaan tarkastelemaan tarkemmin jatkokokeissa.

Lakan marjanaiheista on eristetty IAA sekä gibberelliinit  $A_{19}$ ,  $A_{20}$ ,  $A_1$ ,  $A_{29}$ ,  $A_8$  ja  $A_4$ . Tämä viittaa siihen, että lakassa saattaa olla useampia gibberelliinien synteesireittejä. Gibberelliinien pitoisuudet olivat korkeimpia heti pölyttymisen jälkeen, mutta ne eivät muuttuneet kovinkaan merkittävästi seuraavien kolmen viikon aikana. Sitä vastoin IAA-pitoisuus nousi tuona aikana varsin voimakkaasti.

## Johtopäätökset

Suoritettavat kokeet osoittavat, että gibberelliinikäsittelyllä voidaan saada partenokarpisia lakkoja. Tällainen käsittely voi siten korvata epäonnistuneen pölytyksen. Toistaiseksi ei ole tutkittu mahdollisuutta indusoida gibberelliinikäsittelyllä marjojen kehittyminen myös sellaisissa tapauksissa, joissa emikukat ovat lievästi vaurioituneet esimerkiksi hallan takia. Gibberelliini on luontainen hormoni lakan marjoissa, mutta jatkotutkimuksissa on selvitettävä käsittelyn vaikutuksia kypsien marjojen hormonipitoisuuksiin ja niiden laatuominaisuuksiin. Näissä käsittelykokeista saadut tulokset ja muilla kasveilla tehdyt siirtogeenitutkimukset viittaavat siihen, että lakastakin on mahdollista kehittää partenokarpisia lajikkeita.

## Kirjallisuus

Crozier, A., Kuo, C. C., Durley, R. C., and Pharis, R. P. 1970. The biological activities 26 gibberellins in nine plant bioassays. *Can. J. Bot.* 48: 867-877.

- Hedden, P. and Kamiya, Y.** 1999. Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 432-460.
- Junttila, O., and Jensen, E.** 1988. Gibberellins and photoperiodic control of shoot elongation in *Salix*. *Physiol. Plant.* 74: 371-376.
- Mezetti, B., Landi, L., and Spena, A.** 2001. Biotechnology for improving *Rubus* production and quality. 8<sup>th</sup> Intern. *Rubus* and *Ribes* Symposium, 9-11 July 2001, Dundee, . Abstract OP 8.
- Moore, T. C. & Ecklund, P. R.** 1975. Role of gibberellins in the development of fruits and seeds. In: Krishnamoorthy, H. N. ed., *Gibberellins and Plant Growth*. Wiley Eastern Ltd., New Delhi, India, p. 145-182.
- Pirinen, H.** 1998. Lakan (*Rubus chamaemorus* L.) viljelymahdollisuudet Suomessa. Helsingin yliopisto, Kasvintuotantotieteen laitos, Puutarhatieteen julkaisuja 32, 37 s.
- Rapp, K.** 1991. Selection for high berry yield, and development of varieties of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Norsk Landbruksforsk.* 5: 359-367.
- Rotino, G. L., Perri, E., Zottini, M., Sommer, H., and Spena, A.** 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechn.* 13: 1398-1401.
- Varoquaux, F., Blanvillain, R., Delseny, M., and Gallois, P.** 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production.. *Trends in Biotechn.* 18: 233-242.