

## Nurmirehu helpommin sulavaksi: sekundaarisoluseinän syntymisen säätely

Kärkönen A<sup>1</sup>, Seppänen M<sup>2</sup>, Häggman H<sup>3</sup>, Manninen O<sup>4</sup>, Joki-Tokola E<sup>1</sup>, Virkajärvi P<sup>5</sup>

<sup>1</sup>MTT, Tutkimusasemantie 15, 94200 Ruukki; <sup>2</sup>Maataloustieteiden laitos, PL 27, Helsingin yliopisto; <sup>3</sup>Biologian laitos, PL 3000, 90014 Oulun yliopisto; <sup>4</sup>MTT, Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Genomiikka, 31600 Jokioinen; <sup>5</sup>MTT, Halolantie 31, 71750 Maaninka

Ligniini, fenoliyksiköistä koostuva verkkomainen puuaine, kertyy seinäsokeripolymeerien väliin kuolaiden tuki- ja vettäkuljettavien solujen kehityksen loppuvaiheessa. Ligniini liimaa seinäpolysakkaridit yhteen: soluseinistä tulee vahvoja ja vettäläpäisemättömiä. Ligniinialayksiköiden väliset ristisidokset ovat kestäviä ja niitä on erittäin vaikea hajottaa. Eri kasviryhmien seinäkoostumukset eroavat ligniinimäärän ja -laadun suhteen. Heinäkasvien ligniini koostuu G-, S- ja H-yksiköistä, lisäksi soluseinäsokereihin on liittynyt fenolihappoja (ferula- ja kumarihappo), joiden muodostamat ristisidokset edelleen tiivistävät soluseinärakennetta. Ligniinin suuri määrällinen lisäys liittyy heinien korsiantumiseen. Tällöin korren ulompien osien solujen soluseinät paksunevat ja puutuvat, muodostuu ns. sklerenkyymituppi. Ligniini estää märehitjän ruoansulatusentsyymien pääsyä seinäpolysakkaridien luo ja täten vähentää kasviaineksen hajoamista eläimen ruoansulatuksessa. Osa kasvin sisältämästä energiasta jää hyödyntämättä. Rehun D-arvo, joka kertoo sulavuudesta, laskee huomattavasti ligniinimäärän lisääntyessä.

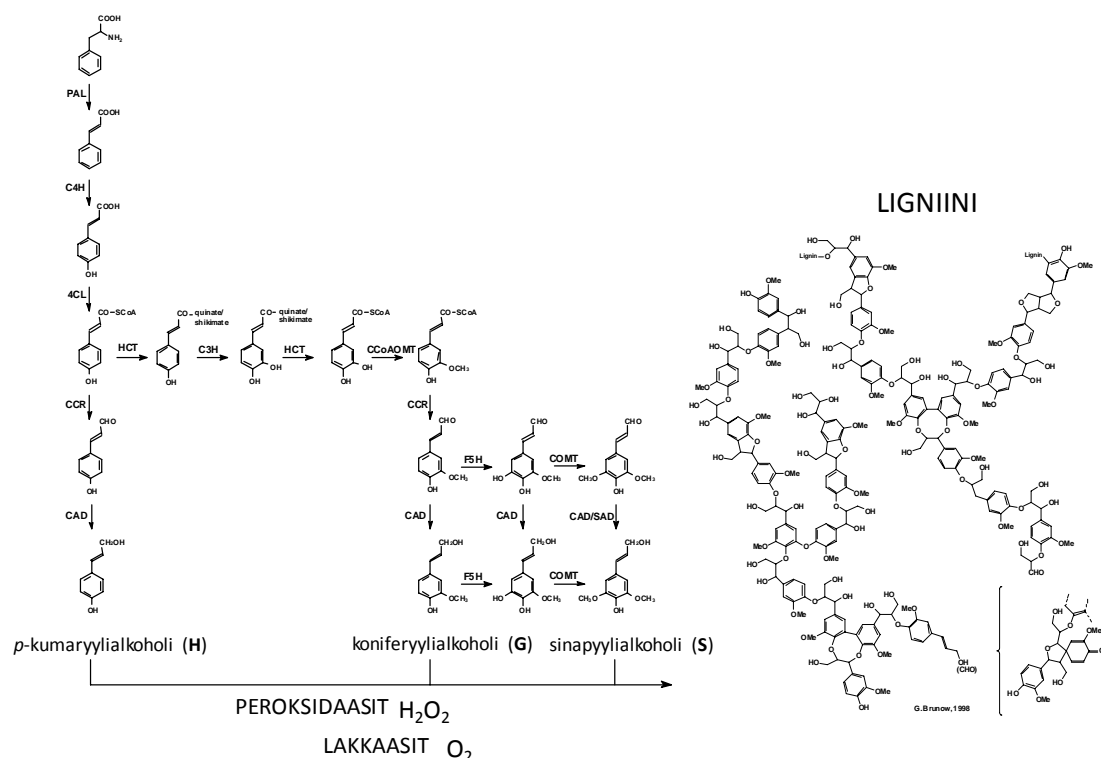
Sekundaariseinän biosynteesin geenitason säätelytekijöitä on selvitetty mm. mallikasvina käytetyllä lituruoholla (*Arabidopsis thaliana*) ja puuvartisilla kasveilla (esim. poppeli ja eukalyptus). Eri säätelytekijät ohjaavat sekundaariseinän kehitystä lituruohon tukisoluihin kuin vettäkuljettavissa putkisoluihin ja putkiloissa. MTT:n sekä Helsingin ja Oulun yliopistojen yhteistyötutkimuksessa pyrimme selvittämään, miten sekundaarisoluseinän biosynteesiä säädellään timoteilla, Suomessa yleisesti viljellyillä rehuksilla. Tietoa säätelytekijöistä hyödynnetään selvitettyä soluseinän lignifikaation yhteyttä timotein kehitykseen sekä rehun sulavuuteen. Tavoitteenamme on saada tietoa ligniinin biosynteesistä sekä löytää ligniinin syntyä ohjaavia säätelytekijöitä, jotka säätelevät ligniinisynteesiä erityisesti korren sklerenkyymitupessa. Tämä mahdollistaisi lähestymistavan, jossa pyrimme alentamaan ligniinin määrää korren uloimman osan tukisolukossa. Näin korren kokonaisligniinipitoisuus alenisi johtojänteen vedenkuljetuksen siitä kärsimättä. Kokonaisligniinimäärän lasku puolestaan parantaisi kasvimaan sulavuutta. On kuitenkin huomioitava, ettei ligniinimäärän alentaminen korren tukisolukossa johda lakoantumisen lisääntymiseen tai patogeenikestävyyden alenemiseen.

Yhden prosenttiyksikön muutos koko Suomen säilörehusadon D-arvossa on laskennalliselta arvoltaan n. 11–17 M€v; rohkeampien laskelmien mukaan jopa 50 M€v (P. Virkajärvi, arvio). Tältä pohjalta arvioiden hanke on hyvin tärkeä maidon- ja lihantuotannon säilymiselle vartenotettavana elinkeinona. Loppukädessä hyötyjänä on sekä alkutuotanto ja sen varaan perustuva kotimainen elintarvikkeita jalostava teollisuus, jonka työpaikoista noin 80 % on maidon- ja lihanjalostuksessa. Myös maatalouden panosteollisuus on pitkälti riippuvainen märehitjoihin perustuvasta tuotannosta.

Asiasanat: ligniini, rehunsulavuus, soluseinä, geeniluennan säätelytekijät, timotei

## Johdanto

Kasvisolun soluseinä koostuu selluloosasta sekä muista sokeripolymeereistä (hemiselluloosa ja pektiini), jotka yhdessä rakenneproteiinien kanssa muodostavat solua tukevan seinärakenteen. Kun solu on saavuttanut lopullisen kokonsa, tietyissä soluissa (kuolleet tukisolut sekä vettäkuljettavat putkisolut ja putkilot) primaarisen soluseinän sisäpuolelle kehitty sekundaarisoluseinä. Ligniini, fenoliyksiköistä koostuva verkkomainen puuaine (Kuva 1), kertyy seinäsokeripolymeerien väliin liimaten ne yhteen: soluseinistä tulee vahvoja ja vettäläpäisemättömiä. Ligniinalayksiköiden väliset ristsidokset ovat kestäviä ja niitä on erittäin vaikea hajottaa. Eri kasviryhmien seinäkoostumukset eroavat ligniinimäärän ja -laadun suhteen. Heinäkasvien ligniini koostuu G-, S- ja H-yksiköistä, lisäksi soluseinäoskereihin on liittynyt fenoliyhappoja (ferula- ja kumarihappo), joiden muodostamat ristsidokset edelleen tiivistävät soluseinärakennetta. Alayksikkökoostumus eroaa myös eri solutyypin välillä: vettäkuljetavissa putkiloissa ja putkisoluissa on eniten G-tyyppin ligniiniä, kuolleet tukisolukossa, sklerenkyymissä, on vastaavasti SG-tyyppin ligniiniä (Fergus ja Goring 1970, Nakashima ym. 2008). Ligniinin suuri määrällinen lisäys heinäkasveilla liittyy korsiantumiseen. Tällöin korren kuoren uloimpien osien soluseinät paksunevat ja puutuvat: muodostuu ns. sklerenkyypituppi (Seppänen ym. 2009; Kuva 2). Tähän liittyy S-yksiköiden suhteellisen osuuden kasvu (Chen ym. 2002). Ligniini ehkäisee nurmirehun hajoamista eläimen ruoansulatuksessa. Rehun D-arvo, joka kertoo sulavuudesta, laskee huomattavasti ligniinimäärän lisääntyessä.



Kuva 1. Ligniinin synteesireitti kaksisirkkaiskasveilla tämänhetkisen tietämyksen mukaan (kuva S. Koutaniemi, HY).

Korrenmuodostus lisää sadon määrää nurmirehua tuotettaessa. Satoa nostavat mm. parantunut säteilyn hyväksikäyttö lehtien ylemmän sijainnin takia, uusien lehtien korkea fotosynteesin kapasiteetti sekä korsisolukon alhainen aineenvaihdunta-aktiivisuus (esim. Parsons 1988). Tieto ligniinin biosynteesistä ja siihen vaikuttavista tekijöistä auttaa muokkaamaan korren sulavuutta ilman, että sato kärsii. Valintamenetelmillä on saatu varsin lupaavia tuloksia: alhaisen ligniini (ADL, acid detergent lignin) : selluloosa –suhteen fenotyyppisellä valinnalla on parannettu kuiva-aineen ja NDF:n (neutral detergent fiber) sulavuutta ilman, että kasvin kuiva-ainetuotanto aleni (Claessens ym. 2005; Belanger ym. 2006).



Kuva 2. Poikkileikkaus timotein korresta (L. Sarelainen & M. Seppänen). Korren uloimmat solut ovat vahvasti puutuneet (ligniini värjätty punaiseksi floroglusinolilla).

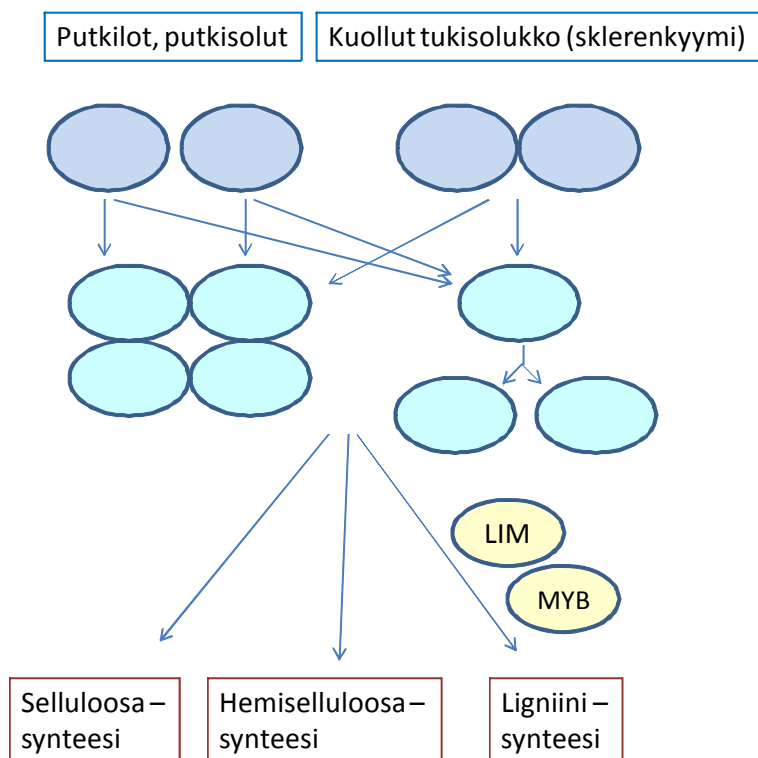
Maidon- ja lihantuotanto perustuvat pötsimikrobien kykyyn fermentoida rehujen eläimelle käyttökelpottomat solunseinähiilihydraatit eläimelle käyttökelpoiseen muotoon. Ligniini estää pötsimikrobien rehunsulatusentsyymien pääsyä seinäpolysakkaridien luo ja vähentää täten rehun sulavuutta. Osa rehun energiasta jää hyödyntämättä. Ligniinillä on suuri raaka-aineen taloudelliseen hyödyntämiseen vaikuttava merkitys karjatalouden lisäksi paperin- ja biopolttoaineiden valmistuksessa, sillä kuten ruuansulatuksessa, myös näissä prosesseissa ligniini vaikeuttaa soluseinäpolysakkaridien hyödyntämistä. Ligniinin biosynteesiä, rakennetta ja rakenteen muokkaamista onkin tutkittu maailmanlaajuisesti, myös Suomessa (Brunow ym. 1998; Tiimonen ym. 2005; Koutaniemi ym. 2007; Kärkönen ym. 2009). Ligniinin esiasteet tuotetaan fenyylipropanoidireittiä, jonka entsyymit tunnetaan melko hyvin (Boerjan ym. 2003; Kuva 1). Entsyymejä on yksi kerrallaan joko hiljennetty tai ylituotettu ja tämän vaikutusta kasvin kasvuun, ligniinin määrään ja laatuun seurattu (esim. Reddy ym. 2005; Nakashima ym. 2008; Vanholme ym. 2008). Tiettyjen entsyymien määrämuutokset ovat johtaneetkin ligniinin määrään tai laadun muutoksiin, jonka johdosta rehunsulavuus, sellutuotos tai biopolttoaineen tuotto on parantunut (Li ym. 2008). Joissakin tapauksissa ligniinin määrään tai laadun muokkaaminen on kuitenkin johtanut kasvin kasvuhäiriöihin (Vanholme ym. 2008).

### Sekundaariseinän synteessin säätely

Seinäpolysakkaridien ja ligniinin synteesiä säädellään tarkoin sekundaariseinän kehityksen aikana (Kubo ym. 2005; Zhong ja Ye 2007). Geenitason säätelytekijöitä on selvitetty mm. mallikasvina käytetyllä lituruoholla (*Arabidopsis thaliana*) ja puuvartisilla kasveilla (esim. poppeli ja eukalyptus). Säätelytekijät muodostavat hierarkisen verkoston, jossa ylempänä sijaitseva säätelytekijä aktivoi useita alemman tason säätelytekijöitä. Nämä puolestaan ohjaavat mm. soluseinäsynteesiin osallistuvien entsyymien sekä rakenneproteiinien geenien luentaa (Zhong ym. 2008, Kuva 3). Ylemmän tason säätelytekijät säätelevät kokonaisvaltaisesti koko sekundaariseinän synteesiä, kun taas osa alemman tason säätelytekijöistä on erilaistunut ohjaamaan tiettyä tapahtumaa esim. selluloosa- tai ligniinisynteesiä.

Esimerkiksi tietyt LIM- ja MYB-säätelytekijäperheiden jäsenet ohjaavat suoraan soluseinän ligniini-synteesiä (Kawaoka ym. 2000; Goicoechea ym. 2005; Zhou ym. 2009).

Sekundaariseinälisten solujen osuus ja sijainti vaihtelevat suuresti eri kasviryhmillä (esim. puu- ja ruohovartist kasvit, heinät), joten on mahdollista, että geenitason säätelyssä on eroja eri kasvilajeilla. Solukkotasolla eroja on jo löydetty: eri säätelytekijät ohjaavat sekundaarisoluseinän kehitystä lituruohon kuolleissa tukisolussa, syissä, kuin putkisolussa ja putkiloissa (Kubo ym. 2005; Zhong ym. 2006).



Kuva 3. Lituruohon sekundaarisoluseinän syntyä ohjaava geenitason säätelytekijöiden verkosto (Zhong ja Ye 2007 -mukaan).

### Timotein soluseinähanke

MTT:n sekä Helsingin ja Oulun yliopistojen yhteistyötutkimuksessa pyrimme selvittämään, miten sekundaarisoluseinän biosynteesiä säädellään timoteilla, Suomessa laajasti viljellyllä rehukasvilla. Tietoa säätelytekijöistä hyödynnetään selvittäessä lignifikaation yhteyttä timotein kehitykseen sekä rehun sulavuuteen. Tavoitteenamme on saada tietoa timotein ligniinisynteesistä sekä löytää ligniinin syntyä ohjaavia säätelytekijöitä, jotka säätelevät ligniinisynteesiä erityisesti korren sklerenkyymitupeissa. Tämä mahdollistaisi lähestymistavan, jossa pyrimme alentamaan ligniiniin määrää korren uloimman osan tukisolukossa. Näin korren kokonaisligniinipitoisuus alenisi johtojänteen vedenkuljetuksen siitä kärsimättä. Kokonaisligniinimäärän lasku puolestaan parantaisi kasvimassan sulavuutta. On kuitenkin huomioitava, ettei ligniinimäärän alentaminen korren tukisolukossa johda lakoontumisen lisääntymiseen tai patogeenikestävyyden alenemiseen.

Yhden prosenttiyksikön muutos koko Suomen säilörehusadon D-arvossa on laskennalliselta arvoltaan n. 11-17 M€v; rohkeampien laskelmien mukaan jopa 50 M€v (P. Virkajärvi, arvio). Tältä pohjalta arvioiden hanke on hyvin tärkeä maidon- ja lihan tuotannon säilymiselle varteenotettavana elinkeinona. Loppukädessä hyötyjänä on sekä alkutuotanto ja sen varaan perustuva kotimainen elintarvikkeita jalostava teollisuus, jonka työpaikoista noin 80 % on maidon- ja lihanjalostuksessa. Myös maatalouden panosteollisuus on pitkälti riippuvainen märehtijöihin perustuvasta tuotannosta.

## Kirjallisuus

- Belanger, G.** 2006. The nutritive value of timothy and its improvement through management and breeding. Teoksessa: Sveinsson (toim.) Timothy productivity and forage quality-possibilities and limitations. Proceedings of NJF Seminar 384, 10–12 August 2006, Akureyri, Iceland: s. 15-25.
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M.** 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546.
- Brunow, G., Ämmälähti, E., Niemi, T., Sipilä, J., Simola, L.K. & Kilpeläinen, I.** 1998. Labelling of a lignin from suspension cultures of *Picea abies*. *Phytochemistry* 47: 1495-1500.
- Chen, L., Auh, C., Chen, F., Cheng, X., Aljoe, H., Dixon, R.A. & Wang, Z.** 2002. Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5558-5565.
- Claessens, A., Michaud, R., Belanger, G. & Mather, D.E.** 2005. Responses to divergent phenotypic selection for fiber traits in timothy. *Crop Sci.* 45: 1017-1022.
- Fergus, P.J. & Goring, D.A.I.** 1970. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem. *Holzfor-schung* 24: 113-117.
- Goicoechea, M., Lacombe, E., Legay, S., Mihaljevic, S., Rech, P., Jauneau, A., Lapierre, C., Pollet, B., Verhaegen, D., Chaubet-Gigot, N. & Grima-Pettenati J.** *EgMYB2*, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J.* 43: 553-567.
- Kärkönen, A., Warinowski, T., Teeri, T.H., Simola, L.K. & Fry, S.C.** 2009. On the mechanism of apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during lignin formation and elicitation in cultured spruce cells; peroxidases after elicitation. *Planta* 230: 553-567.
- Kawaoka, A., Kaothien, P., Yoshida, K., Endo, S., Yamada, K. & Ebinuma, H.** 2000. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J.* 22: 289-301.
- Koutaniemi, S., Warinowski, T., Kärkönen, A., Alatalo, E., Fossdal, C.G., Saranpää, P., Laakso, T., Fagerstedt, K.V., Simola, L.K., Paulin, L., Rudd, S. & Teeri, T.H.** 2007. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Mol. Biol.* 65: 311-328.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. & Demura, T.** 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19: 1855-1860.
- Li, X., Weng, J.K. & Chapple, C.** 2008 Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J.* 54: 569-581.
- Nakashima, J., Chen, F., Jackson, L., Shadle, G. & Dixon, R.A.** 2008. Multi-site genetic modification of monolignol biosynthesis in alfalfa (*Medicago sativa*): effects on lignin composition in specific cell types. *New Phytol.* 179: 738-750.
- Parsons, A.** 1988. The effects of season and management on the growth of grass swards. Teoksessa: Jones, M.B. & Lazenby, A. (toim.) The grass crop. The physiological basis of production: s. 129-178. Chapman & Hall, London. 369 s.
- Reddy, M.S.S., Chen, F., Shadle, G.L., Jackson, L., Aljoe, H. & Dixon, R.A.** 2005. Targetted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *PNAS* 102: 16573-16578.
- Seppänen, M.M., Pakarinen, K., Jokela, V., Andersen, J.R., Fiil, A., Santanen, A. & Virkajärvi, P.** 2009. Vernalization response in *Phleum pratense* and relationship to canopy structure, stem morphology and expression of *VRN1* and *VRN2*. *Ann. Bot.*, käsikirjoituksen korjausvaiheessa.

**Tiimonen, H., Aronen, T., Laakso, T., Saranpää, P., Chiang, V., Ylioja, T., Roininen, H. & Häggman, H.** 2005. Does lignin modification affect feeding preference or growth performance of insect herbivores in transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth)? *Planta* 222: 699-708.

**Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W.** 2008. Lignin engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 278-285.

**Zhong, R., Demura, T. & Ye, Z.H.** 2006. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3158-3170.

**Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L. & Ye, Z.H.** 2008. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 2763-2782.

**Zhong, R. & Ye, Z.H.** 2007. Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 564-572.

**Zhou, J., Lee, C., Zhong, R. & Ye, Z.H.** 2009. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 248-266