

## Ahomansikan kukintaan vaikuttavien geenien karakterisointi

Katriina Mouhu<sup>1,2)</sup>, Timo Hytönen<sup>1)</sup>, Paula Elomaa<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>*Soveltavan biologian laitos, PL27, 00014 Helsingin yliopisto, Katriina.Mouhu@helsinki.fi*

<sup>2)</sup>*Finnish Graduate School in Plant Biology, PL56, 00014 Helsingin yliopisto*

### Tiivistelmä

Kasvien kukintaa säätelevät sekä ulkoiset (ympäristöolosuhteet) että sisäiset tekijät (kasvin kehitysvaihe). Näiden tekijöiden vaikutusta kukinnan alkamiseen on tutkittu paljon erityisesti lituruohon (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn.), avulla. Lituruoholla kukintaa säätelevät useat reitit, kuten esimerkiksi päivänpituus-, hormoni-, vernalisaatio- ja autonominen reitti. Reitit muodostavat geeniverkoston, joka säätelee kukintaingeraattorigeenien *FT* ja *SOC1* kautta kukkameristeemin identiteettigenejä *LFY* ja *API*. Päivänpituusreitti edistää kukintaa aktivoimalla *FT*:n ilmenemistä, kun taas hormoni-, vernalisaatio- ja autonominen reitti edistävät kukintaa estämällä kahden kukintaa negatiivisesti säätelevän geenin, *FLC*:n ja *SVP*:n, ilmenemistä.

Yhteistä *SOC1*:lle, *FLC*:lle ja *SVP*:lle on se, että ne kaikki kuuluvat laajaan MADS-box-geeniperheeseen. MADS-geenien koodaamat proteiinit säätelevät kohdegeeniensä toimintaa sitoutumalla niiden DNA:han. Lisäksi MADS-proteiinit pystyvät muodostamaan komplekseja sekä itsensä että muiden MADS-proteiinien kanssa. Esimerkiksi *SOC1* aktivoi *LFY*:ä sitoutumalla sen säätelyalueeseen, mutta pystyy siirtymään tumaan vain vuorovaikutuksessa toisen MADS-proteiinin kanssa. Vastaavasti *FLC* ja *SVP* estävät *SOC1*:n ilmenemistä sitoutumalla sen säätelyalueeseen keskinäisessä vuorovaikutuksessa. MADS-proteiinit ja niiden vuorovaikutukset sekä toiminta ovat varsin säilyneitä eri kasvilajien välillä, joskin keskeinen kukintaa estävä MADS-geeni *FLC* on tunnistettu vain ristikukkaisissa lajeissa.

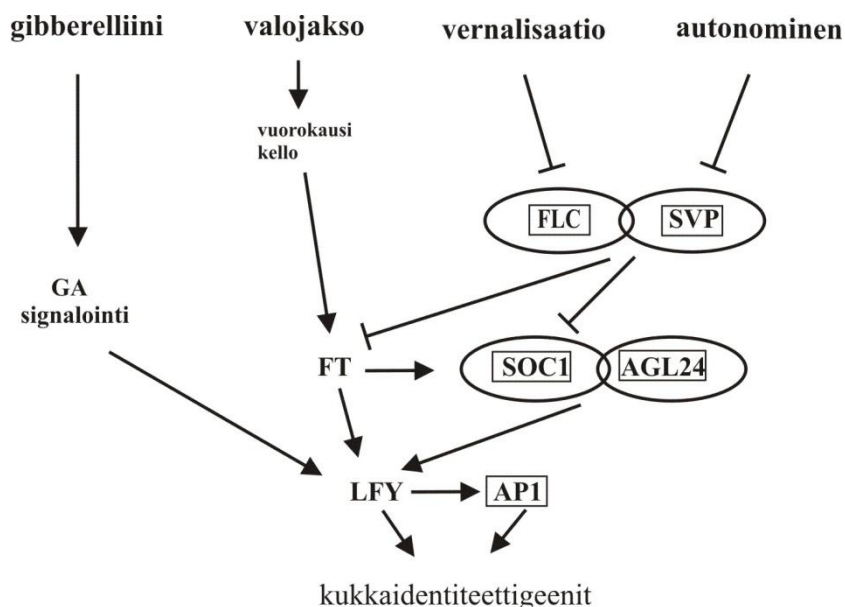
Ahomansikka on, toisin kuin lituruoho, monivuotinen lyhyenpäivänkasvi. Tutkimme mansikan kukinnan säätelyä käyttämällä ahomansikkaa mallikasvina. Ahomansikalta tunnetaan villityypin lisäksi useita jatkuvasatoisia muunnoksia. Näiden avulla olemme identifioineet mahdollisia kukintaan liittyviä kandidaattigenejä, joiden toimintaa mansikalla voidaan tutkia siirtogeenisten mansikkalinjojen avulla. Tutkimme ahomansikan *SOC1*:n roolia kukinnan säätelyssä käyttämällä geenien ylituotto- ja hiljentämistekniikkaa Hawaii-4 –genotyypillä. Olemme tuottaneet agrobakteerivälitteisen geeninsiirron avulla useita ylituotto- ja hiljennyslinjoja, joiden kukintaominaisuuksissa näkyy muutoksia.

### Asiasanat

*Fragaria*, geeninsiirto, agrobakteerivälitteinen, *SOC1*, jatkuvasatoinen, kukinta

## Johdanto

Kasvien kukkimista säätelevät sekä ulkoiset (ympäristöolosuhteet kuten päivänpituus ja lämpötila) että sisäiset tekijät (kasvin kehitysvaihe ja kasvihormonit). Näitä kukinnan alkamiseen vaikuttavia tekijöitä on tutkittu paljon eri kasveilla, ja erityisesti mallikasvi lituruoholla (*Arabidopsis thaliana*). Lituruoholta on löydetty useita kukinnan alkamiseen vaikuttavia geenireittejä (Kuva 1). Reitit puolestaan muodostuvat geeniverkostoista, jotka säätelevät kukkameristeemin identiteettigenejä aktivoivia kukintaintegraattorigenejä *FT* ja *SOC1* (Ausín ym. 2005). Lituruohon tärkeimmät kukinnan alkamiseen vaikuttavat geenireitit ovat päivänpituus-, gibberelliini-, vernalisaatio- ja autonominen reitti (Boss ym. 2004).



Kuva 1. Yksinkertaistettu kaavio tärkeimmistä kukintaan vaikuttavista geenireiteistä ja geeneistä lituruoholla (*Arabidopsis thaliana*). Nuoli kuvaa aktivointia ja jana geenitoiminnan estämistä. Ovaalit merkitsevät proteiinikompleksin muodostumista. Laatikot ympäröivät MADS-box-geenejä.

Päivänpituusreitti aktivoi *FT*:n ilmenemistä lehdessä, josta *FT* liikkuu nilan välityksellä kärkisilmuun aiheuttaen kukinnan indusoitumisen (Jaeger ja Wigge 2007). *FT* edistää *SOC1*:n ilmenemistä ja *SOC1* puolestaan *LFY*:n ilmenemistä (Moon ym. 2005). Vernalisaatio- ja autonominen reitti yhdistyvät *SVP*- ja *FLC*-geeneissä, joiden tuottamat säätelytekijät viivästyttävät kukintaa estämällä *FT*:n ja *SOC1*:n ilmenemistä (Lee ym. 2007, Li ym. 2008). *FLC* on ristikkukkaisissa tärkeimpiä kukinta-aikaan vaikuttavia geenejä, mutta sitä ei ole löydetty muilta kasviheimoilta.

*SOC1*, *FLC* ja *SVP* ovat MADS-box-geenejä. MADS-box-geeniperhe on suuri, mm. lituruoholta on löydetty yli 100 MADS-box-geeniä. MADS-box-geenit koodaavat säätelyproteiineja, jotka ohjaavat muiden geenien ilmenemistä. Ne sitoutuvat kohdegeeniinsä säätelyalueen DNA:n. MADS-geenit ovat osallisina useissa eri kasvin kehitysvaiheissa, kuten kasvullisen vaiheen ja kukinnan alkamisen säätelyssä sekä kukka-aiheiden ja kukkaelinten muodostumisessa (Pařenicová ym. 2003).

MADS-proteiinit pystyvät muodostamaan komplekseja sekä itsensä että muiden MADS-proteiinien kanssa (de Folter ym. 2005). Esimerkiksi *FLC* ja *SVP* sitoutuvat proteiinikompleksiin, jolloin ne pystyvät sitoutumaan sekä *SOC1*:n että *FT*:n säätelyalueeseen ja estämään näiden geenien ilmenemistä (Helliwell ym. 2006, Lee ym. 2007, Li ym. 2008). *SOC1* puolestaan pystyy sitoutumaan *LFY*:n säätelyalueeseen vain proteiinikompleksissa MADS-geeni *AGL24*:n kanssa (Lee ym. 2008).

Ahomansikka kuuluu ruusukasvien heimoon, johon kuuluu monia taloudellisesti tärkeitä viljelykasveja. Toisin kuin lituruoho ahomansikka on monivuotinen lyhyenpäivänkasvi, joka muodostaa kukka-aiheet syksyllä lämpötilan laskiessa ja päivänpituuden lyhetessä, ja kukkii seuraavana keväänä. Se lisääntyy myös kasvullisesti muodostamalla rönsyitä. Ahomansikalta tunnetaan tämän villityypin lisäksi useita jatkuvasatoisia muunnoksia, joista osa muodostaa myös rönsyjä.

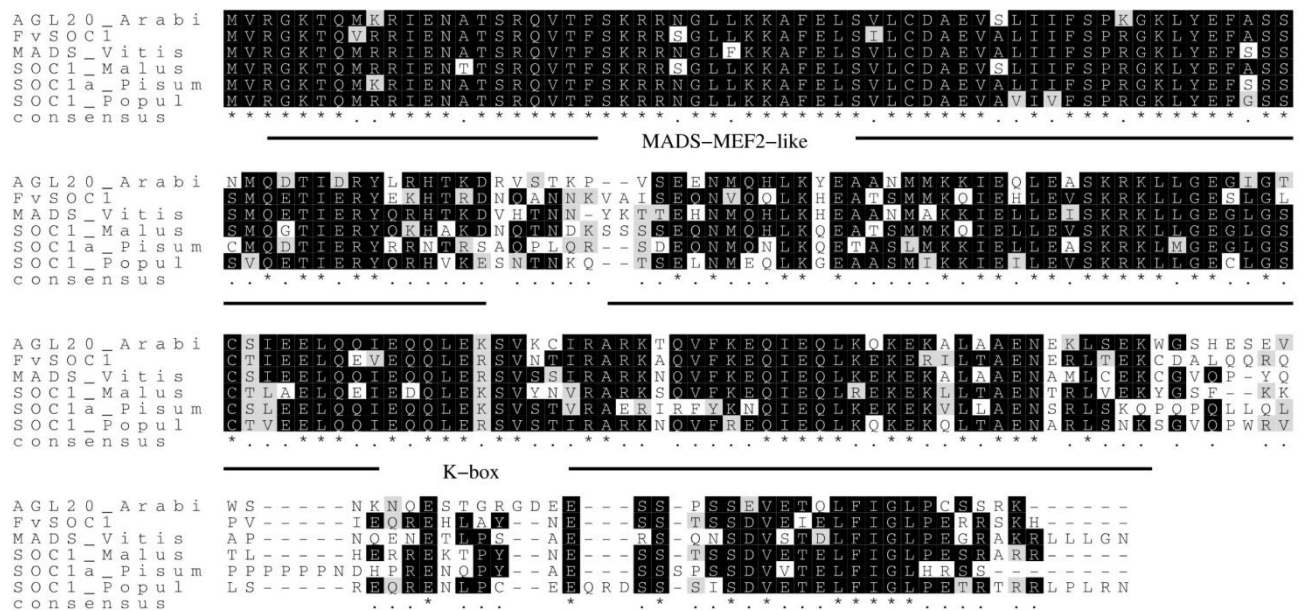
Olemme identifioineet mansikalta kymmeniä kukinnan kandidaattigeenejä (Mouhu ym. 2009). Näiden geenien toimintaa kasvilla voidaan tutkia käyttämällä geeninsiirtotekniikkaa, mm. ylituotto- ja hiljentämistekniikkaa (Karimi ym. 2002). Ylituottotekniikassa haluttu geeni siirretään kasviin yhdistettynä säätelyalueeseen, joka johtaa halutun geenin jatkuvaan ilmenemiseen. Sen sijaan geenihiljennys saadaan aikaan mm. käyttämällä RNA interferenssi -tekniikkaa (RNAi), jolloin kasvilla muodostuva kaksijuosteinen RNA aktivoi kasvin vastaavan oman geenituotteen hajotuksen.

Agrobakteerivälitteistä geeninsiirtoa ahomansikkaan on testattu useilla eri menetelmillä ja genotyypeillä (El Mansouri ym. 1996, Alsheikh ym. 2002, Oosumi ym. 2006) Tehokas geeninsiirto saadaan käyttämällä nuoria lehtiä ja lehtiruoteja lähtömateriaalina, sekä mansikalle sopivia antibiootteja siirtogeenisen solukon valinnassa. Lisäksi genotyyppi vaikuttaa voimakkaasti geeninsiirron tehokkuuteen.

Tutkimme kukintaan vaikuttavan *SOC1*-geenin ylituoton ja hiljentämisen vaikutusta ahomansikan jatkuvasatoisen genotyypin kukintaan.

## Aineisto ja menetelmät

Olemme aikaisemmin kloonanneet *SOC1*-geenin ahomansikan jatkuvasatoisesta genotyypistä 'Baron Solemacher' (Mouhu ym. 2009) (Kuva 2).



Kuva 2. FvSOC1-geenin proteiinilinjaus muiden kasvilajien SOC1- ja SOC1-like- proteiinisekvenssien kanssa. Linjaus tehtiin T-Coffee-ohjelmalla ja muokattiin Boxshade- ja X-fig-ohjelmilla.

Käytimme geenien ylituotto- ja hiljentämistekniikkaa tutkiaksemme *SOC1*-geenin toimintaa ahomansikan kukinnan muodostumisessa. Ylituottovektori oli pK7WG2D ja hiljentämisvektori pK7GWIWG2D(II) (Karimi ym. 2002) ja geeninsiirto tehtiin jatkuvasatoisella Hawaii-4-genotyypillä.

Geeninsiirtovektorina käytettiin agrobakteeria GV3101. Agrobakteeri kasvatettiin ravistelussa (200 rpm) ja +28°C:ssa Luria-alustalla, jossa oli rifampisiinia 100 mg l<sup>-1</sup>, gentamysiiniä 25 mg l<sup>-1</sup> ja spektinomysiiniä 50 mg l<sup>-1</sup>. Yön yli kasvanut agrobakteerikasvusto sentrifugoitiin ja pelletti resuspensoitiin 20 ml:aan 1 x Murashige-Skoog (MS) -alustaa (2 % sakkaroosia, pH 5.5-5.8) siten, että agrobakteeri-MS-seoksen OD<sub>600</sub>-arvo oli noin 0,1. Alustaan lisättiin asetosyryngonia 0,1 mM. Agrobakteeri-MS-seosta pipetoitiin 1-2 ml petrialjalle ja seokseen lisättiin yksi lehti ja lehtiruoti kerrallaan. Lehdykkään painettiin pinsetinkärjillä reikiä ja lehtiruoti leikattiin viistosti 1-2 cm pituisiksi paloiksi, jonka jälkeen kasvinpalat siirrettiin loppuun agrobakteeriseokseen ja inkuboitiin huoneenlämmössä 20-60 min kevyessä ravistelussa. Kasvinpalat kuivattiin huolellisesti imupapereiden välissä ja siirrettiin agaralustalle (1 x MS, 1 x MS vitamiinit, Fe-EDTA 1mg l<sup>-1</sup>, 2% sakkaroosi, IBA 3 mg l<sup>-1</sup> ja BA 0,2 mg l<sup>-1</sup>, Plant Agar Duchefa) ilman antibiootteja. Maljat pidettiin pimeässä +24°C:ssa ja 1-2 vrk kuluttua kasvinpalat siirrettiin agaralustalle, jossa oli kefotaksiimia 250 mg l<sup>-1</sup> agrobakteeria vastaan ja maljat siirrettiin 18 h päivänpituuteen (cool white -valo, <1 μmol/s<sup>2</sup>). Viikon kuluttua kasvinpalat siirrettiin agaralustalle, jossa oli kefotaksiimia 250 mg l<sup>-1</sup> ja ei-siirtogeenisen kalluksen kasvun hidasa-

tamiseksi kanamysiiniä  $5 \text{ mg l}^{-1}$ . Kun siirtogeeninen kallus alkoi muodostaa versonalkuja, aukiin määrä laskettiin  $1 \text{ mg l}^{-1}$ :aan ja säteilytaso nostettiin max.  $50 \mu\text{mol/s}^2$  versonkasvun edistämiseksi. Juurtuneet versot istutettiin Kekkilän ruukutusseokseen ja siirrettiin kasvihuoneeseen jatkokasvatukseen (valojakso 18/6 h, lämpötila 20/18°C).

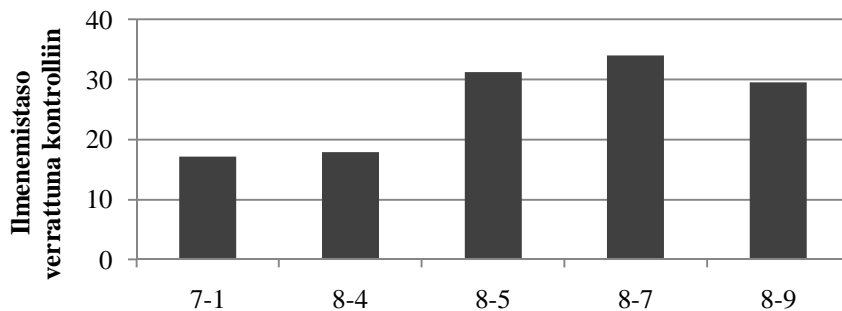
Siirtogeenien vaikutus *SOCI*:n ilmenemiseen testattiin kvantitatiivisella PCR:llä. Kasvien nuoresta lehdestä eristettiin kokonais-RNA mäntymenelmällä (Monte ja Somerville 2002). cDNA syntetisoitiin Superscript III RT kitillä (Invitrogen) ja dT18 VN ankkurialukkeilla. 15 ml kvantitatiivinen PCR -reaktio tehtiin LightCycler 480 SYBR Green I Master -kitillä (Roche Diagnostics) Light Cyler 480 real-time PCR systeemillä (Roche Diagnostics). Forward-alue oli 5'-caggtgagcggatagagaa-3' (Tm 59,4) ja reverse-alue 5'-agagcttctctgggagaga-3' (Tm 59,8). Kustakin linjasta ajettiin kolme teknistä toistoa. Kontrollina oli samoissa oloissa kasvanut siirtogeenitön genotyyppi.

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

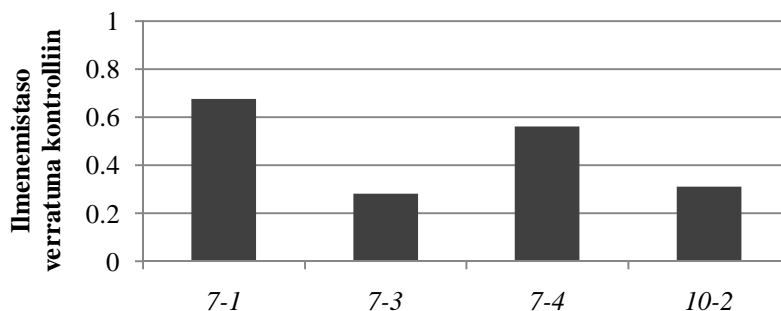
Tuotimme agrobakteerivälitteisen geeninsiirron avulla 20 siirtogeenistä linjaa, joissa *SOCI*-geenin ilmene- mistä oli joko lisätty tai hiljennetty. Aikaa geeninsiirrosta kasvien juurtumiseen kesti 24-25 viikkoa. Kallusta muodostui varsin hyvin, mutta versonmuodostus oli hidasta. Ahomansikan regeneraatio laskee voimakkaasti  $10 \text{ mg l}^{-1}$  kanamysiinipitoisuudessa (El Mansouri ym. 1996, Alsheikh ym. 2002), joten on mahdollista, että jo  $5 \text{ mg l}^{-1}$  kanamysiinipitoisuus hidasti versonmuodostusta.

Alustavien havaintojen perusteella sekä *SOCI*-ylituotto- että hiljennyslinjojen kukinnassa ja rönsyn- muodostuksessa esiintyi eroja kontrollikasveihin verrattuna. Ylituottolinjat kukkivat voimakkaasti ja rönsy- jen määrä oli vähäinen. Vastaavasti hiljennyslinjoissa oli vain muutama kukinto ja paljon rönsyjä. Havaitut muutokset siirtogeenisten kasvien ilmiössä ovat hyvin linjassa sen kanssa, että mansikan kukinnan ja rönsynmuodostuksen runsaus ovat riippuvaisia toisistaan (Konsin ym. 2001).

Kaikissa testatuissa *SOCI*-ylituottolinjoissa *SOCI* ilmeni voimakkaammin (Kuva 3) ja hiljennyslin- joissa heikommin kuin villityypillä (Kuva 4). *SOCI*:n ilmenemistaso korreloi kukintailmiönsä kanssa kaikil- la testatuilla linjoilla.



Kuva 3. *SOCI*-geenin ilmenemistaso ylituottolinjoissa 'Hawaii-4'-genotyypillä. Kvantitatiivisesta PCR:stä saadut Ct-arvot normalisoitiin *FvMSI*:tä vastaan ja ilmenemiserot siirtogeenitöntä kontrollia vastaan laskettiin seuraavalla kaavalla:  $2^{\text{normalisoitu Ct siirtogeeninlinja}} / 2^{\text{normalisoitu Ct kontrolli}}$ .



Kuva 4. *SOCI*-geenin ilmenemistaso 'Hawaii-4' hiljennyslinjoissa. Kvantitatiivisesta PCR:stä saadut Ct-arvot normalisoitiin *FvMSI*:tä vastaan ja ilmenemiserot siirtogeenitöntä kontrollia vastaan laskettiin seuraavalla kaavalla:  $2^{\text{normalisoitu Ct siirtogeeninlinja}} / 2^{\text{normalisoitu Ct kontrolli}}$ .

## Johtopäätökset

Agrobakteerivälitteinen geeninsiirto toimi testattavana olleella ahomansikan jatkuvasatoisella genotyypillä hyvin. Tuotimme useita siirtogeenisiä linjoja, joissa *SOC1*-geenin ilmeneminen oli muuttunut. *SOC1*-ylituottokasvit kukkivat voimakkaasti, kun taas *SOC1*:n hiljentäminen johti huomattavasti kasvullisempaan ilmiasuun. Nämä tulokset osoittavat, että *SOC1* edistää kukintaa mansikalla. Seuraava askel on linjojen itse-pölyttäminen ja jälkeläisten tarkempi tutkiminen eri päivänpituuksissa valojakson vaikutuksen selvittämiseksi. Kokeen perusteella ahomansikkaa voidaan käyttää mallikasvina muille Rosaceae-kasveille, erityisesti puutarhamansikalle, myös geeninsiirtotekniikkaa hyödyntämällä.

## Kirjallisuus

- Alsheikh, M. K., Suso, H.-P., Robson, M., Battey, N. H & Wetten, A.** 2002. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens*. *Plant Cell Reports* 20:1173-1180.
- Ausin, I., Alonso-Blanco, C. & Martinez-Zapater, M.** 2005. Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology* 49: 689-705.
- Boss, P. K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. & Dean, C.** 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell* 16: S18-S31.
- El Mansouri, I., Mercado, J. A., Valpuesta, V., López-Aranda, J. M., Pliego-Alfaro, F. & Quesada, M. A.** 1996. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Reports* 15:642-646.
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M. Peacock, W. J. & Dennis, E. S.** 2006. The Arabidopsis FLC protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal* 46:183-192.
- Jaeger, K. E. & Wigge, P. A.** 2007. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17: 1050-1054.
- Karimi, M., Inze, D. & Depicker, A.** 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193-195.
- Konsin, M., Voipio, I. & Palonen, P.** 2001. Influence of photoperiod and duration of short-day treatment on vegetative growth and flowering of strawberry. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 76: 77-82.
- Lee, J. H., Yoo, S. J., Park, S. H., Hwang, I., Lee, J. S. & Ahn, J. H.** 2007. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 21:397-402.
- Lee, J., Oh, M., Park, H. & Lee, I.** 2008. *SOC1* translocated to the nucleus by interaction with *AGL24* directly regulates *LEAFY*. *The Plant Journal* 55:832-843.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T. Meyerowitz, E. & Yu, H.** 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 15:110-120.
- Monte, D. & Somerville, S.** 2002. Pine tree method for isolation of plant RNA. Teoksessa: Bowtell, D. ja Sambrook, J. (toim.) *DNA microarrays: a molecular cloning manual*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press. s. 124-126.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M. & Lee, I.** 2005. Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 46:292-299.
- Mouhu, K., Hytönen, T. Folta, K., Rantanen, M., Paulin, L., Auvinen, P. & Elomaa, P.** 2009. Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC Plant Biology* 9:122.
- Oosumi, T., Gruszevski, H. A., Blischak, L. A., Baxter, A. J., Wadl, P. A., Shuman, J. L., Veilleux, R. E. & Shulaev, V.** 2006. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* 223:1219-1230.
- Pařenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H. E., Ingram, R. M., Kater, M. M., Davies, B., Angenent, G. C. & Colombo, L.** 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *The Plant Cell* 15:1538-1551.