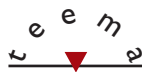


Tuija Aronen

Siitepölyvälitteinen geeninsiirto havupuilla



Havupuut geeninsiirtojen kohteena

Havupuiden geenitekkinen tutkimus on toistaiseksi ollut vähäistä verrattuna lehtipuihin ja ruohovartiisiin kasveihin, lähinnä toimivien geeninsiirtotekniikoiden puuttumisen takia. Useimmiten suurin ongelma ei ole niinkään siirrettävän DNA:n saaminen sisälle havupuiden soluihin tai sen liittyminen osaksi perimää, vaan kokonaisten taimien regenerointi tuotetuista siirtogeenisistä soluista tai soluikoista.

Geeninsiirtomenetelmän kehittämiseksi männyle (*Pinus sylvestris*) on tehty paljon tutkimustyötä mm. Suomessa. Kohdemateriaalina on käytetty solukkoviljelyaineistoa, sekä organogeneesin lähtömateriaalia eli itävän alkion sirkkalehtiä että kasvullisia alkioita tuottavia solulinjoja. Geeninsiirtotekniikoista on testattu sekä biolistista että agrobakteerimenetelmää ja tutkimuksen tuloksena on saatu tuotetuksi siirtogeenisiä solukoita. Taimien regenerointi näistä solulinjoista ei ole kuitenkaan onnistunut.

Onnistuneista geeninsiirroista muihin, kasvullisesti kotoista mäntyämme helpommin lisättäviin mäntylajeihin, on muutamia raportteja. Siirtogeenisiä taimia on saatu tuotetuksi Uudessa-Seelannissa radiatamännystä (*P. radiata*) käyttämällä kasvullisia alkioita tuottavia solukoita biolistisen geeninsiirron kohteena. Agrobakteerivälitteisellä tekniikalla geeninsiirrossa on onnistuttu Kanadassa valkomännyn (*P. strobus*) kasvullisia alkioita tuottavilla soluikoilla

ja Yhdysvalloissa loblollymännyn (*P. taeda*) organogeneettisillä solukkoviljelmillä Yhdysvalloissa.

Aivan viime vuosina geeninsiirto kuuseen (*Picea abies*) on onnistunut useissa laboratorioissa eri puolilla maailmaa (Ruotsi, Uusi-Seelanti, Yhdysvallat) sekä biolistisella että agrobakteerivälitteisellä menetelmällä. Kaikissa tapauksissa kohdemateriaalina on käytetty kasvullisia alkioita tuottavia solukoita, joista hyvin suuri osa (esim. 16 % biolistisella menetelmällä) on tuottanut siirtogeenisiä linjoja. Taimien

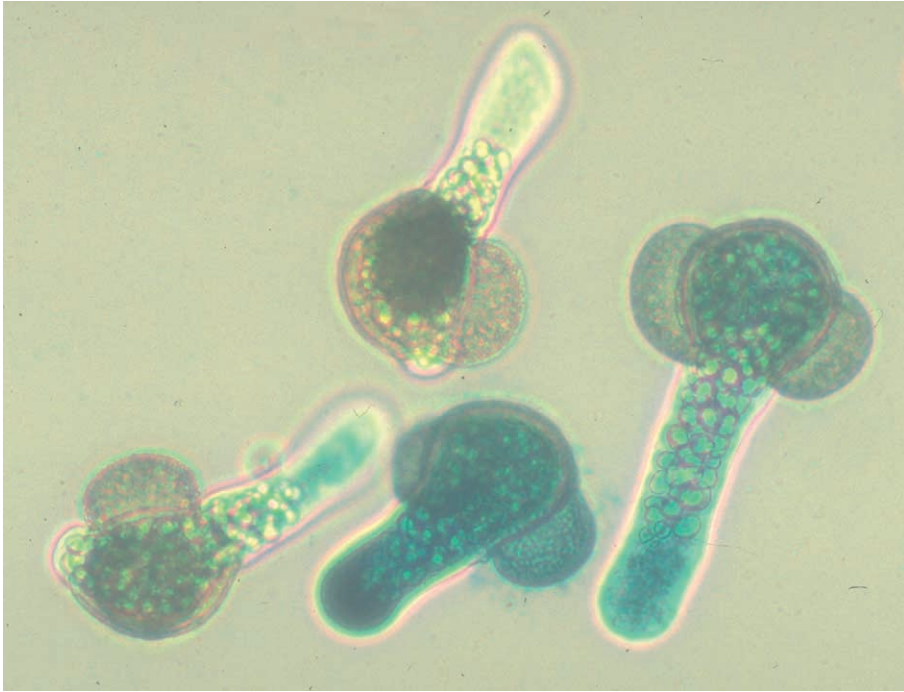
Termien selityksiä

Organogeneesi: Solukkoviljelytekniikka, jossa kasvisolukosta hormonikäsittelyjen avulla erilaistetaan ensin versoja, jotka sitten yksitellen juurrutetaan.

Biolistinen geeninsiirto: Tekniikka, jossa siirrettävät geenit ammutaan kohdesoluihin kultahiukkasten pinnalle kiinnitettyinä. Kultahiukkasten kiihdyttämiseen käytetään esim. kaasunpurkausta.

Agrobakteerivektorit: Yleisiä maabakteereja, joilla on kyky siirtää ja liittää osa perintöaineksestaan (ns. T-DNA) isäntäkasvin perimään. Villityyppisistä bakteerikannoista siirtyvät geenit aiheuttavat aitosyöpä- ja karvajuurikasvitauteja. Käytettäessä agrobakteereja geeninsiirtovektoreina nämä tauti-geenit poistetaan ja korvataan siirrettävillä geneeillä.

Selektorigeeni: Geeninsiirroissa teknisenä apuvälineenä käytettävä geeni, joka aiheuttaa jonkin ominaisuuden, kuten antibiootti- tai herbisidikestävyuden, jonka perusteella siirtogeeniset solut tai solukot voidaan valita.



Kuva 1. Itäviä männyn siitepölyhiukkasia, joissa siirretyn reportterigeenin (*uidA*, β -glukuronidaasi) toiminta näkyy sinisenä värinä.

regenerointi näistä solukoista on myös onnistunut hyvin, ja kuusesta onkin nykyään olemassa useita satoja siirtogeenisiä kloonveja. Myös muille kuusilajeille (*P. glauca*, *P. mariana*) on olemassa toimivia, Kanadassa ja Yhdysvalloissa kehitettyjä geeninsiirtomenetelmiä, jotka perustuvat biolistisen tekniikan ja solukkoviljelymateriaalin käyttöön.

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* \times *L. decidua*) geeninsiirrossa on käytetty agrobakteerivektoreita, kun taas kanadanlehtikuuseen (*L. laricina*) geeninsiirto on onnistunut biolistisella menetelmällä. Yhdysvalloissa myös marjakuusilajeista (*Taxus brevifolia*, *T. baccata*) on tuotettu agrobakteerien avulla siirtogeenisiä solulinjoja, joista ei kuitenkaan ole edes yritetty regeneroida taimia.

Geeninsiirto siitepölyyn onnistuu

Siitepöly on houkutteleva kohde geeninsiirroille, toimiihan se jo luonnostaan perintöaineksen siirtäjänä sukupolvelta toiselle. Siirtogeenisiä kasveja siitepölyyn tehdyn geeninsiirron kautta voidaan periaatteessa tuottaa kahdella tavalla: Siitepölystä, sen emosoluista tai niistä tuotetusta kallussolukosta tai alkioista voidaan regeneroida haploideja kasveja, joiden kromosomisto voidaan kaksinkertaistaa ja saada näin aikaan diploidi, myös siirtogeenin suhteen puhdas linja. Toinen mahdollisuus, jossa solukkoviljelytekniikoita ei tarvita lainkaan, on käyttää siirtogeenistä siitepölyä kontrolloiduissa risteytyksissä ja seurata siirtogeenin periytymistä jälkeläisille. Solukkoviljelyä käyttämällä siitepölystä tai sen epäkypsistä emosoluista on onnistuttu tuottamaan siirtogeenisiä kasveja ainakin ohralla, vehnällä ja tupakalla. Tupakalla siirtogeenisten kasvien tuottaminen on onnistunut myös kontrolloitujen risteytysten kautta.

Havupuilla geeninsiirtoa siitepölyyn on tutkittu useilla lajeilla, eniten kuitenkin männyllä ja kuusella. Kohdemateriaalina männyn ja kuusen siitepöly on erinomaista, koska sitä on runsaasti saatavilla lukuista eri puista ja se voidaan helposti säilyttää kuivatuna ja pakastettuna itävyyden siitä kärsimättä. Metsäntutkimuslaitoksella (Metla) on kehitetty biolistista geeninsiirtotekniikka siitepölyille soveltuvaksi, ja tutkittu geeninsiirtoon vaikuttavia tekijöitä. Riippuen käytetystä säätelyalueesta ja geeninsiirron kohteena olleesta pölyerästä, männyllä 12–84 %:ssa ja kuusella 7–58 %:ssa itävistä siitepölyhiukkasista voitiin havaita siirretyn reportterigeenin toimivan (kuva 1). Samoja pölyeriä on myös käytetty kontrolloituihin risteytyksiin siirtogeenisten taimien tuottamiseksi.

Biolistisessa tekniikassa kohteena olevat siitepölyhiukkaset pidetään geeninsiirron ajan paikoillaan levittämällä ne suspensiona kostutetun suodattimen päälle. Tästä syystä kontrolloidut risteytykset siirtogeenisellä männyn ja kuusen siitepölyllä tehtiin aluksi käyttäen ns. märkäpölytystekniikkaa. Tässä alun perin radiatamännylle kehitetyssä risteytystekniikassa siitepöly viedään emikukkiin suspensiona eikä kuivana kuten kontrolloiduissa risteytyksissä yleensä. Melko pian selvisi kuitenkin, ettei märkäpölytys menetelmänä sovellu kotoisille lajeillemme vaan tuottaa huonoja käpysatoja ja vähän täyttä siementä. Ongelman ratkaisemiseksi Metlassa kehitettiin menetelmä siirtogeenisten pölysuspensioiden kuivattamiseksi ja säilyttämiseksi. Nyt geeninsiirrot siitepölyyn voidaan tehdä jo hyvissä ajoin ennen puiden kukintaa ja risteytyksissä voidaan käyttää perinteistä kuivapölytekniikkaa.

Siirtogeenisiä havupuita siitepölyn välityksellä?

Männyllä ja kuusella tehtyjen tutkimusten perusteella suuri osa siitepölyhiukkasista pystyy ilmentämään siirrettyä reportterigeeniä, mutta vain pieni osa pystyy periyttämään sen syntyvälle jälkeläiselle. Syitä tähän voi olla monia. Havupuiden siitepölyhiukkasissa on useita soluja ja siirtogeenin pitäisi osua hedelmöittävään tumaan, jotta se voisi siirtyä syntyvälle jälkeläiselle. On mahdollista, että suurimmassa osassa havaitusta reportterigeenin toiminnasta on ollut kyse nimenomaan kasvullisessa solussa olleesta, eikä



Kuva 2. Siitepölyvälitteisellä menetelmällä tuotettu siirtogeeninen männyntaimi.

välttämättä edes tuman perintöainekseen liittyneestä siirtogeenistä. Sekä kuusen että männyn siitepölykammioon mahtuu lisäksi useita pölyhiukkasia, joten myös kilpailu siirtogeeniä kantavien ja tavallisten hiukkasten kesken heikentää siirtogeenisten jälkeläisten syntymismahdollisuuksia.

Siitepölymenetelmällä geeninsiirto on mahdollista ilman solukkoviljelyä tai kasveissa toimivia selektorigenejä (esim. antibiootti- tai herbisidikestävyysgeenit). Tekniikan hyvänä puolena voidaan mainita myös se, että sitä voidaan soveltaa moniin pölyeriin ja lisäksi risteytyksiä voidaan tehdä useilla emopuilla. Toisaalta siirtogeenisten jälkeläisten tuottamiseen ja tunnistamiseen kuluu aikaa ja resursseja: esimerkiksi männyn siemenen kypsyminen vie kaksi kasvukautta, siemen on kylmäkäsiteltävä ennen kylvöä ja saaduista taimista on löydettävä siirtogeeniset yksilöt. Oman vaikeutensa menetelmään tuovat kukinnan vuosittainen vaihtelu ja joinain vuosina epäedulliset sääolot risteytysaikaan.

Siitepölyvälitteisellä menetelmällä on tähän mennessä onnistuttu tuottamaan siirtogeeninen mänty (kuva 2). Myös kuusiristeytyksistä on olemassa runsaasti jälkeläisiä, joiden siirtogeenisyyttä tutkitaan.

Menetelmän on siis osoitettu toimivan, mutta se ei vielä sovellu rutiinikäyttöön ennen kuin sen tehoa on pystytty olennaisesti parantamaan. Yksi mahdollisuus on selektion käyttö siementen idätys- tai taimikasvatusvaiheessa. Jatkossa menetelmällä tuotettuja siirtogeenisiä yksilöitä voitaneen monistaa pistokkaina, ainakin kuusen, mahdollisesti myös männyn tapauksessa. Siitepölyvälitteinen geeninsiirto voidaan myös yhdistää solukkomonistukseen käytämällä risteytyksistä syntyneitä alkioita viljelmien lähtömateriaalina.

Kirjallisuutta

- Aronen, T., Nikkanen, T. & Häggman, H. 1998. Compatibility of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 79–86.
- Bishop-Hurley, S.L., Zabkiewicz, R.J., Grace, L., Gardner, R.C., Wagner, A. & Walter, C. 2001. Conifer genetic engineering: transgenic *Pinus radiata* (D. Don) and *Picea abies* (Karst) plants are resistant to the herbicide Buster. *Plant Cell Reports* 20: 235–243.
- Charest, P., Devantier, Y. & Lachance, D. 1996. Stable genetic transformation of *Picea mariana* (Black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 32: 91–99.
- Clapham, D., Demel, P., Elfstrand, M., Koop, H.-U., Sabala, I. & von Arnold, S. 2000. Gene transfer by particle bombardment to embryogenic cultures of *Picea abies* and the production of transgenic plantlets. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15: 151–160.
- Elfstrand, M., Fossdal, D.G., Sitbon, F., Olsson, O., Lönnberg, A. & von Arnold, S. 2001. Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene *spi 2* in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth. *Plant Cell Reports* DOI 10.1007/s002990100360.
- Ellis, D., McCabe, D.E., McInnis, S. et al. 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology* 11: 84–89.
- Han, K.-H., Fleming, P., Walker, K. et al. 1994. Genetic transformation of mature *Taxus*: an approach to genetically control the in vitro production of the anticancer drug, taxol. *Plant Science* 95: 187–196.
- Huang, Y., Diner, A. & Karnosky, D. 1991. Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 27: 201–207.
- Häggman, H. & Aronen, T. 1998. Transgene expression in regenerating cotyledons and embryogenic cultures of Scots pine. *Journal of Experimental Botany* 49(324): 1147–1156.
- Häggman, H.M., Aronen, T.S. & Nikkanen, T.O. 1997. Gene transfer by particle bombardment to Norway spruce and Scots pine pollen. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 928–935.
- Klimaszewska, K., Devantier, Y., Lachance, D., Lelu, M.A. & Charest, P.J. 1997. *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 538–550.
- Levee, V., Lelu, M.-A., Jouanin, L. et al. 1997. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* × *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Reports* 16: 680–685.
- , Garin, E., Klimaszewska, K. & Seguin, A. 1999. Stable genetic transformation of white pine (*Pinus sylvestris* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Breeding* 5: 429–440.
- Shin, D.-I., Podila, G.K., Huang, Y. & Karnosky, D.F. 1994. Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 2059–2067.
- Tang, W., Sederoff, R. & Whetten, R. 2001. Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta* 213: 981–989.
- Tian, L.-N., Charest, P.J., Séguin, A. & Rutledge, R.G. 2000. Hydromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). *Plant Cell Reports* 19: 358–362.
- Walter, C., Grace, L.J., Wagner, A., White, D.W.R., Walden, A., Donaldson, S.S., Hinton, H., Gardner, R.C. & Smith, D.R. 1998. Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Reports* 17: 460–468.
- , Grace, L.J., Donaldson, S.S., Moody, J., Gemmell, J.E., van der Maas, S., Kvaalen, H. & Lönnberg, A. 1999. An efficient biolistic transformation protocol for *Picea abies* embryogenic tissue and regeneration of transgenic plants. *Canadian Journal of Forest Research* 29: 1539–1546.
- Wenck, A.R., Quinn, M., Whetten, R.W., Pullman, G. & Sederoff, R. 1999. High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Molecular Biology* 39: 407–416.

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