

Hely Häggman

Geenitekniikkatutkimus pohjana metsäpuiden molekyyljalostukselle

Miksi molekyyljalostusta?

Metsäpuiden kohdalla perinteiset jalostustavoitteet ovat selkeät: hyvä puun kasvu ja laatu, kestävyys sekä sopeutuneisuus kasvatuspaikalle. Perinteisillä menetelmillä, valinnalla, risteytyksillä ja takaisinristeytyksillä on jalostus kuitenkin hidasta etenkin metsäpuiden pitkän sukupolven välin ja jälkeläistestaukseen kuluvan pitkän ajan takia. Tietyn halutun ominaisuuden siirto yhdestä genotyypistä toiseen on myös perinteisillä menetelmillä hidasta ja vaikeaa, eikä välttämättä aina onnistu. Molekyyljalostuksen työkalujen, geeninsiirtojen, avulla pystytään vaikuttamaan tiettyjen tunnettujen geenien toimintaan tai lisäämään uusia geenejä kasvin genomiin. Geenitekniikan menestyksekkäs käyttö maatalouskasveilla onkin herättänyt toiveita molekyyljalostuksen soveltuvuudesta myös metsäpuille.

Geeninsiirrot molekyyljalostuksen työkaluna

JoAnne Fillatti työryhmineen siirsi vesakontorjunta-aine glyfosaatille kestävyuden antavan geenin hybridipoppeliin jo 1980-luvun lopulla. Geeninsiirroissa hyödynnettiin agrobakteerin omaa geeninsiirtomekanismia. Vielä nykyisinkin agrobakteerivälitteinen geeninsiirto on käytetyin menetelmä useimmilla lehtipuilla. On kuitenkin olemassa lukuisia kasviryhmiä, kuten yksisirkkaiset ja havupuut, jot-

ka eivät ole agrobakteerin luontaisia isäntäkasveja, mikä rajoittaa agrobakteerien käyttöä geeninsiirtovektoreina näillä lajeilla. Agrobakteerien aiheuttamista taudeista ja niiden toimimisesta geeninsiirtovektoreina on ilmestynyt katsaus (Häggman ja Aronen 1996). Metsätutkimuslaitoksen Punkaharjun tutkimusasemalla on kehitetty kotimaisille metsäpuille soveltuvia geeninsiirtomenetelmiä ja niitä on edelleen käytetty mielenkiintoisten tutkimusgeenien siirtoon. Tällä hetkellä metsäpuille parhaiten soveltuvat menetelmät ovat lehtipuiden kyseessä ollen joko agrobakteerivälitteinen geeninsiirto tai biolistinen ase ja havupuilla biolistinen ase, jolla geenejä ammutaan kasvisolukkaan.

Agrobakteerivälitteisessä geeninsiirroissa käytetään joko *Agrobacterium tumefaciens*- tai *Agrobacterium rhizogenes* -lajien kantoja. Agrobakteerien luonnossa aiheuttamien kasvitautien oireet syntyvät Ti- tai Ri-plasmidissa olevan T-DNA:n hormonigeenien eli hormoneja tuottavien geenien toiminnan tuloksena. Liittyttyään kiinteästi isäntäkasvin perimään hormonigeenit luovat joko uusia kasvi-hormonien biosynteesireittejä tai herkistävät solut kasvin omille hormoneille, jolloin solunjakautumisen tuloksena infektiokohtaan muodostuu äkämä tai tiheäkarvaisia juuria. Tällaisia villityyppejä agrobakteerikantoja on käytetty useissa tutkimuksissa, joissa on haluttu löytää eri lajeille parhaiten soveltuvia geeninsiirtovektoreita. Villityypin *A. rhizogenes* kantoja on käytetty useiden lehtipuulajien kuten leppä- ja eukalyptus-lajien ja havupuista lähin-

Metlassa tutkitaan geeninsiirtoja

Metsäntutkimuslaitoksen Punkaharjun tutkimusasemalla eräänä tärkeänä tutkimusalana on metsäpuiden biotekniikkatutkimus. Tutkimushankkeessa on kehitetty geeninsiirtomenetelmiä metsäpuillemme sopiviksi ja menetelmiä hyödynnetään tutkimusgeenien, kuten ligniinisynteesiin vaikuttavien geenien, siirtoon. Koska suurin osa nyky menetelmistä vaatii solukkoviljelyvaihetta, on myös solukkoviljelymenetelmien tutkimus aktiivista. Geenivarannon säilyttämiseksi ja tutkimuksen edistämiseksi on kehitetty kryopreservointoon perustuvia säilytysmenetelmiä. Punkaharjulla tehdystä biotekniikan tutkimuksista on valmistunut yksi väitöskirja, kolme väitöskirjaa on tekeillä ja viime vuosien aikana on julkaistu lukuisia kansainvälisiä artikkeleita.

nä mänty-lajien pistokkaiden juurrutuksessa. Myöskin männyn (*Pinus sylvestris*) pistokkaiden juurrutuksessa on agrobakteerikantoja testattu (Aronen ym. 1996). Villityypin kantaa on myös menestyksekkäästi käytetty siirrettäessä geenejä euroopanlehtikuuseen (Huang ym. 1991).

Varsinaiset geeninsiirtokokeet tehdään tavallisimmin sellaisilla agrobakteerikannoilla, joissa T-DNA:sta poistettujen tautigeenien tilalle on pantu haluttuja geenejä. Geenien siirto agrobakteerista kasvisoluun tapahtuu bakteerin Ti-plasmidin virulenssi- eli *vir*-geenien ohjaamana. *Vir*-geenit alkavat toimia joko haavoittuneesta kasvisolukosta erityyppien tai keinotekoisesti lisättyjen fenolien ja sokerien vaikutuksesta. Ensin bakteerien solukelmussa oleva *virA*-proteiini tunnistaa nämä signaalimolekyylit ja fosforyloi solulimassa olevan *virG*-proteiinin, joka sen jälkeen kiinnittyy *vir*-geenien säätelyalueelle aktivoitujen *vir*-geenit (Zambryski 1992). Agrobakteeri-vektoreita on käytetty siirrettäessä geenejä lehtipuihin, etenkin poppeleihin (Klopfenstein ym. 1997) ja havupuista lehtikuuseen (Levéé ym. 1997).

Geeninsiirtoon käytettäviä aseita on olemassa useita erilaisia, joskin kaupallisesti saatavilla on vain muutama malli. Menetelmällisesti siirrettävät geenit / DNA saostetaan joko kulta- tai wolframihukkasten pinnalle ja nämä ammutaan kasvisolukkaan. Hiukkasten kiihdyttämisessä käytetään tavallisesti joko sähkövarauksen- tai kaasunpaineen purkausta. Vaikka menetelmä on suhteellisen yksinkertainen ja nopea, niin se on kuitenkin optimoitava sekä fysikaalisten että biologisten tekijöiden suhteen kul-

loinkin kohteena olevan lajin ja solukon mukaan. Optimoitavia fysikaalisia tekijöitä ovat mm. kaasunpaine, kultahiukkasten koko, DNAn määrä ja etäisyys kohteena olevan kasvimateriaalin ja siirrettävän DNAn välillä. Optimoitavista biologisista tekijöistä mainittakoon esim. solukkotyyppi ja kehitysvaihe. Biolistista asetta on käytetty etenkin siirrettäessä geenejä havupuihin. Myös kotimaisilla havupuulajeilla kuusella (Newton ym. 1992, Robertson ym. 1992, Yibrah ym. 1994, Clapham ym. 1995) ja männyllä (Aronen ym. 1994, Aronen ym. 1995, Aronen 1996) on saatu lupaavia tuloksia.

Merkkigeeneistä laatuominaisuuksiin

Suuressa osassa metsäpuilla ja etenkin havupuilla tehdyistä geeninsiirroista on ollut kysymys geeninsiirtotekniikan kehittämistä ja niinpä siirtokohteena olevat geenit ovat olleet lähinnä reportteri- ja merkkigeenejä. Näiden geenien avulla voidaan varmistaa geenien siirtyminen kasvisoluun ja niiden toiminta siellä. Useimmat merkkigeenit on alunperin eristetty bakteereista, koska niiden tehtävän kannalta on tärkeää, että niitä ei ole luonnostaan kasvisoluissa.

Reportterigeenien toiminnan tuloksena syntyy entsyymiproteiineja, joiden määrä siirtogeenissä solussa on helppo määrittää. Näitä geenejä käytetään myös yleisesti tutkittaessa erilaisten säätelyalueiden tehoa ja toimintaa. Tavallisimmin käytetty reportterigeeni on b-glukuronidaasi eli GUS (*uidA*)-geeni, joka on alunperin eristetty *Escheri-*

Ligniinisynteesiin vaikuttavien geenien muuntelu

Metlan Punkaharjun tutkimusasemalla ollaan aloittamassa Suomen Akatemian Metsäalan tutkimusohjelmaan kuuluvaa hanketta, jossa tutkitaan ligniinin biosynteesiin vaikuttavien geenien toimintaa ja mahdollisuutta vaikuttaa niitä muokkaamalla kotimaisen puuraaka-aineen laatuun. Ligniini on kasvien soluseinissä esiintyvä aromaattinen biopolymeeri. Sen tehtävänä on sitoa kasvisolut toisiinsa ja se luo edellytykset puun mekaaniselle kestävyydelle. Puiden ligniinipitoisuuden ja -koostumuksen geenitekniisen muuntamisen uskotaan tarjoavan mahdollisuuden alentaa selluloosan tuoton kustannuksia ja ympäristöhaittoja.

Tutkimuksen kohdelajeina ovat rauduskoivu, kuusi ja mänty. Tutkimus aloitetaan *O*-metyylitransferaasi (OMT)-geenistä, joka kontrolloi sekä ferulihapon että sinappihapon muodostusta ligniinin biosynteesireitissä. OMT on tarkoitus siirtää joko CaMV 35S- tai Ubb1-promoottorin säätelämäksi ja seurata sen yli/alitoiminnan vaikutuksia ligniinin muodostumiseen. Lisäksi tutkitaan OMT:n oman promoottorin toimintaa yhdistämällä se b-glukuronidaasi reportterigeeniin.

cia coli -bakteerista. GUS-geenin ilmeneminen solukoissa on helppo havaita. Reporterigeenivaihtoehtoja on kuitenkin nykyisin jo useita. Esimerkiksi joko hyönteisistä tai bakteereista peräisin olevien lusiferaasigeenien ja maneeitista eristetyt GFP (green fluorescent protein)-geenin toiminnan havainnointi perustuu bioluminesenssi-ilmiöön. Muita ainakin toistaiseksi vielä vähemmän käytetyistä reporterigeeneistä ovat esim. antosyaanit.

Geeninsiirroissa käytettävät valikoitavat merkki-geenit ovat yleensä geenejä, jotka antavat kasville kestävyden joko antibiootteja tai herbisidejä vastaan. Vain ne solukot, joissa ko. kestävyysgeeni on, voivat kasvaa ko. antibiootia tai herbisidiä sisältävällä kasvatusalustalla. Yleisimmin käytetty valikoitava merkkigeeni on *E. coli* 'sta eristetty neomy-siinifosfotransferaasi-geeni (NPTII), joka inaktivoi selektiossa käytetyn kanamysiini-antibiootin. Myös muita samalla periaattella toimivia antibiootikes-tävyyden aikaansaavia geenejä on käytössä. NPTII geeniä ei kuitenkaan voida pitää optimaalisena merkkigeeninä kaikille kasvilajeille ja -solukoille. Esimerkiksi useimmat havupuut sietävät vain verrattain matalia kanamysiinipitoisuuksia. Lehtipuilla kanamysiinikestävyys on lajikohtaista, joillakin lajeilla kanamysiini estää erilaistumista, kun taas toiset lajit kestävät hyvinkin korkeita pitoisuuksia.

Metsäpuilla perinteisistä jalostustavoitteista hyvä kasvu ja laatu sekä sopeutuneisuus kasvatuspaikal-

le ovat tähän mennessä olleet vaikeasti geeninsiirtojen kautta saavutettavissa, sillä useimmat ko. ominaisuuksista ovat useiden geenien toiminnan tulosta, eikä geenejä edes välttämättä tunneta. Lisäksi kerrallaan siirrettäviä geenejä voi olla vain rajoitettu määrä. Lehtipuihin geenejä siirrettäessä onkin tähän asti viljelykasvien tapaan paljon käytetty kestävyysgeenejä (hyönteis- tai vesakontorjunta-aineelle kestävyden antavia geenejä). Osittain siksi, että nämä ominaisuudet ovat yhden geenin aikaansaamia ja ovat siis helposti geeninsiirtotekniikoiden avulla siirrettävissä. Tulevaisuuden pää-tavoitteena voidaan kuitenkin pitää laatuominaisuuksiin esimerkiksi ligniinisynteesiin vaikuttavien geenien siirtoa, joka tunnettujen geenien määrän kasvaessa tulee entistä realistisemmaksi.

Geeninsiirtojen onnistumiseen vaikuttavista tekijöistä

Eräs tärkeä geeninsiirtojen onnistumiseen vaikuttava tekijä on lajin solukkoviljeltävyys. Esimerkiksi mäntylajeista ensimmäisenä on transformoitu radiatamänty (Walter ym. 1994), joka on erinomainen esimerkki kloonatun materiaalin tuotosta solukkoviljelyn avulla käytännön viljelyyn. Siirtogeenisiä taimia on myös saatu aikaan valkokuusella ja mustakuusella (Ellis ym. 1993, Charest ym. 1996),

joilla somaattinen embryogeneesi toimii. Hyvä solukkoviljeltävyys ei kuitenkaan automaattisesti ennakoi menestystä myös geeninsiirtojen saralla. Esimerkkinä lajista, jolla solukkoviljelymenetelmät toimivat, ja jolla on myös paljon tehty geeninsiirtotutkimusta ilman että ainakaan toistaiseksi olisi julkaistu tuloksia siirtogeenisistä taimista, on loblolly-mänty.

Vain harvoissa tapauksissa solukkoviljelyvaihetta ei tarvita. Tällainen tilanne on mm. käytettäessä ns. ko-inokulaatiomenetelmää. Menetelmässä siirtogeenisiä versoja saadaan muodostumaan kun villityyppisellä *Agrobacterium tumefaciens* -kannalla 82.139 ja halutulla muokatulla agrobakteeri-kannalla inokuloidaan yhtä aikaa kohdesolukkoa (Brasileiro ym. 1991). Tämä menetelmä soveltuu kuitenkin vain muutamalle lehtipuulajille. Käyttämällä transformoituja siitepölyhiukkasia kontrolloiduissa risteytyksissä voidaan myös välttää solukkoviljelyvaihe. Tällaista menetelmää ollaan parhaillaan kehittämässä männylle ja kuuselle (Häggman ym. 1997, Aronen ym. 1998).

Toimiakseen kasvilla siirrettävissä geneeissä tulee olla säätelyalueet. Vuosien varrella on tutkittu paljon sitä miten eri säätelyalueet toimivat eri lajeilla ja eri solukoissa. Parhaita olisivat tietenkin pitkäikäisten metsäpuiden kyseessä ollen solukko- tai kehitysvaihespesifiset säätelyalueet, mutta tällaisia tunnetaan toistaiseksi vain muutama. Yleisimmin metsäpuiden geeninsiirroissa käytettävät säätelyalueet ovat jatkuvatoomisia tai eri tavoin indusoituvia.

Koska geenitoimintaan vaikuttavat myös muut tekijät, on joihinkin siirrettäviin geneeihin lisätty lyhyitä DNA-jaksoja, jotka tehostavat proteiinisynteesiä. Tällaisia geneejä on käytetty myös metsäpuilla (esim. Charest ym. 1993, Aronen 1996). Joissakin, mutta ei kaikissa, tapauksissa nämä ovat lisänneet merkittävästi myös siirtogeenien ilmenemistä.

Yhä edelleenkin geeninsiirroille on tyypillistä, että siirrettyjen geenien ilmeneminen vaihtelee siirtogeenisissä kasveissa, jotka ovat peräisin erillisistä transformaatiotapahtumista. Käytettiinpä mitä geenisiirtomenetelmää tahansa ei tiedetä mikä määrää vieraiden geenien liittymiskohdan kromosomeihin. Joissakin tutkimuksissa on havaittu, että geeninsiirrot onnistuvat parhaiten solukoihin joissa tapahtuu runsaasti solujakoa. Geenien on arveltu liittyvän

kromosomien aktiivisiin alueisiin solunjakojen aikana. Ilmeisesti geneejä siirtyy kuitenkin myös muille kromosomialueille. Viime aikoina onkin kiinnitetty huomiota ns. MAR- (matrix attachment regions) ja SAR- (Scaffold attachment regions) DNA-jaksoihin, joiden on havaittu lisäävän siirtogeenien ilmenemistä sekä vähentävän siirtogeenisten kasvien välistä vaihtelua. Näitä DNA-jaksoja on kuitenkin toistaiseksi käytetty kasvitutkimuksessa vasta vähän ja metsäpuilla ei lainkaan. Näillä jaksoilla lienee huomattavaa merkitystä geeninsiirtomenetelmiä edelleen kehitettäessä.

Siirtogeeniset metsäpuut

Yleisesti ottaen geeninsiirtojen avulla on haluttu parantaa kasvien herbisidi-, virus- tai hyönteiskestävyyttä siirtämällä ko. kestävyysgenejä alttiisiin lajeihin tai lajikkeisiin. Tämä on ymmärrettävää etenkin maanviljelykasveilla, joilla hyönteisten tai tautien takia menetetään merkittävä osa sadosta. Metsäpuihin on tähän mennessä siirretty etupäässä reportterigenejä, agrobakteerin T-DNA:n genejä ja kestävyysgenejä. Kestävyysgeenien siirron tarpeellisuutta pitkäikäisiin metsäpuihin on kuitenkin harkittava tarkkaan, sillä se on eri asia kuin vastaavien geenien siirto 1–2-vuotisiin viljelykasveihin. Metsäpuut poikkeavat monista maatalouskasveista geeninsiirtojen kohteena myös sikäli, että niitä kasvaa laajoina luonnonpopulaatioina, joihin siirtogeenit ilman erityistoimia voivat siitepölyn välityksellä helposti levitä. Tulevaisuudessa, kun geenisiirtomenetelmät eri lajeille ovat kehittyneempiä, myös metsäpuiden kohdalla painopiste siirtynee laatuominaisuuksien muuntamiseen.

Kenttäkokeita on siirtogeenisillä metsäpuilla koko maailmaa ajatellen perustettu vähän. Eniten kenttäkokeita on perustettu poppeli-lajeilla, jotka ovat agrobakteeri-välitteisen geeninsiirron mallikasveja. Siirtogeenisiä taimia on kuitenkin tuotettu jo lukuisilla muilla lehtipuilla ja havupuista valkokuusella (Ellis ym. 1993), mustakuusella (Charest ym. 1996), radiatamännillä (Walter ym. 1994) ja lehtikuusella (Huang ym. 1991, Shin ym. 1994, Séguin ym. 1996, Levée ym. 1997).

Merkittäväksi katsottujen ominaisuuksien siirron lisäksi geeninsiirrot ja siirtogeeniset kasvit avaavat



Kuva 1. Esimerkki geeninsiirtotekniikan käytöstä tutkimustarkoitukseen. Siirretyt hormonigeenit saavat aikaan rauduskoivulle epätyypillisen pensasmaisen kasvutavan. Kuva Jouko Lehto.

myös tutkimukselle uusia mahdollisuuksia lajien geneettisen rakenteen ja säätelyn tutkimiseksi. Spesifiset muutokset yksittäisissä geneeissä, geenien yli- tai alitoiminta lisäävät tietoa kasvin perimästä ja geenien toiminnasta. Siirtogeenisten kasvien avulla voidaan tutkia esimerkiksi hormonigeenien eli hormoneja tuottavien geenien vaikutusta kasvien kehitykseen (kuva 1) tai voidaan suunnitella kokeita, jotka ennakoivat ilmastonmuutoksen aiheuttamia seurauksia.

Viitteet

- Aronen, T. 1996. Genetic transformation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Väitöskirja. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 595.
- , Häggman, H. & Hohtola, A. 1994. Transient β -glucuronidase expression in Scots pine tissues derived from mature trees. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 2006–2011.
- , Hohtola, A., Laukkanen, H. & Häggman, H. 1995. Seasonal changes in the transient expression of a 35S CaMV-GUS gene construct introduced into Scots pine buds. *Tree Physiology* 15: 65–70.
- , Häggman, H.M. & Salonen, M. 1996. Rooting of Scots pine fascicular shoots by *Agrobacterium* rhizogenes. *Forest Genetics* 3: 13–22.
- , Nikkanen, T. & Häggman, H. 1998. Compatibility of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine pollen. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 79–86.
- Brasileiro, A.C.M., Leplé, J.C., Muzzin, J., Ounnoughi, D., Michel, M.F. & Jouanin, L. 1991. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. *Plant Molecular Biology* 17: 441–452.
- Charest, P.J., Devantier, Y. & Lachance, D. 1996. Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce).

- ce) via particle bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 32: 91–99.
- Clapham, D., Manders, G., Yibrah, H.S. & von Arnold, S. 1995. Enhancement of short- and medium-term expression of transgenes in embryogenic suspensions of *Picea abies* (L.) Karst. *Journal of Experimental Botany* 46: 655–662.
- Ellis, D., McCabe, D., McInnis, S., Ramachandran, R., Russell, D., Wallace, K., Martinell, B., Roberts, D., Raffa, K. & McCown, B. 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology* 11: 84–89.
- Fillatti, J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. & Coimai, L. 1987. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Molecular & General Genetics* 206: 192–199.
- Häggman, H.M. & Aronen, T.S. 1996. *Agrobacterium* mediated diseases and genetic transformation in forest trees. In: Raychaudhuri, S.P. & Maramorosch, K. (Eds) *Forest Trees and Palms – Diseases and Control*. p. 135–180. Oxford & IBH Publ. Co. Pvt. Ltd., New Delhi / Calcutta.
- Häggman, H., Aronen, T. & Nikkanen, T. 1997. Gene transfer by particle bombardment to Norway spruce and Scots pine pollen. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 928–935.
- Huang, Y., Diner, A. & Karnosky, D. 1991. *Agrobacterium* rhizogenes mediated transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 27P: 210–217.
- Klopfenstein, N.B., Chun, Y.W., Kim, M.-S. & Ahuja, M. (eds.); Dillon, M.C., Carman, R.C. & Eskew, L.G. (tech. eds.), 1997. *Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus*. Gen. Tech. Rep. RM-GTR-297. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 326 p.
- Levéé, V., Lelu, M.-A., Jouanin, L. & Cornu, D. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* x *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Reports* 16: 680–685.
- Newton, R.J., Yibrah, H.S., Dong, N., Clapham, D.H. & von Arnold, S. 1992. Expression of an abscisic acid inducible promoter in *Picea abies* (L.) Karst. following bombardment from an electric discharge particle accelerator. *Plant Cell Reports* 11: 188–191.
- Robertson, D., Weissinger, A.K., Ackley, R., Glover, S. & Sederoff, R.R. 1992. Genetic transformation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) using somatic embryo explants by microprojectile bombardment. *Plant Molecular Biology* 19: 925–935.
- Séguin, A., Lachance, D. & Charest, P.J. 1996. Transient gene expression and stable genetic transformation into conifer tissues by microprojectile bombardment. *Plant Tissue Culture Manual B13*: 1–46.
- Shin, D.I., Podila, G.K., Huang, Y. & Karnosky, D. 1994. Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Can. J. For. Res.* 24: 2059–2067.
- Walter, C., Smith, D.R., Connett, M.B., Grace, L. & White, D.W.R. 1994. A biolistic approach for the transfer and expression of a *gusA* reporter gene in embryogenic cultures of *Pinus radiata*. *Plant Cell Reports* 14: 69–74.
- Yibrah, H.S., Manders, G., Clapham, D.H. & von Arnold, S. 1994. Biological factors affecting transient transformation in embryogenic suspension cultures of *Picea abies*. *Journal of Plant Physiology* 144: 472–478.
- Zambryski, P.C. 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular biology* 43: 465–490.

■ FT Hely Häggman toimii erikoistutkijana Metlan Punkaharjun tutkimusasemalla.