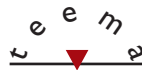


Tuija Aronen

Metsäpuiden geeniteknikka



Biotekniikka on monialaista tutkimusta

Metsäpuiden biotekniikkaan kuuluvat puiden solukkoviljely, materiaalin säilytys syväjäädädyksen avulla, geeniteknikan menetelmät ja erilaisten molekyyli-markkereiden käyttö. Solukkoviljely ja syväjäädädyssäilytys eli kryopreservatio kuuluvat yhteen sikäli, että syväjäädetyt aineiston kasvattaminen edellyttää sopivan solukkoviljelymenetelmän käyttöä, ja toisaalta osa solukkoviljelymenetelmistä vaatii materiaalin ajoittaista syväjäädädytystä monistumiskyvyn ylläpitämiseksi. Kasvullisen lisäyksen tekniikoista myös pistokasmonistusta voidaan tehostaa biotekniikan keinoin käyttämällä kasvihormonikäsittelyjä, agrobakteereja tai sienijuurisieniä apuna juurrutuksessa.

Geeniteknikka puolestaan sisältää eri ominaisuuksiin vaikuttavien perintötekijöiden tunnistamisen, eristämisen, toimintatavan tutkimisen ja mahdollisen muokkaamisen. Geeniteknikan soveltaminen edellyttää yleensä lajin solukkoviljelyn hallitsemista. Molekyyli-markkerit ovat helposti ja luotettavasti havaittavissa olevia biokemiallisia merkkejä, jotka voivat myös kytkeytyä johonkin tiettyyn ominaisuuteen. Perinteisesti markkereina on käytetty esimerkiksi terpeenejä ja isoentsyymejä. Nykyään valtaosa käytetyistä markkereista on perintöaineksesta itsestään eri menetelmillä löydettävissä olevia DNA-merkkejä.

Tässä artikkelissa on esitelty metsäpuiden geeniteknikatutkimusta eri näkökulmista. Ensin on ker-

rottu geeninsiirtotekniikoiden kehittelystä yleensä, eri lajeilla käytössä olevista tekniikoista tai siitä, miten pitkälle niiden kehittämisessä on toistaiseksi päästy. Seuraavaksi on tarkasteltu tutkimusaiheita ja ominaisuuksia, joissa on sovellettu metsäpuiden geenimuuntelua tai joita voitaisiin mahdollisesti soveltaa tulevaisuudessa käytännön metsänviljelyn edistämiseen. Lopuksi on selostettu siirtogeenisellä puuaineistolla tehtyjä kenttäkokeita ja niistä saatuja kokemuksia.

Metsäpuut geeniteknikan kohteina

Geeniteknikka tarjoaa oivallisen tavan selvittää perintötekijöiden rakennetta ja toimintaa, oli kyse sitten puista tai muista eliöistä. Geeninsiirtojen soveltamisessa metsänjalostukseen ja käytännön metsätalouteen on vielä kuitenkin monia avoimia kysymyksiä. Parhaita kohteita geeninsiirroille olisivat vanhat, ominaisuuksiltaan hyvin tunnetut puut. Nykyisin käytössä olevat geeninsiirtomenetelmät perustuvat kuitenkin taimien tuottamiseen solukkoviljelyn kautta, mikä ei onnistu aikuisilla havupuilla. Geeninsiirtoja voidaan tietysti tehdä myös nuoresta puusta peräisin olevaan solukkoon tai jopa siitepölyyn, mutta tällöin kohdeyksilöiden ominaisuudet eivät vielä ole tiedossa eivätkä valitut puut siis välttämättä ole toivotunlaisia muilta ominaisuuksiltaan.

Eräillä hedelmäpuilla (*Citrus*) on onnistuttu tuottamaan aikuisesta puumateriaalista siirtogeenisiä

taimia, jotka on lisäksi saatu kukkimaan ja tekemään hedelmiä hyvin nuorina (14 kk iässä). Tämä on saatu aikaan varttamalla aikuisten puiden silmuja nuoriin siementaimiin ja käyttämällä näitä vartteita geeninsiirron kohteena. Lopuksi siirtogeeniset, aikuista ilmiä olevat versot on jälleen vartettu elinvoimaisiin perusrunkoihin. Tämä Espanjassa tehty tutkimus osoittaa että puiden pitkään sukupolvenvälisiin ja aikuisten puiden vaikeaa kasvulliseen lisääntyneeseen liittyvät ongelmat ovat ainakin joillakin lajeilla kierrettävissä. Siirtogeenisten puiden hyödyntäminen käytännön viljelyssä edellyttäisi kuitenkin yleensä lajin kasvullisen lisäyksen hallintaa.

Metsäpuiden ominaispiirteet ja metsäluonnon monimuotoisuus luovat oman kehyksensä geenitekniikan soveltamiselle. Tärkeimpien metsäpuidemme populaatioissa on paljon perinnöllistä muuntelua, ja ne ovat sopeutuneet hyvin monenlaisiin ympäristöihin. Tämän monimuotoisuuden ylläpito siirtogeenisessä aineistossa edellyttäisi, että sama geenitekniinen muunnos pystyttäisiin tekemään tai viemään moniin eri yksilöihin. Puut ovat pitkäikäisiä, joten siirtogeenin tulisi toimia halutulla tavalla vuosikymmeniä ja siitä korjuuhetkellä saatavan hyödyn pitäisi vastata kehittämiskustannuksia. Puiden ristisiittoisuus ja tuulipölytteisyys puolestaan levittävät siirtogeenit ympäröiviin luonnonmetsiin, jollei siirtogeenisistä puista tehdä kukkimattomia.

Siirtogeenien vaikutukset ympäröivään eliöyhteisöön riippuvat tietenkin paljon geneeistä itsestään: Esimerkiksi puiden omien, latvuksen muotoon vaikuttavien geenien ja bakteeriperäisten hyönteiskestävyyttä lisäävien geenien yleistymisen vaikuttavat varmasti eri tavoin metsän muihin eliöihin. Toistaiseksi puiden geenimuuntelussa on käytetty paljon toisista lajeista peräisin olevaa geeniainesta, mutta sitä mukaa kun puiden omien geenien kartoitus ja eristäminen etenee, mahdollisuudet käyttää kohdelajien omia rakennegeenejä ja säätelyalueita paranevat. Tulevaisuudessa siirtogeenitekniikkaa voitaneen käyttää myös täysin lajinsisäisten, edullisten alleeliyhdistelmien luomiseen.

Siirtogeenisen materiaalin käyttöä jalostuksessa on myös pohdittu. Kuten minkä tahansa aineiston jalostuksessa, perinnöllisen muuntelun luominen ja sen arviointi, sekä toivotunlaisten yksilöiden valinta ovat keskeisessä asemassa myös siirtogeenisten kasvien kohdalla. Lähtötilanne siirtogeenisen aineiston

kohdalla on kuitenkin toinen kuin esimerkiksi yrittäessä siirtää toivottuja geenejä kaukoristeytysten ja takaisinristeytysohjelmien kautta. Kaukoristeytyksissä siirtyy aina runsaasti jalostuksen kannalta epäsuotavia, tuntemattomia geenejä. Geeninsiirtojen kohteeksi voidaan sen sijaan valita muilta ominaisuuksiltaan hyvin tunnettua, valmiiksi jalostettua aineistoa.

Siirtogeenien toimintaa voidaan arvioida sekä molekyyllitasolla että tarkastelemalla kasvin ominaisuuksia. Siirtogeenien molekyyllitason ilmeneminen ja toivottu ominaisuus voivat korreloida vahvasti keskenään, jolloin siirtogeenisestä aineistosta voidaan valita sopivimmat yksilöt jo työn varhaisessa vaiheessa, mutta aina näin ei ole. Lisäksi on tärkeää selvittää siirtogeenien toiminta erilaisissa ympäristöissä, eri perinnöllisessä taustassa (=eri yksilöissä) ja sukupolvien yli. Siirtogeeni voi periytyä mendelistisesti tai sen periytyminen voi olla jollain lailla poikkeavaa. Näin voisi käydä teoriassa, jos siirtogeeni on esimerkiksi kromosomin sijasta kiinnittynyt organellin DNA:han tai kiinnittymispaikallaan tai toiminnallaan häiritsee sukusolujen muodostumiseen liittyvien geenien toimintaa. Siirtogeenien vaikutuksia arvioitaessa tuleekin tarkastella kasveja kokonaisuutena. Geeniteknisesti muunnellun ominaisuuden lisäksi on huomioitava kasvin kasvua, kestävyyttä ja sopeutuneisuutta – kuten millä tahansa jalostusaineistolla.

Geeninsiirtomenetelmien kehittäminen

Geeninsiirtotekniikoita kehitettäessä siirrettävinä geneeinä käytetään yleensä toiminnaltaan helposti havaittavissa olevia reportteri- ja selektorigenejä, joista yleisimmät ovat bakteeriperäiset β -glukuronidaasi-geeni (*GUS*, *uidA*) ja neomysiinifosfotransferaasi-geeni (*npt*). Näitä geenejä on käytetty eniten myös kehitettäessä menetelmiä metsäpuille. Yleisesti voidaan myös todeta, että solukkomateriaalin käyttöön perustuvien geeninsiirtotekniikoiden sovellettavuus lajien sisällä rajautuu luonnollisesti vain niihin yksilöihin, jotka ovat solukkoviljeltävissä. Tämän lisäksi geeninsiirtojen onnistumisessa voi olla vaihtelua myös solukkolisäätävien kloonien välillä.

Kun kokemuksia geeninsiirroista on kertynyt, on samalla ilmennyt joitakin siirtotekniikoihin ja siirto-

geenien toimintaan liittyviä ongelmia. Nykyisillä geeninsiirtotekniikoilla siirrettävä DNA liittyy satumanvaraiseen kohtaan tai kohtiin kohdekasvin perimää, joko yhtenä tai useampana kopiona. Kohdegeenien lisäksi kasvin perimään liittyy samalla useimmiten myös käytetyn geeninsiirtovektorin (agrobakteerista kasviin siirtyvä ns. T-DNA tai ammuttava rengasrakenteinen DNA eli plasmidi) osia, ja satunnaisesti voi siirretty DNA myös järjestäytyä uudelleen. Toisaalta tyypillisestä kasvukromosomista suurin osa on ns. täyte-DNA:ta, ja myös kasvien omat geenit ovat useina toimivina ja toimimattomina kopiona sijoittuneena ympäri perimää. Kasvien perimässä on myös ns. hyppiviä geenejä, paikasta toiseen siirtyviä transposoneja, jotka voivat olla kymmeniä prosentteja koko lajin perimästä. Siirtogeenin liittymiskohdan tiedetään vaikuttavan sen toimintaan, samoin siirtyneiden kopioiden lukumäärän. Esimerkiksi Saksassa on hybridihaavalla havaittu, että *rolC*-siirtogeeni, joka herkistää solut kasvin omille hormoneille, hiljeni herkimmin linjoissa, joissa se oli monena kopiona tai joissa se oli liittynyt sellaiseen kohtaan perimää, jossa on runsaasti adeniiini- ja tyymiini-emäksiä. Myös käytetyllä geeninsiirtomenetelmällä on vaikutusta: biolistisessa transformaatioissa siirtogeeni siirtyy helpommin useana kopiona kuin käytettäessä agrobakteeri-vektoreita.

Tutkimusta geeninsiirtomenetelmiin liittyvien teknisten ongelmien ratkaisemiseksi ja siirtogeenien toiminnan vakauttamiseksi tehdään koko ajan. Esimerkiksi riisillä on osoitettu, että biolistinen geeninsiirto toimii hyvin myös käyttämällä lineaarista DNA:ta plasmidin sijasta, jolloin kasviin ei siirry mitään ylimääräistä. Samalla siirtogeenin kopiomäärä ja siinä tapahtuneet uudelleenjärjestäytymiset vähenivät merkittävästi, eikä siirtogeenin hiljenemistä voitu havaita vielä 4. sukupolvessa geeninsiirron jälkeenkään. Toinen keino vakauttaa siirtogeenien toimintaa ovat ns. MAR-alueet (*Matrix Attachment Regions*) eli siirtogeenin molemmin puolin sijoitettavat DNA-sekvenssit, jotka sitoutuvat kromosomeissa ympäröivään ainekseen muodostaen välisestäään DNA:sta lenkkirakenteen, jonka toiminta on ympäröivästä perintöaineksesta riippumatonta. MAR-alueiden on osoitettu parantavan GUS-siirtogeenin toimintaa sekä poppelissa että valkomännyn kasvullisia alkioita tuottavissa solukoissa.

Tutkimusta tehdään myös sellaisten geeninsiirto-

menetelmien kehittämiseksi, jotka eivät vaatisi antibiootti- tai herbisidikestävyuden käyttämistä siirtogeenisten solujen valinnassa. Antibiootti- tai herbisidikestävyysgeenien käyttöä geeninsiirtojen teknisenä apuvälineenä on arvosteltu geenien mahdollisten ympäristövaikutusten vuoksi. Kestävyysgeeneistä voi olla teknistä haittaa myös jos valintapaineena käytetty antibiootti tai herbisidi vaikeuttaa taimien regenerointia tai jos siirtogeeniseen materiaaliin haluttaisiin myöhemmin siirtää vielä muita geenejä. Kestävyysgeenit voidaan usein poistaa takaisinjärjestyksen kautta, mikä ei kuitenkaan tule metsäpuilla kysymykseen niiden pitkän sukupolvenvälin vuoksi.

Vaihtoehtoja kestävyysgeenien käytölle on kehitelty. Yksi mahdollisuus on käyttää geenejä, jotka antavat siirtogeenisille soluille solukko-tiljelyssä aineenvaihdunnallisen valintaedun, eli kyvyn kasvaa ja erilaistua ilman jotakin tavanomaisesti solukko-tiljelyalustasta saatavaa ainetta, kuten sytokiniini-kasvihormonia. Solukko-tiljelyalustassa voidaan myös käyttää energianlähteenä tavanomaisen sakkaroosin sijasta hiilihydraatteja, kuten mannoosi tai ksyloosi, joita vain ko. siirtogeenin saaneet solut pystyvät hyödyntämään. Näiden vaihtoehtoisten valintamenetelmien on osoitettu toimivan monilla ruohovartisilla kasveilla. Puuvartisista kasveista mannoosin käyttöön perustuvaa valintaa on kokeiltu omenalla, jolla se ei kuitenkaan osoittautunut toimivaksi.

On myös olemassa geeninsiirtomenetelmä, jolla voidaan tuottaa siirtogeenisiä kasveja ilman selektori- tai markkerigeenejä. Tämän MAT (*Multi-Auto-Transformation*)-menetelmän on osoitettu toimivan myös hybridipoppelilla (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*). Menetelmässä siirtogeenisten solujen valintaan solukko-tiljelyvaiheessa käytetään *ipt*-geeniä, joka on sijoitettu maissin *Ac*-transposoniin eli ns. hyppivän geenin sisälle. *Ipt*-geenin toiminta vaikuttaa hormonitasoon siirtogeenisissä soluissa ja aikaansaa runsaan versonmuodostuksen, jonka perusteella siirtogeeniset solukot voidaan poimia erilleen. Transposonilla puolestaan on kyky siirtyä itsestään perimän osasta toiseen. Siirtymään lähteneistä transposoneista kuitenkin noin 10 % häviää matkalla, jolloin myös niiden sisällä ollut *ipt*-geeni katoaa kasvista. Tällöin versonmuodostus normalisoituu ja tuloksena syntyy siirtogeeninen kasvi, jossa ei enää esiinny ylimääräisiä selektorigeenejä.

Geeninsiirrot kotimaisiin puulajeihin onnistuvat

Geeninsiirto kuuseen (*Picea abies*) on onnistunut useissa laboratorioissa eri puolilla maailmaa (Ruotsi, Uusi-Seelanti, Yhdysvallat) sekä biolistisella että agrobakteeri-välitteisellä menetelmällä. Kohdemateriaalina on käytetty kasvullisia alkioita tuottavia solukoita, joista suuri osa (esim. 16 % biolistisella menetelmällä) on tuottanut siirtogeenisiä linjoja. Taimien regenerointi näistä linjoista on myös onnistunut hyvin, ja kuusesta onkin olemassa useita satoja siirtogeenisiä kloonveja. Myös muille kuusilajeille (*P. glauca*, *P. mariana*) on olemassa vastaavanlaisia geeninsiirtomenetelmiä.

Geeninsiirtomenetelmän kehittämiseksi mäntyille (*Pinus sylvestris*) on tehty paljon tutkimustyötä mm. Suomessa, mutta toisin kuin kuuselle, sille ei ole vielä olemassa varmasti toimivaa tekniikkaa. Eri-laisten mäntyn solukkoviljelyaineistojen on todettu soveltuvan biolistisen geeninsiirron kohteeksi, ja tutkimuksen tuloksena on saatu aikaan siirtogeenisiä solukoita. Taimia näistä solulinjoista ei toistaiseksi ole saatu tuotettua. Geeninsiirto mäntyyn on kuitenkin onnistunut siitepölyn välityksellä. Tekniikassa siitepölyä käytetään biolistisen geeninsiirron kohteena, jonka jälkeen sillä tehdään kontrolloituja risteytyksiä. Siirtogeenisten yksilöiden osuus risteytysjälkeläistöistä on kuitenkin hyvin pieni, eikä menetelmä ole vielä rutiinikäytössä. Onnistuneista geeninsiirroista muihin, kasvullisesti kotoista mäntyamme helpommin lisättäviin mäntylajeihin, on vain muutamia raportteja. Siirtogeenisiä taimia on saatu tuotetuksi Uudessa-Seelannissa radiatamännyn (*P. radiata*), Kanadassa valkomännyn (*P. strobus*) ja Yhdysvalloissa loblollymännyn (*P. taeda*) solukkoviljelmistä.

Edellä mainittujen eri *Picea*- ja *Pinus*-lajien lisäksi siirtogeenisiä taimia on havupuilla onnistuttu tuottamaan vain lehtikuusista Yhdysvalloissa ja Ranskassa. Euroopanlehtikuusen (*Larix decidua*) ja sen hybridin (*L. kaempferi* × *L. decidua*) geeninsiirrossa on käytetty agrobakteeri-vektoreita, kun taas kanadanlehtikuusen (*L. laricina*) geeninsiirto on onnistunut biolistisella menetelmällä. Yhdysvalloissa myös marjakuusi-lajeista (*Taxus brevifolia*, *T. baccata*) on tuotettu agrobakteerien avulla siirtogeenisiä solulinjoja, joista ei kuitenkaan ole edes yritetty

regeneroida taimia.

Siirtogeenisistä koivuista on toistaiseksi julkaistu muutamia raportteja. Voidaan kuitenkin sanoa, että geeninsiirto rauduskoivuun (*Betula pendula*) onnistuu rutiininomaisesti sekä agrobakteeri-välitteisellä että biolistisella menetelmällä, joita molempia on tällä lajilla sovellettu ensimmäisenä Suomessa. Kohdemateriaalina molemmissa menetelmissä käytetään solukkoviljeltyjä koivunversoja. Toistaiseksi geeninsiirroissa käytettyjen koivukloonien lukumäärä on ollut pieni. Onnistuminen siirtogeenisten linjojen tuotossa vaihtelee lisäksi kloonista riippuen. Hieskoivusta (*B. pubescens*) ei julkaistua tietoa ole, mutta se lienee geenimuuntelun kannalta rauduskoivun kaltainen kohdelaji. Muista koivulajeista siirtogeenisten taimien tuotanto on onnistunut ainakin *B. platyphylla* var. *japonica* -lajilla Japanissa agrobakteeri-menetelmällä.

Populus-suvun lajeista on helpon solukkoviljeltävyytensä vuoksi tullut puuvartisten kasvien geenitekniikan tutkimuksen mallikasveja. Ensimmäinen julkaisu siirtogeenisistä poppeleista ilmestyi vuonna 1987. Sen jälkeen *Populus*-lajeihin ja lajihybrideihin tehdyistä geeninsiirroista on julkaistu kymmeniä raportteja eri puolilla maailmaa. Kohdemateriaalina ovat useimmiten olleet solukkoviljellyt versot ja geeninsiirtovektorina agrobakteeri, myös haavan (*P. tremula*) ja hybridihaavan (*P. tremula* × *P. tremuloides*) tapauksessa. *Populus*-lajeilla on käytetty myös muuta kohdemateriaalia, kuten protoplastiviljelmää ja agrobakteerien sijasta suoraa menetelmää, joista mainittakoon biolistinen tekniikka ja elektroporatio eli sähköpulsien avulla tapahtuva geeninsiirto. Geenitekniikkaa on hyödynnetty tutkimustarkoituksissa runsaasti mm. Ruotsissa hybridihaavalla, mutta menetelmät hallitaan myös Suomessa eri laboratorioissa. Geeninsiirron haapaan ja hybridihaapaan voi arvioida onnistuvan rutiininomaisesti liki kaikilla solukkoviljeltävillä kloonveilla, joskin siirtogeenisten linjojen tuoton helppous voi vaihdella kloonista toiseen.

Lehtipuilla siirtogeenisiä taimia on edellä mainittujen poppelien ja koivujen lisäksi tuotettu runsaasti eri hedelmäpuista, kuten omenasta, päärynästä, *Citrus*-lajeista, luumusta, mantelista, aprikoosista ja kirsikasta, ja eri *Eucalyptus*-lajeista. Jalavan suvusta geeninsiirto ja siirtogeenisen aineiston tuottaminen on onnistunut *Ulmus procera* -lajilla. Geeninsiirto-



Kuva 1. Biolistisessa geeninsiirtomenetelmässä siirrettävät geenit kuljetetaan kasvisoluihin pienten kultahiukkasten pinnalla. Kuvan laitteessa kohdesolut ovat solukkoviljelyalustalla alipainekammiossa, ja kultahiukkaset ammutaan niiden sisään heliumkaasun purkauksen avulla.

menetelmänä on lehtipuilla käytetty lähes poikkeuksetta agrobakteereja, ja taimien regenerointi tapahtuu organogeneesin kautta. Lisäksi pajuista (*Salix alba*, *S. viminalis*) on tuotettu siirtogeenisiä solukkoviljelmiä, joista ei kuitenkaan ole regeneroitu taimia.

Mitä puiden geenimuuntelulla tutkitaan?

Tutkimusaiheita, joissa metsäpuilla on sovellettu geenimuuntelua, on runsaasti. Eri lajeilla tehtyä ja meneillään olevaa tutkimusta on tässä selostettu aihepiireittäin, mutta on muistettava monien geenien vaikuttavan useampaan kuin vain yhteen puun ominaisuuteen.

Puiden lisääntymisbiologia / kukkiminen

Puiden lisääntymisbiologiaan liittyen geeniteknikkaa voitaisiin hyödyntää kahdessa eri tarkoituksessa: 1) kukkimisen aikaistamiseen lajeilla, joiden

nuoruusvaihe normaalisti on pitkä (jopa 20 vuotta), tai 2) kukkimisen estämiseen. Normaalista varhaisempi kukinta voisi nopeuttaa jalostustyötä. Steriliteetti tai viivästetty kukinta (puut korjataan ennen kukintaa) voisi puolestaan estää siirtogeenien leviämisen viljelyaineistosta lajien luonnonpopulaatioihin. Vaihtoehtoinen strategia siirtogeenien leviämisen rajoittamiseen lehtipuilla on geenin sijoittaminen tumman sijasta viherhiukkasiin. Useimmilla kasveilla viherhiukkaset eivät leviä siitepölyn mukana, joskin havupuilla viherhiukkasten periytyminen on päinvastoin paternaalista. Kukkimattomuus voi myös vähentää siitepölyn ja siitä aiheutuvien allergioiden määrää. Samalla puiden kasvu paranee, kun muutoin kukintaan kuluva energia voidaan ohjata kasvuun. Koirassteriliteettiä voitaisiin hyödyntää myös puiden siementuotannossa: täyssisar-risteytykset sisäsiemenviljelyksillä olisivat mahdollisia ilman emikukintojen eristämistä.

Lituruohosta (*Arabidopsis*) on eristetty useita kukinnan alkamiseen liittyviä geenejä, joita on sittemmin löydetty myös havu- ja lehtipuista. Lituruohon kukintageenejä on Ruotsissa siirretty hybridihaa-

paan, jossa LFY-geeni aiheutti kukinnan merkittävän aikaistumisen: siirtogeeniset kloonit tuottivat emi- ja hedekukkia 7 kk iässä normaalin 8–20 vuoden sijasta, vaikkakaan hedekukat eivät tuottaneet siitepölyä. LFY-geeni ei kuitenkaan ole toiminut samoin kaikissa *Populus*-genotyypeissä. Yhdysvalloissa on tutkittu myös LFY-geeniä vastaavan poppelein PTLF-geenin jatkuvan toiminnan vaikutuksia: PTLF aiheutti aikaisen kukkimisen vain yhdessä siirtogeenisessä poppelilinjassa. Samalla havaittiin sekä LFY- että PTLF-geenien aiheuttavan poppelilla kasvun hidastumista ja kehityshäiriöitä, jotka ilmenivät vasta joidenkin vuosien kentällä kasvamisen jälkeen. *Citrus*-puilla Espanjassa tehdyissä tutkimuksissa sekä lituruohon LFY- että API-geenit aikaistivat siirtogeenisten kloonien kukintaa normaalista 6–20 vuodesta 1 vuoteen, minkä lisäksi siirtogeenien aiheuttama ominaisuus periytyi jälkeläisille. Erot *Populus*- ja *Citrus*-tulosten välillä johtunevat erilaisesta kukinnan määräytymisestä: *Populus*-lajeilla kukkasilmujen kehitys määräytyy edellisen kasvukauden aikana, kun taas *Citrus*-puilla kukinta indusoituu saman kasvukauden ympäristötekijöiden vaikutuksesta.

Suomessa puiden kukinnan aikaistamista tutkitaan Joensuun yliopistossa. Tarkoituksena on nopeuttaa kukkimista risteytysjalostuksen ajaksi, mutta poistaa kukkimista varhaistava geeni myöhemmin esim. valinnan avulla, jolloin lopputuote ei siis olisi lainkaan siirtogeeninen. Menetelmä sopisi hyvin myös markkeri-avusteisen valinnan kanssa yhdessä käytettäväksi.

Geenitekniikkaa voidaan hyödyntää useammalla tavalla steriliteetin aiheuttamiseksi puissa. Kukin kehittyminen saadaan estetyksi joko 1) siirtämällä puuhun sytotoksiini-geeni, jonka toimintaa ohjaa kukkaspesifinen säätelyalue, niin että kukiksi kehityksessä olevat solut tuhoutuvat, tai 2) hiljentämällä lajin omat kukkien kehitystä säätelevät geenit joko antisense- tai sense-tekniikkaa käyttäen. Suomessa Joensuun yliopistossa sovelletaan molempia menetelmiä kukkimattomien koivujen tuottamiseksi.

Geeniteknisesti aiheutettu steriliteetti voi merkittävästi vähentää riskiä siirtogeenien leviämisestä puuviljelysiltä luonnonpopulaatioihin, mutta täytävä varmuutta steriliteetin säilymisestä puiden koko kiertoajan ei voida taata. Steriliteetin murtumisen riskiä voitaneen kuitenkin pienentää vaikuttamalla

useampaan kukkageeniin tai käyttämällä useita steriliteetin aiheuttamistekniikoita yhtä aikaa. Kukkimattomuus ei myöskään estä siirtogeenien leviämistä kokonaan lajeilla, jotka lisääntyvät myös kasvullisesti, kuten poppelit. Mahdolliset kasvua alentavat sivuvaikutukset selvitetään testaamalla etukäteen huolellisesti kenttäkokeissa. Kukkimattomuus itsessään ei leviä, ja steriilien puiden viljely edellyttää niiden kasvullista lisääntymistä.

Pistokkaiden juurtumisen parantaminen

Monien puulajien pistokaslisäys on vaikeaa pistokkaiden huonon juurtumisen vuoksi. Yhtenä juurtumista parantavana vaihtoehtona on tutkittu pistokkaiden käsittelyä agrobakteereilla, nimenomaan juurenmuodostusta aiheuttavilla *Agrobacterium rhizogenes*-kannoilla. Juurien indusointiin voidaan käyttää villityyppisiä bakteerikantoja, jotka myös luonnossa ja taimitarhoilla infektoivat lehtipuita. Bakteerit aiheuttavat tartuntakohtaan ns. karvajuurien muodostumisen siirtämällä osan perintöainestaan osaksi isäntäkasvin solujen perimää. Siirtyvässä perintöaineksessa on geenejä, jotka herkistävät solut kasvin omille hormoneille (*rol*-geenit) ja usein myös suoraan auksiinisynteesiä ohjaavia geenejä (*aux*-geenit), sekä bakteerien ravinnokseen käyttämien yhdisteiden, opiinien, tuotannon käynnistäviä geenejä. Sekä *rol*-että *aux*-geenien vaikutuksia kasvin maanpäällisiin osiin on tutkittu runsaasti yksittäin ja erilaisina yhdistelminä useilla lehtipuilla, kuten *Populus*-lajeilla ja koivulla.

Bakteeriympäystä pistokkaiden juurruttamisessa on tutkittu sekä monilla lehtipuilla että myös joillakin havupuilla, lähinnä vaikeasti pistokkaista lisättävillä männyillä. Tulokset vaihtelevat suuresti riippuen käytetystä bakteerikannasta, mutta yleistäen voidaan sanoa sopivalla kannalla tehdyn bakteeriympäyksen parantavan pistokkaiden juurtumista huomattavasti. Suomessa esiintyvistä puusuvuista siirtogeenisiä juuria on tuotettu ainakin *Populus*-, *Alnus*-, *Juglans*-, *Prunus*-, *Malus*-, *Larix*-, *Picea*- ja *Pinus*-lajeihin. Joissakin tapauksissa, kuten männyllä (*P. sylvestris*) Metlassa tehdyissä pistokkaiden juurrutuskokeissa syntyneiden juurien ei ole kuitenkaan pystytty osoittamaan olevan siirtogeenisiä. Parantuneen juurtumistuloksen taustalla ovat voineet

olla esim. juurtumisympäristöä, esim. mineraalien saantia muovaavat bakteerien ominaisuudet, niiden erittämät kasvihormonit, ja/tai siirtogeenien hetkellinen toiminta kasvisoluissa.

Suurin osa bakteeriympäyskokeista on tehty *in vitro* tai kasvihuoneoloissa – kentältä on kokemuksia vain joistakin hedelmäpuista. Israelissa mantelilla ja oliivilla tehdyissä kenttäkokeissa siirtogeenisen, normaalia laajemman juuriston on todettu parantavan kasvua ja satoa, mutta toisaalta 1950-luvulla Yhdysvalloissa tehdyt havainnot osoittivat omenapuiden olevan kontrollipuita pienempiä 25 vuotta *A. rhizogenes* -tartunnan jälkeen. Mikäli agrobakteeriympäystä suunniteltaisiin käytettäväksi metsänviljelyaineiston lisäyksessä, tulee muistaa, että opiineja tuottavien siirtogeenisten kasvien (juurien) on todettu voivan muuttaa juuristoalueen bakteeripopulaatioiden koostumusta. Opiineja tuottavia kasveja löytyy toki luonnostakin, muttei suurina yhtenäisinä viljelminä. Toisaalta on myös mahdollista poistaa ympäykseen käytettävistä bakteereista opiineita tuottavat geenit, ja käyttää juurten induointiin pelkkiä *rol*- ja/tai *aux*-geenejä.

Satoisuus / biomassan tuotanto

Metsäpuiden satoisuuden tai tuotetun puuaineen määrän lisäämiseksi geeniteknikan keinoin on esitetty monia eri strategioita. Koska kasvinsyöjien, tautien ja elottomien stressitekijöiden aiheuttamat tuhot heikentävät puiden kasvua, voitaisiin eri kestävyysominaisuuksia parantamalla myös lisätä puuaineen tuottoa ja parantaa osaltaan sen laatua. Kestävyysominaisuuksien geenimuuntelua on esitelty omana aihepiirinään. Kasvuun voidaan vaikuttaa myös puiden juuriston ominaisuuksien kautta. Juuriston kokoa ja sen veden- sekä ravinteidenoton tehokkuutta voitaneen lisätä *A. rhizogenes* -bakteerikantoja hyödyntämällä, kuten on selostettu kohdissa ”Pistokkaiden juurtumisen parantaminen” ja ”Ympäristönhoito / Saastuneiden maamassojen puhdistus”. Selluloosan saantoon voidaan puolestaan vaikuttaa puuaineen selluloosa- ja ligniinipitoisuuksien suhdetta muuttamalla, mitä on tarkemmin selvitetty kohdassa ”Puuaineen laatu”.

Mahdollisuuksia suoraan parantaa kasvua geeniteknikan keinoin on metsäpuilla (*Populus*-lajeilla)

tutkittu 1) vaikuttamalla orgaanisen typen sidontakykyyn, 2) muuttamalla kasvihormonisäätelyä ja 3) pidentämällä kasvuaikaa.

Espanjassa on tutkittu männystä peräisin olevan glutamiinisyntetaasigeenin (GS1) vaikutuksia *Populus tremula* × *P. alba* -lajissa. Geenin tuottama entsyymi vastaa ammonium-typen sitomisesta orgaaniseen muotoon, mikä on avainvaihe kasvien typen käytön kannalta. GS1-geenin toiminta lisäsi valkuaisaineiden ja lehtivihreän määrää siirtogeenisissä poppeleissa, minkä lisäksi siirtogeeniset taimet kasvoivat kasvihuoneessa huomattavasti kontrolleja nopeammin (21–76 % lisäys pituudessa 2–6 kk iässä). Aineistoa testataan parhaillaan kenttäkokeessa.

Kontrolleja huomattavasti parempi, noin kaksinkertainen kasvu on saavutettu myös hybridihaavalla Ruotsissa tehdyssä tutkimuksessa. Siinä gibberelliinihapon (GA; eräs kasvihormoni) määrää puissa lisättiin siirtämällä niihin lituruohosta peräisin oleva GA:n valmistusta säätelevä GA20-oksidaasi-geeni. Siirtogeenisissä klooneissa oli kontrolleja suurempi biomassan tuotanto, ja sen lisäksi niiden puuainekesä oli kontrolleja enemmän ja pidempiä kuituja, mikä on merkityksellistä paperin valmistuksen kannalta. Siirtogeeniset versot juurtuivat kontrolleja huomattavasti nopeammin, mutta myöhemmin niiden juuret eivät eronneet kontrollitaimien juurista. Aineistoa on toistaiseksi tutkittu vain kasvukammio-olosuhteissa.

Ruotsissa on tutkittu myös hybridihaavan kasvuajan pidentämistä lisäkasvun saavuttamiseksi. Puiden kasvun loppuminen on yhteydessä päivän pituuden lyhenemiseen. Puissa on valoa absorboivia aineita, ns. fotoreseptoreja, joista yksi on fytochromi A. Tutkimuksessa hybridihaapaan siirrettiin kauran fytochromi A-geeni, jonka vaikutuksesta osa siirtogeenisistä klooneista tuli kasvussaan riippumattomaksi päivänpituudesta. Nämä kloonit kasvoivat kontrolleja huomattavasti nopeammin, mutta jatkoivat kasvuaan päivän lyhenemisestä huolimatta, eikä niihin kehitynyt myöskään kylmänkestävyyttä. Tutkimus osoitti, että puiden kasvuaikaa voidaan säädellä vain yhden geenin toimintaa muuttamalla, vaikkakaan tulokset eivät sellaisinaan osoittautuneet käytännön sovelluksiin sopiviksi.

Puuraaka-aineen laatu

Tuotetun puuaineen laatu koostuu monenlaisista ominaisuuksista, joiden merkitys riippuu puun käyttötarkoituksesta. Selluloosan ja paperin valmistuksen kannalta olennaisia asioita ovat puun kemiallinen koostumus, erityisesti sen ligniinin määrä ja laatu, sekä kuitujen pituus. Rakennuspuun ja sahatavaran tapauksessa puolestaan rungon muoto, oksaisuus ja lahonkestävyys ovat tärkeitä ominaisuuksia.

Ligniinin biosynteesin tutkimus ja sen muokkaaminen haluttuun suuntaan on kestävyysominaisuuksien ohella se tutkimusaihe, jossa geenimuuntelua on puilla eniten sovellettu. Ligniini on selluloosan jälkeen yleisin orgaaninen yhdiste, kemialliselta koostumukseltaan alkoholien polymeeri, jonka päätehtävä on vahvistaa soluseiniä. Ligniinin biosynteesireitti tunnetaan melko hyvin, ja suuri osa siihen vaikuttavista geeneistä on eristetty useista puulajeista (mm. *Eucalyptus* spp., *Picea abies*, *Pinus banksiana*, *P. radiata*, *P. taeda*, *Populus* spp.). Puulajien ligniinipitoisuus vaihtelee 15–36 %, minkä lisäksi lehtipuiden ligniini on kemiallisen rakenteensa vuoksi helpommin hajotettavissa kuin havupuuligniini.

Luonnosta on löytynyt mutanteja, joiden ligniini poikkeaa lajille tyypillisestä hyvinkin paljon. Loblollymännystä (*P. taeda*) löytyi Yhdysvalloissa joidenkin vuosia sitten muiden tutkimusten yhteydessä yksilö, jossa erään ligniinisynteesin avainentsyymiä (CAD) tuottava geeni oli muuntunut. Homotsygotisissa mutanttimännnyissä tämän entsyymien toiminnasta on jäljellä vain 1 %, ja puu on väriltään ruskeaa normaalin vaalean sijasta. Mutanttimännnyissä ligniiniä on noin 10 % normaalia vähemmän ja se on kemialliselta koostumukseltaan täysin erilaista kuin tavanomainen ligniini, mikä ei kuitenkaan ole vaikuttanut puiden kasvuun. Tämä osoittaa että ligniinisynteesi on joustava, ja kemiallisesti hyvinkin erilainen ligniini voi täyttää kasvin kannalta hyvin tehtävänsä.

Merkittäviä metsäpuiden ligniinin geenitekniiseen muokkaukseen keskittyneitä tutkimusryhmiä on mm. Belgiassa, Ranskassa ja Yhdysvalloissa. Myös Suomessa on ligniinitutkimukseen paneutunut konsortio, johon kuuluu tutkimusryhmiä Helsingin yliopistosta ja Metsäntutkimuslaitoksesta. Tutkimus-

konsortion tavoitteena on ymmärtää puuvartisten kasvien ligniinin biosynteesi entsyymaattisella ja molekyyllitasolla sekä kehittää työkaluja ligniinin laadun ja määrän hallitsemiseksi geeninsiirtoon perustuvassa jalostuksessa.

Populus tremula × *P. alba* ja *P. tremuloides* -lajeilla ulkomailla tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että niin ligniinin määrän kuin kemiallisen koostumuksen muuttaminen geenitekniisesti on mahdollista. Keskeisempiä tutkimustuloksia biosynteesireitin entsyymien toiminnasta ovat seuraavat: CAD-geenin osittainen hiljentäminen poppelissa vähensi ligniinin määrää ja teki siitä helpommin hajotettavaa, mutta muutti puun värin punaruskeaksi. COMT-geenin osittainen hiljentäminen värjäsi puuaineen punertavaksi ja muutti ligniinin kemiallista koostumusta vaikeammin hajotettavaksi, kun taas saman geenin lähes täydellinen hiljentäminen vähensi ligniiniä 17 % lisäten samalla selluloosan saantoa 10 %. COMT-hiljennettyjen puiden ligniini oli kuitenkin kemiallisesti vaikeammin hajotettavaa kuin kontrollipuissa. Sekä CAD- että COMT-geenien suhteen muunnetut poppelit kasvoivat normaalisti. Poppelin CCoAMT-geenin osittainen hiljentäminen vähensi ligniinin määrää 40 % ja aiheutti vaalean oranssin värin, muttei vaikuttanut kasvuun. F5H-geenin yliekspressio poppelissa puolestaan muutti ligniinin kemiallista koostumusta helpommin hajotettavaan suuntaan. Lupaavimmat tulokset on kuitenkin saavutettu amerikkalaisella haavalla (*P. tremuloides*), jossa 4CL-geenin osittainen hiljentäminen vähensi ligniinin määrää 45 % ja lisäsi samalla selluloosan määrää 15 %. Siirtogeeniset linjat kasvoivat kontrolloilla paremmin, eikä niiden morfologiassa tai anatomiasa ollut eroja kontrolleihin.

Siirtogeenisistä havupuista liittyen ligniinitutkimukseen on toistaiseksi ilmestynyt vain yksi raportti: Ruotsissa on käytetty geenitekniikkaa kuusen oman peroksidaasigeenin (*spi 2*) toiminnan lisäämiseen. Tämän *spi 2*-geenin yliekspressio lisäsi kuusentaimien stressinherkkyttä ja vähensi niiden kasvua. Taimien ligniinipitoisuus ei muuttunut, mutta tutkimuksessa saatiin viitteitä ligniinin kemiallisen koostumuksen muutoksista.

Suomessa siirtogeenisiä, ligniiniltään muunnettuja koivuja on toistaiseksi tuotettu Metlassa, mutta myös Helsingin yliopistossa ollaan aloittamassa siirtogeenisten koivujen (ja mahdollisesti hybridihaa-



Kuva 2. Geenimuuntelu on erinomainen perustutkimuksen työväline. Kuvan siirtogeeninen, kasvutavaltaan pensasmainen koivu on osa tutkimusta, jossa selvitetään kasvuhormonien merkitystä puiden kasvun ja puuaineen ominaisuuksien määrätymisessä.

pojen) tuottamista. Metlassa on yhteistyönä Michiganin ligniiniryhmän kanssa siirretty rauduskoivuun COMT-geeni, joka on peräisin amerikkalaisesta haavasta (*P. tremuloides*), sekä samaisen geenin säätelyalue reportterigeeniin yhdistettynä. Työn alla on myös 4CL-geenin suhteen siirtogeenisten koivulinjojen tuottaminen. COMT-geenistä saadut tulokset ovat olleet *Populus*-lajeihin verrattavia: ligniinin määrä siirtogeenisissä koivuissa pysyi suunnilleen ennallaan, mutta sen kemiallinen koostumus muuttui. Toisin kuin poppeleilla, koivun puuaineen väri ei muuttunut. Suurin osa siirtogeenisistä linjoista myös kasvoi normaalisti. COMT-geenin säätelyalueen on havaittu ohjaavan geenitoiminnan erityisesti nilaan ja kehittyvään ksyleemiin, mutta linjasta riippuen jonkin verran aktiivisuutta on myös muissa, esim. lehden solukoissa. Mahdollisten käytännön sovel-

lusten kannalta olisi tärkeää löytää säätelyalue, joka ohjaisi ligniinisynteesin muutokset tapahtumaan vain muodostuvassa puussa. Ne eivät saisi vaikuttaa esimerkiksi kasvin puolustusreaktioihin, joissa solunseinien vahvistaminen ligniinillä on merkityksellistä.

Puuaineen lahonkestävyyteen vaikuttaa sydänpuun määrä ja sen biokemiallinen laatu. Parhaiten lahoa kestävät trooppiset puulajit, mutta lauhkean vyöhykkeen puista vain tammea ja *Robinia pseudoacacia*-lajia pidetään suhteellisen kestävinä. Perinteisen valintajalostuksen keinoin pystyttäneen lisäämään sydänpuun määrää ainakin mäntylajeilla, mutta myös geenitekniikan hyödyntämistä on ehdotettu. Sydänpuussa esiintyvistä yhdisteistä stilbeenin, flavonoidien ja terpeenien valmistukseen liittyviä geenejä on eristetty useista metsäpuista (*Pinus sylvestris*, *P. strobus*, *Juglans* spp., *Abies grandis*), ja ainakin flavonoidien synteesiä on tutkittu geenimuuntelun avulla *Juglans*-hybrideissä. Helsingin yliopistossa on paraikaa meneillään hanke ”Koivun ja haavan taudinkestävyyden ja puun lahonkestävyyden parantaminen geenitekniikan avulla”, jossa tarkoituksena on siirtää männystä ja viinirypäleestä peräisin olevia geenejä koivuun ja haapaan, jotta lajit alkaisivat tuottaa sienitautien ja puuaineen lahonkestävyyttä parantavia stilbeenejä. Tutkimuksessa on tuotettu molemmista puulajeista siirtogeenisiä linjoja, joiden ominaisuuksia ollaan analysoimassa.

Geenimuuntelua ei ole vielä sovellettu myöskään puiden rungon muodon ja latvuksen rakenteen säätelyyn. Agrobakteerin *rol*-geenien tiedetään aiheuttavan mm. poppelissa ja koivussa apikaalidominanssin häviämistä ja pensastavaa kasvutapaa, joka ei ole metsänjalostuksen kannalta toivottu ominaisuus. Toisaalta sekä männystä että kuusesta tunnetaan yksittäisen geenin aiheuttamia luonnonmutanteja, joilla on jalostuksen näkökulmasta edullinen rungon muoto ja latvuksen rakenne. Kuusesta kyseinen *pendula*-geeni on kartoitettu Yhdysvalloissa, ja sen eristäminen on suunnitteilla, joten tulevaisuudessa myös näiden geenien toiminnan ja säätelyn geenitekniinen tutkimus lienee mahdollista.

Kestävyysominaisuudet

Puiden eri kestävysominaisuuksien parantamista geeniteknikan keinoin on tutkittu melko paljon. Herbisidikestävyys oli, kuten ruohovartisillakin kasveilla, ensimmäinen geeniteknikalla metsäpuuhun (poppeliin) siirretty ominaisuus. Geenimuuntelun soveltamista puiden kestävyuden lisäämiseksi hyönteisiä sekä sieni- ja virustauteja vastaan on myös tutkittu useilla lajeilla. Muita stressitekijöitä, joiden sietokykyä geeniteknikan menetelmin voitaisiin koettaa parantaa, ovat kylmyys, kuivuus, suolaisuus, raskasmetallit ja ilmansaasteet.

Herbisidinkestävyuden siirtämistä eri puulajeihin voidaan perustella sillä, että se mahdollistaisi rikkakasvien ja muun kilpailevan kasvillisuuden kontrolloinnin taimitarhoilla ja metsäviljelmillä niiden perustamisvaiheessa. Poppeliin on mm. Ranskassa, Belgiassa ja Yhdysvalloissa siirretty onnistuneesti ainakin bakteeriperäiset glyfosaatin- ja fosfinotrisiinin- (esim. Basta®, Buster®) kestävyuden geenit ja lituruohosta peräisin oleva sulfonylurean-kestävyyden geeni. Havupuista Euroopan lehtikuusella on tuotettu Yhdysvalloissa glyfosaattia sietäviä taimia, ja kuusella (*P. abies*) puolestaan sekä Ruotsissa että Uudessa-Seelannissa fosfinotrisiiniä kestäviä kloonveja. Herbisidinkestävien puiden on raportoitu olevan kasvultaan ja ilmasultaan normaaleja – vain lehtikuusella on havaittu kasvun hidastumista verrattuna ruiskuttamattomiin kontroleihin.

Hyönteiset aiheuttavat monilla puulajeilla huomattavia vahinkoja. Puiden hyönteiskestävyyttä mm. kovakuoriaisia ja perhostoukkia vastaan on saatu lisäyksi useilla lajeilla siirtämällä niihin bakteeriperäinen *Bt*-endotoksiinigeeni, joka tuottaa tietyille hyönteislajeille myrkyllistä valkuaisainetta. Parantunut hyönteiskestävyys näkyi *Populus*-lajeilla, euroopanlehtikuusella ja valkokuusella hyönteistoukkien aiheuttamien syöntivaurioiden vähene-
misenä. Lisäksi *Bt*-endotoksiinia tuottavien poppe-
lin, pähkinän (*Juglans regia*) ja valkokuusen syömi-
sen on raportoitu lisänneen toukkien kuolleisuutta. Hyönteiskestävyyttä on edellä mainituissa töissä yleensä tutkittu *in vitro*-olosuhteissa, mutta joissakin tapauksissa (hybridipoppelilla Yhdysvalloissa) myös kenttäkokeessa. Poppelilla (*P. nigra*) on myös tehty Kiinassa tutkimus, jossa siirtogeenisiä kloonveja kasvatettiin kentällä 2–3 vuotta, ja sen jälkeen

valittiin tutkimuskohteiksi kasvuominaisuuksiltaan ja hyönteiskestävyydeltään parhaiksi osoittautuneet kloonit (70–100 % kuolleisuus tutkituilla hyönteislajeilla). Nämä kloonit ovat nyt laajamittaisissa kenttäkokeissa kuudessa eri provinssissa Kiinassa.

Bt-endotoksiinigeenin lisäksi *Populus*-lajien hyönteiskestävyyttä on yritetty parantaa mm. Ranskassa, Italiassa ja Yhdysvalloissa siirtämällä niihin erilaisia, mm. riisistä, perunasta ja soijapavusta peräisin olevia proteinaasi-inhibiittorigenejä. Kokemukset näiden siirtogeenien vaikutuksista vaihtelevat: riisin geeni lisäsi hybridihaavan kovakuoriaiskestävyyttä, kun taas poppeliin siirretty soijapavun geeni ei vaikuttanut perhostoukkien syöntikäyttäytymiseen tai kuolleisuuteen. Mielenkiintoinen on myös *Liquidambar styraciflua*-lajilla saatu tulos: tupakan peroksidaasigeenin siirtäminen lajiin lisäsi sen yleistä perhostoukkien ja kovakuoriaisten kestävyyttä, mutta teki siitä samalla alttiimman maissiyökköselle, mihin saattoi olla syynä peroksidaasi-aktiivisuuden terpenoideja ja muita fenoliyhdisteitä neutraloiva vaikutus.

Geenimuuntelua on hyödynnetty myös puiden virus-, bakteeri- ja sienitautikestävyuden lisäämiseksi. Luumulla (*Prunus domestica*) on Puolassa, Romaniassa ja Espanjassa tehdyissä kenttäkokeissa osoitettu, että PPV-viruksen kuoriproteiinia tuottavat siirtogeeniset kloonit eivät sairastu ko. virustautiin. Siirtogeenisten luumujen ympäristöriskien arviointi on meneillään, samoin kuin hedelmien allergia- ja toksisuusestetit. Kanadassa ja Yhdysvalloissa on tutkittu synteettisiä ja luonnon valkuaisaineita, joilla *in vitro* -kokeissa on mikrobeja tappava vaikutus. Tällaista antimikrobista valkuaisainetta tuottavan geenin siirtäminen poppeliin ei vaikuttanut sen sienitautikestävyuteen, mutta lisäsi kestävyyttä eräille bakteeritaudeille (*Agrobacterium*, *Xanthomonas*).

Myös vastustuskykyä sienitaudeille on onnistuttu parantamaan useilla puulajeilla: Yhdysvaltalaisen tutkimusten mukaan *Trichoderma*-sienen endokitinaasigeeni teki siirtogeenisistä omenalinjoista omenaruven- (*Venturia inaequalis*) kestäviä, mutta heikensi samalla puiden kasvua. Vehnästä peräisin oleva oksalaattioksidaasigeeni puolestaan paransi hybridipoppelin kestävyyttä *Septoria*-sientä vastaan vaikuttamatta kuitenkaan taimien kasvuun tai ulko-
muotoon. Englannissa on tuotettu siirtogeenisiä ja-

lavia, joiden toivotaan olevan kestäviä sienien aiheuttamaa hollanninjalavatautia vastaan. Havupuistakin on yksi raportti geenitekniikan keinoin tuotetusta sienitautikestävyydestä: Ruotsissa on lisätty kuusen oman *spi 1*-geenin toimintaa ja saatu siten parannetuksi taimien vastustuskykyä maannousemasientä (*Heterobasidion annosum*) vastaan. Siirtogeeniset taimet olivat myös ilmiänsultaan normaaleja, joskin joidenkin linjojen alkukasvu solukkoviljelyssä oli heikkoa.

Tautien- ja tuholaiskestävyyden lisäksi näyttäisi olevan mahdollista hyödyntää geenitekniikkaa myös ei-bioottisista ympäristökijöistä johtuvien stressien vähentämiseksi puilla. Geenimuuntelun avulla ainakin *Populus*-lajeja voidaan muokata sietämään paremmin ympäristön saasteita. Puihin voidaan siirtää esimerkiksi bakteeriperäisiä geenejä, jotka vaikuttavat suoraan niiden kykyyn ottaa ja hajottaa haitallisia yhdisteitä. Tällaisia ovat mm. kloorifenoleiden hajotusta ohjaavat geenit ja elohopean sietokykyyn vaikuttava geeni. Niiden kaikkien on osoitettu toimivan eri *Populus*-lajeissa mm. Yhdysvalloissa ja Ranskassa tehdyissä tutkimuksissa. Japanissa on puolestaan tuotettu *Populus*-hybridejä, jotka kestävät paremmin ilmansaasteita (esim. rikkidioksidia) siirtämällä puihin bakteeriperäinen glutationiinireduktaasigeeni. Lisäksi Espanjassa on siirretty *Citrus*-puihin hiivaperäinen geeni, jonka uskotaan parantavan puiden kykyä kasvaa suolaantuneessa maassa. Tuotetut taimet olivat ilmiänsultaan ja kasvultaan normaaleja, ja niiden suolansietokyvyn testaus on meneillään.

Myös Suomessa tutkitaan puiden kestävyysominaisuuksia geenimuuntelun avulla. Helsingin yliopistossa on paraikaa meneillään hanke ”Koivun ja haavan taudinkestävyyden ja puun lahonkestävyyden parantaminen geenitekniologian avulla”. Tutkimuksen pääasiallisena tarkoituksena on tutkia geeninsiirron toimivuutta ja mahdollisuuksia lisätä ennen kaikkea rauduskoivun tautikestävyyttä siirtogeenien avulla. Koivuihin on siirretty geenejä, joiden tuotteet ovat fungitoksisia ja joiden oletetaan lisäävän koivujen kestävyttä patogeenisia sieniä vastaan. Esim. kitinaasientsyymien oletetaan hajotavan koivussa korkeampien sienten soluseinän kiitiinikomponenttia hidastaen tai jopa estäen sienien tunkeutumisen. Stilbeenisyntaasigeenien oletetaan tuottavan koivussa pinosylviini-nimistä polyfenolia,

joka on voimakkaasti toksinen etenkin lahottajasiemille.

Helsingin yliopistossa tutkitaan myös kasvien abioottisten stressien sietokykyä käyttäen mallikasveina mm. lituruohoa ja koivua ja yhtenä menetelmänä geenimuuntelua. Tutkimushankkeen tavoitteina on 1) kylmän- ja kuivuudenkestävyyteen johtavien signaalinvälitysreittien karakterisointi, 2) stressi-indusoituneiden geenien tuottamien proteiinien ja muiden suoja-aineiden toiminnan selvittäminen kylmän- ja kuivuudenkestävyyden kehittämisessä, ja 3) koivun EST-geenikartoituksella löydettyjen kasvunloppumiseen ja talvikaraistumiseen liittyvien geenien toiminnan selvittäminen. Tulevaisuuden tavoitteena on tarjota molekyyli-markkereita jalostuksen käyttöön ja/tai lisätä puiden kestävyttä geenitekniikan avulla.

Ympäristönhoito / saastuneiden maamassojen puhdistus

Ympäristön saastuminen on vakava ongelma monilla alueilla – maaperään sekä pohja- ja pintavesiin kertyy yhä enemmän mm. lannoitteista peräisin olevia nitraatteja, torjunta-aineita, raskasmetalleja, trikloorietyleeniä ja halogenoituja fenoleja. Yhtenä mahdollisuutena saastuneiden maamassojen ja pohjaveden puhdistamiseen on esitetty puiden, lähinnä nopeakasvuisten ja helposti lisäävien *Populus*-lajien viljelyä saastuneilla alueilla. Puiden etuna mm. muihin kasveihin nähden pidetään viljelmien suhteellisen edullisia perustamiskustannuksia, pitkäikäisyyttä, sekä erityisesti suurta biomassaa ja sen mahdollistamaa suurta (saastuneen) vedenkäsittelykapasiteettia. Monet puut sietävät myös luonnostaan jonkin verran esim. raskasmetalleja tai herbisidejä.

Geenitekniikkaa voitaisiin hyödyntää puiden muokkaamisessa saastuneiden alueiden puhdistustarkoituksiin paremmin soveltuviksi. Yksi mahdollisuus on lisätä puiden juuriston kokoa ja sen myötä veden ja haitallisten yhdisteiden ottokykyä. Suuri juuristo myös ylläpitää laajempaa mikro-organismien, kuten bakteerien ja sienten, yhteisöä maassa. Kanadassa ja Koreassa tehdyissä tutkimuksissa eri *Populus*-lajien ja -hybridien juurten kasvua on saatu stimuloiduksi agrobakteerien (*A. rhizogenes*) avulla. Toisaalta puihin voidaan myös siirtää esimerkiksi

bakteeriperäisiä geenejä, jotka vaikuttavat suoraan puiden kykyyn ottaa ja hajottaa haitallisia yhdisteitä. Tällaisia ovat mm. herbisidinkestävyysgeenit, kloorifenoleita hajottavat geenit ja elohopean sietokykyyn vaikuttava geeni, joiden on kaikkien osoitettu toimivan eri *Populus*-lajeissa mm. Yhdysvalloissa ja Ranskassa tehdyissä tutkimuksissa.

Uudet puupohjaiset tuotteet

Elintarvike- ja lääketieteellisyydessä on paraikaa meneillään voimakas tutkimus- ja kehitystyö aina uusien ihmisen terveyttä ja hyvinvointia edistävien molekyylien löytämiseksi. Funktionaalisten elintarvikkeiden valmistuksessa käytetään paljon kasviraaka-aineita, osin myös metsäpuista peräisin olevia, kuten kolesterolin vähentämiseksi suositeltu, havupuista saatava kasvistanoli. Hyödyllisiä molekyyliä ja uutuustuotteita, joita on ehdotettu tuotettaviksi puissa geenitekniikkaa soveltamalla ovat mm. albumiini, syötävät rokotteet, biohajoavat muovit (*Pinus*-, *Populus*-lajeissa) sekä poltto- ja voiteluaineet (*Elaeis* spp.).

Toistaiseksi kuitenkin ainoa esimerkki siirtogeenitekniikan soveltamisesta elintarvike- tai lääkemolekyylien tuottamiseksi metsäpuussa on marjakuusella Yhdysvalloissa tehty tutkimus. Siinä kahdesta *Taxus*-lajista tuotettiin agrobakteerin avulla solukkoviljelmää, jotka kasvoivat ilman kasvihormoneja ja tuottivat syöpälääkkeenä käytettävää taksolia. Tulevaisuuden sovellusmahdollisuuksina tutkimuksessa nähtiin solukkoviljelmien muuntaminen bioreaktoreiksi ja taksolin tuotannon lisääminen sen säätelyä geeniteknisesti muokkaamalla.

Kasvifysiologinen perustutkimus

Kasvifysiologisessa perustutkimuksessa geenimuuntelua hyödynnetään laajalti yksittäisten geenien toiminnan ja sen säätelyn selvittämisessä, myös puuvartisilla kasveilla. Perustutkimuksella ei luonteensa mukaisesti ole suoria käytännön sovelluksia, vaikka sitä kautta kertynyt tieto voi niitä aikanaan tuottaakin. Tässä osiossa on lyhyesti selvitetty Suomessa metsäpuilla viime vuosina tehtyjä tai paraikaa meneillään olevia perustutkimuksen luonteisia

hankkeita, joissa on tuotettu siirtogeenisiä puita.

Helsingin ja Turun yliopistoissa on meneillään yhteistyönä tehtävä tutkimus, jolla selvitetään etyleenin merkitystä monivuotisen puun kasvussa ja kehityksessä. Siinä koivuun on siirretty lituruohosta etyleenireseptori-mutantogeneeni, joka tekee koivun insensitiiviseksi etyleenille. Työssä tarkastellaan useita eri aspekteja, mm. etyleenin merkitystä päätesilmun muodostumisessa syksyllä (dormanssi), etyleenin vaikutusta kylmäkestävyyden kehittymiseen, kukintaan, mykoritsan muodostumiseen (yhteistyö Göttingenin yliopiston kanssa), sekä puunmuodostukseen ja lignifikaatioon. Tarkoituksena on keskittyä erityisesti etyleenin rooliin niissä prosesseissa, jotka ovat tyypillisiä monivuotisille puille, joita ei siksi voida lainkaan tutkia ruohovartisissa kasveissa. Lisäksi useissa muokatuissa koivukloneissa on etyleenin biosynteesin geenejä joko oikein- tai nurinpäin siirrettyinä. Näitä koivuja käytetään etyleenin biosynteesin modifointiin siten, että kasvit eivät tuota, tai ylituottavat etyleeniä. Tutkimuksen päätarkoitus on etyleenin biosynteesin merkityksen selvittäminen stressivasteissa.

Helsingin, Joensuun, Oulun ja Turun yliopistojen ja Metsäntutkimuslaitoksen yhteisenä hankkeena on meneillään tutkimus ”Rauduskoivun hiili- ja typpimetabolian avainentsyymien määrän geneettisen muuntelun vaikutukset fysiologian ja molekyylibiologian tasolla”. Hiilen ja typen aineenvaihduntareitit ovat läheisesti sidoksissa toisiinsa ja näiden reittien toiminta muodostaa kasvien kasvun ja tuotavuuden perustan. Tutkimus on perustutkimusta, joka antaa uutta tietoa rauduskoivun hiili- ja typpiaineenvaihdunnasta ekologisella, molekylaarisella ja fysiologisella tasolla. Tarkoituksena on selvittää, miten puun perusaineenvaihdunnan muuttuminen vaikuttaa selviytymiseen vaihtelevissa olosuhteissa. Ilmastomuutoksen tuoma ilmakehän hiilidioksidipitoisuuden kohoaminen aiheuttaa muutoksia myös kasvien aineenvaihduntaan. Koska suurin osa kasvin typen tarpeesta menee hiilen sitomisesta vastaavan Rubisco-entsyymin tuottamiseen, ravinteiden, erityisesti typen saanti vaikuttaa myös kasvin selviytymiseen. Työssä on siirtogeeninä käytetty rauduskoivun oman Rubisco (ribuloosibisfosfaattikarboksylaasi/oksygenaasi) -entsyymin pientä alayksikköä ja pinaatin (*Spinacia oleracea*) nitraattireduktaasigeeniä. Siirtogeenisten koivulinjojen tar-

kempi tutkimus on meneillään sekä kasvihuone- että kenttäkokeessa.

Metsäntutkimuslaitoksessa on tutkittu kasvihormonivaikutuksia, erityisesti auksiiniin (IAA) merkitystä koivun kasvuun ja puuaineen ominaisuuksien määräytymisessä käyttämällä agrobakteerin *aux*- ja *rol*-geenejä. IAA:n uskotaan olevan tärkein solunjakautumisen säätelijä varren jällessä ja muodostuvassa puussa. Se vaikuttaisi siten puun tiheyden komponentteihin, eli yksittäisten puusolujen rakenteeseen, eri solutyypin osuuteen ja jakaumaan, sekä eri puutyypin (kevätpuu, kesäpuu, reaktiopuu jne) syntyyn. Siirtogeeneistä *rol*-geenit herkistävät solut kasvin omille hormoneille ja *aux*-geenit ohjaavat suoraan auksiinisynteesiä. Tutkimuksessa *aux*- ja *rol*-geenejä on siirretty rauduskoivuun erilaisina yhdistelminä, ja tutkittu tuotettujen taimien morfologisia ominaisuuksia, kasvua sekä puuaineen fyysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia.

Metsäntutkimuslaitoksessa on yhteistyössä sveitsiläisten kanssa selvitetty myös hemoglobiinin merkitystä puiden hapenkäytön tehokkuudessa ja sen yhteyttä kasvuun käyttäen mallikasvina hybridihaapaa. Kasveilla on hemoglobiineja, joista osa liittyy symbionttisten, tyyppä sitovien juurinystyräbakteerien hapensaantiin, ja osa toimii vähähappisissa oloissa parantaen solujen energiatasetta. Bakteeriperäisen hemoglobiini-geenin (VHb) tiedetään puolestaan sekä bakteereissa että aiotumallisissa soluissa nostavan solunsisäistä happitasoa ja edelleen lisäävän solujen ATP-energiavarantoja, mikä vaikuttaa kasvuun. Tupakasta on tuotettu VHb:n suhteen siirtogeenejä klooneja, joissa on havaittu kasvun paranemista ja/tai sekundääriaineiden tuotannon muutoksia. Metlan tutkimuksessa VHb-geeni on siirretty hybridihaapaan, ja tuotetuista taimista on tutkittu niiden kasvua, anatomiaa, sekundääriaineiden tuotantoa ja reagoitua UVB-valoaltistukselle. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää ruohovartisilla kasveilla tehtyjen havaintojen pätevyyttä monivuotisilla, puuvartisilla kasveilla.

Kenttäkokeet siirtogeeneillä puilla

Siirtogeeneillä aineistolla (kasvit, bakteerit, virukset, sienet ja eläimet) on OECD:n tilastojen mukaan perustettu jäsenmaihin vuosina 1986–2000 yh-

teensä 10313 kenttakoetta. Suurin osa (98,4 %) näistä kenttäkokeista on tehty kasveilla. Puilla tehtyjä kenttäkokeita on kuitenkin hyvin vähän. Eniten kenttäkokeita on perustettu eri *Populus*-lajeilla, yhteensä 56 kpl (0,54 % kaikista kokeista). Myös eri hedelmäpuulajeilla (omena, greippi, papaija, päärynä, persikka, luumu, pähkinä) on tehty yhteensä suunnilleen saman verran kenttäkokeita kuin eri *Populus*-lajeilla. Euroopan Unionin alueella siirtogeeneiden aineistojen kenttäkokeita (tai tarkkaan ottaen ilmoituksia siirtogeeneisen materiaalin viemisestä luontoon) on vuoden 2001 tilastojen mukaan yhteensä 1668 kpl, joista hedelmä- ja metsäpuilla 32 kpl. Luettelo EU-alueella siirtogeeneillä puilla tehdyistä kenttäkokeista on Taulukkona 1.

Siirtogeeneillä kasveilla tehtävää tutkimusta ja kenttäkokeita säätelee Suomessa geenitekniikkalaki ja -asetus. Valvonta perustuu ennakoilmoitusjärjestelmään ja jälkivalvontaan tarkastuksineen. Kaikkien siirtogeeneillä kasvimateriaalilla työskentelevien toiminnanharjoittajien tulee tehdä ilmoitus geeniteknisesti muunnettujen kasvien suljetusta käytöstä, jossa kuvataan tarkasti suunniteltu toiminta, sekä riskinarviointi toimintaan liittyen. Kenttäkokeen tekemiseksi on lisäksi tehtävä tutkimus- ja kehittämissuunnitelma, joka geenitekniikan lautakunnan tulee hyväksyä ennen kokeen aloittamista. Arvioidessaan tutkimus- ja kehittämissuunnitelmaa geenitekniikan lautakunta käyttää apunaan sekä tutkimuksen että ympäristöasiantuntijoiden ilmoituksista antamia lausuntoja. Tutkimus- ja kehittämissuunnitelmat ovat laajoja ja seikkaperäisiä, ja niihin sisältyy monipuolinen riskinarviointi. Niissä selvitetään mm. tiedot toiminnanharjoittajasta, kokeen johtajasta ja muusta henkilökunnasta pätevyyksineen, vastaanottajakasvista, geenitekniikalla muuntamisesta, geenitekniikalla muunnetusta kasvista, koalueesta, kokeesta, mahdollisista ympäristövaikutuksista, sekä kokeen seurannasta, valvonnasta, kokeen jälkeisistä toimenpiteistä ja jätehuollosta.

Julkaistuja tutkimusraportteja siirtogeeneillä puilla tehdyistä kenttäkokeista on vielä vähän, osaksi johtuen siitä, että suurin osa kokeista on perustettu aivan viime vuosien aikana. Yhdysvalloissa, Ranskassa ja Saksassa tehdyistä *Populus*-kokeista on kuitenkin ilmestynyt muutamia raportteja, joissa on pääasiassa tarkasteltu siirtogeeneiden toimintaa ja ympäristöolojen vaikutusta siihen. Siirtogeeneiden ilmene-

Taulukko I. Euroopan Unionin alueella 23.4.2001 mennessä tehdyt ilmoitukset siirtogeenisillä puilla tehtävistä kenttäkokeista. Saman toiminnanharjoittajan samaa lajia ja samaa siirtogeeniä koskevat useammat ilmoitukset on yhdistetty yhdelle riville.

Valtio ja toiminnanharjoittaja	Puulaji	Siirtogeeni / muunnettu ominaisuus
SUOMI Metsäntutkimuslaitos Metsäntutkimuslaitos Helsingin yliopisto, MMTdk	raudusk., kuusi, mänty rauduskoivu rauduskoivu	markkerigeenit / geeninsiirtomenetelmän kehitystyö nitraattireduktaasi, Rubisco / hiili- ja typpiainevaihdunta glukanaasisynteesi / hyönteiskestävyys; kitinaasisynteesi / sienitautien kestävyys
RUOTSI SLU, Dept. of Horticulture	omena	<i>rol</i> -geenit /juurtumiskyvyn parantaminen
ALANKOMAAT CPRO-DLO	omena	hordotioniini /sienitautien vastustuskyky
ENGLANTI Shell Research Ltd University of Derby Zeneca Ltd Zeneca Ltd	eukalyptus paratiisiomena poppeli poppeli (<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>)	markkerigeenit / siirtogeenien stabiilisuuden selvittäminen markkerigeenit COMT, CCR / ligniin biosynteesi COMT, CCR / ligniin biosynteesi
SAKSA Federal Research Centre for Forestry and Forest Products Federal Research Centre for Forestry and Forest Products	haapa haapa	glufosinaatin kestävyys / siirtogeenien leviämisen arviointi glyfosaatin kestävyys, <i>rol</i> -geenit
RANSKA Station d'Amélioration des Arbres Forestiers Afofel Station de Zoologie Forestiere et Station d'Amélioration des Arbres Forestiers Station d'Amélioration des Arbres Forestiers Institut National de la Recherche Agronomique Centre de Recherche d'Orleans Unite Amélioration, Genetique et Physiologie Forestiere Institut National de la Recherche Agronomique Centre de Recherche d'Orleans Unite Amélioration, Genetique et Physiologie Forestiere	poppeli (<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>) poppeli poppeli poppeli (<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>) poppeli (<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>) poppeli (<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>)	CCR / ligniin biosynteesi glufosinaatin kestävyys Bt-endotoksiinigeeni / hyönteiskestävyys; koirassteriliteetti ja sen palauttaminen CCR / ligniin biosynteesi; koirassteriliteetti ja sen palauttaminen COMT, CCR / ligniin biosynteesi siirtogeenien toiminnan testaaminen, siirtogeenien stabiilisuuden seuraaminen
ITALIA Universita degli Studi della Tuscia Dipartimento di Produzione Vegetale sez. Ortofloarboricoltura Universita degli Studi della Tuscia Dipartimento di Produzione Vegetale sez. Ortofloarboricoltura Universita degli Studi della Tuscia Dipartimento di Produzione Vegetale sez. Ortofloarboricoltura	oliivi oliivi kirsikka	<i>rol</i> -geenit osmottiinisynteesi, PR-proteiinien synteesi <i>rol</i> -geenit
ESPANJA Advanced Technologies (Cambr.) Ltd Celulosas de Asturias SA Espana Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias Universidad de Malaga Instituto Andaluz de Biotecnologia Laboratorio de Bioquimica y Biologia Molecular, Facultad de Ciencias	eukalyptus luumu appelsiini poppeli (<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>)	markkerigeenit viruskestävyys markkerigeenit siirtogeenien stabiilisuuden seuranta; glutamiinisyntetaasi / kasvun parantaminen

minen riippuu luonnollisesti paljon säätelyalueesta, joka ohjaa sen toimintaa. Toistaiseksi tuloksia on julkaistu lähinnä CaMV 35S-säätelyalueen ohjaamista geeneistä. Puilla ollaan kuitenkin paraikaa tutkimassa myös muita, solukkospesifisiä säätelyalueita ja niiden toimintaa sekä *in vitro*- että kenttäoloissa. Yhdessä kenttäkoetyössä on selvitetty myös siirtogeenisten puiden interaktioita ympäröivän eliöstön, eli sienijuuria muodostavien sienten kanssa.

Ranskassa on seurattu 35S-GUS-reportterigeenin suhteen siirtogeenisiä poppelihybridejä (*P. tremula* × *P. alba*) kenttäkokeessa yli neljän vuoden ajan. Eri linjojen välillä havaittiin eroja siirtogeenin toiminnan määrässä, mutta linjojen sisällä ei esiintynyt vaihtelua eri yksilöiden välillä. GUS-aktiivisuuden määrällä ja siirtogeenin kopioiden lukumäärällä ei ollut yhteyttä toisiinsa. GUS-geenin toiminta kaikissa siirtogeenisissä linjoissa jatkui muuttumattomana vuodesta toiseen vaihdellen kuitenkin vuodenajan mukaan – kesällä siirtogeeni oli aktiivisempi kuin syksyllä, talvehtimaan valmistautuvissa puissa.

Myös Yhdysvalloissa tehdyissä kenttäkokeissa 35S-GUS-geeniä ilmentävillä hybridipoppeleilla (*P. alba* × *P. grandidentata*) havaittiin siirtogeenin toiminnan määrässä eroja linjojen välillä. Joissakin tapauksissa siirtogeeni lopetti toimintansa *in vitro*-kasvatuksen aikana, mutta tällaista geenin hiljentymistä ei havaittu enää taimien kentälle siirtämisen jälkeen. Siirrettäessä siirtogeenisiä taimia solukko-viljelyoloista kasvihuoneeseen ja edelleen kentälle havaittiin GUS-geenin toiminnan kuitenkin vähenevän ja erojen linjojen välillä jyrkkenevän. Samanlainen huomio on tehty myös *P. nigra* × *P. maxmiowiczii*-hybridillä ja valkokuusella. Reporterigeenin toiminnassa on myös havaittu vaihtelua riippuen esimerkiksi lehtien kehitystasesta: *P. alba* × *P. grandidentata*-linjoissa nuoret, kasvavat lehdet ilmensivät siirtogeeniä vanhoja lehtiä enemmän, kun taas *P. nigra* × *P. maxmiowiczii*-linjoissa tilanne oli päinvastainen. Yhteenvetona voidaan sanoa, että sekä ympäristöolot että kasvin ja solukon kehitystaso ja/tai fysiologinen tila voivat vaikuttaa siirtogeenien toimintaan.

Citrus-puista on ilmestynyt espanjalainen tutkimus, jossa markkerigeenejä (GUS, *npt*) ilmentäviä puita (70 kpl) seurattiin 4–5 vuoden ajan niiden luonnollisessa kasvatusympäristössä, kentällä olevassa varjostetussa tarhassa. Tulosten mukaan GUS-

geenin toiminta oli sitä heikompaa, mitä useampia kopioita siitä oli puuhun siirtynyt. Toisaalta siirtotyön geneettisen materiaalin (T-DNA) uudelleenjärjestäytyminen ei itsessään merkinnyt siirtogeenien huonoa toimintaa. Siirtogeenisten linjojen välillä oli eroja siirtogeenien toiminnan määrässä, mutta siirtogeenien toiminta sinällään pysyi samanlaisena koko tarkasteluajan.

Saksassa tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin 15 kk ajan siirtogeenisten hybridihaapakloonien ja sienijuuri(mykorritsa)sienten välisiä suhteita. Siirtogeeninä hybridihaavoissa oli agrobakteeriperäinen *rolC*-geeni joko jatkuvatoimisen CaMV 35S- tai valoindusoituvan *rbcS*-säätelyalueen ohjaamana. Kaikista hybridihaavoista, sekä siirtogeenisistä (8 kpl) että kontrolliklooneista (3 kpl), löydettiin ekto-mykorritsoja, kaikkiaan 15 eri tyyppiä. Eri sienityyppien esiintymisessä ei ollut eroja siirtogeenisten ja kontrollipuiden välillä. Ainoa havaittu eroavaisuus oli, että yhdestä 35S-*rolC*-linjasta erästä yleisimmistä neljästä sienityypistä löydettiin vain harvoin tai huonosti kehittyneenä. Tutkimuksessa arvioitiin, ettei yhden sienityypin heikommalla kehittymisellä yhteen siirtogeeniseen haapalinjaan ole haitallisia seurauksia puiden menestymiselle. Vain taimitarhaoloissa ja juuri istutetuilla metsäviljelmillä, joissa sienijuuria muodostavia sieniä voi olla vähän, saattaa yhdenkin sienityypin heikommasta kehittymisestä olla haittaa taimien selviytymiselle.

Suomalaisista siirtogeenisillä puilla tehdyistä kenttäkokeista ei ole vielä ilmestynyt tutkimusraportteja.

Helsingin, Joensuun, Oulun ja Turun yliopistojen ja Metsäntutkimuslaitoksen yhteisen perustutkimushankkeen ”Rauduskoivun hiili- ja typpimetabolian avainentsyymien määrän geneettisen muuntelun vaikutukset fysiologian ja molekyylibiologian tasolla” kenttäkoe on perustettu v. 2000 ja sille on geeniteknikan lautakunnan lupa vuoteen 2005. Työssä on siirtogeeninä käytetty rauduskoivun oman Rubisco- (ribuloosibisfosfaattikarboksylaasi/oksygenaasi) entsyymin pientä alayksikköä ja pinaatin (*Spinacia oleracea*) nitraattireduktaasigeeniä. Kenttäkokeessa on kahden eri kloonin siirtogeenisiä rauduskoivuja 5 eri linjaa sekä 2 kontrollilinjaa.

Metsäntutkimuslaitoksen muut koivun, kuusen ja männyn kenttäkokeiksi rekisteröidyt ilmoitukset koskevat siitepölyvälitteisen geeninsiirtomenetel-

män kehittämistä, jota laitoksella on tutkittu vuosina 1986–2002. Tutkimuksessa on tehty ulkona kasvavissa puissa kontrolloituja risteytyksiä eli pölytetty eristyspusseihin suljettuja emikukkia siitepölyllä, johon on siirretty GUS-reportterigeeni. Risteytyksiä on tehty ulkona, koska havupuiden käpyjen ja siemenen kehitys häiriintyy helposti kasvihuoneoloissa. Tuotetuista siemenistä on myöhemmin kasvatettu taimia kasvihuoneessa. Siitepölyvälitteisen geeninsiirron on osoitettu toimivan ainakin männyllä.

Helsingin yliopiston kenttäkokeessa, jossa tutkitaan kestävyysominaisuuksiltaan muunneltuja koivuja, on 1020 koivuntainta, joista 900 on geenimuunneltuja ja 120 näiden kontrolleja. Siirtogeeniset koivut sisältävät siirrettyjä geenejä, joiden oletetaan vähentävän hyönteistuhoja tai lisäävän sienitautikestävyyttä. Kenttäkoe on perustettu syksyllä 2000 ja sille on lupa vuoden 2004 syksyyn. Kenttäkokeella tutkitaan siirtogeenien ilmentymistä ja promootorien toimintaa luonnonoloissa. Lisäksi ke-

rätään tietoa ko. geeninsiirtojen vaikutuksesta koivujen kasvuun, tauti-, hyönteistuhon- ja pakkaskes- tävyyteen luonnonoloissa. Saatavat tiedot auttavat jatkossa geenimuunneltuihin metsäpuihin liittyvässä riskinarvioinnissa. Tutkimuksen tavoitteet ovat lähinnä perustutkimuksellisia, eivätkä käytännön sovellutukset vaikuta realistisilta tässä vaiheessa.

Kirjoitus perustuu Maa- ja metsätalousministeriölle kansallista bio- ja geenitekniikkastrategiaa varten tehtyyn taustaselvitykseen ”Metsäpuilla tehtävä bio- ja geenitek- ninen tutkimus ; maaliskuu 2002”. Strategian valmistuttua syksyllä 2002 selvitys tulee kokonaisuudessaan luettavaksi ministeriön verkkosivuille osoitteessa: www.mmm.fi.

■ MMT Tuija Aronen, Metla, Punkaharjun tutkimusasema.
Sähköposti tuija.aronen@metla.fi