

Suomen ympäristö

185

Elina Häikiö ja Jaakko Kangasjärvi

# Biotekniikan riskit

Siirtogeenisten kasvien  
ympäristövaikutukset Suomessa

Kuopio 1999

**POHJOIS-SAVON YMPÄRISTÖKESKUS, SUOMEN YMPÄRISTÖKESKUS**

Paiettu ympäristöystävälliselle Galerie Art Silk paperille

ISBN 952-11-0243-8  
ISSN 1238-8602

Kansikuva: Kuvassa tupakka, johon on siirretty koivun kukan kehittymistä säätelevä geeni.  
Tarkoituksena on selvittää koivun kukan kehityksen säätelyä, jotta voitaisiin estää esimerkiksi  
koivuun mahdollisesti siirrettävien geenien leviäminen luonnonpopulaatioihin.  
Juha Lemmetyinen, Joensuun yliopisto, biologian laitos

Taitto: Hilikka Koivisto

Kuopion Liikekirjapaino Oy 1999

# Alkusanat

Tämä raportti pyrkii antamaan kuvan keskeisimmistä geenitekniikalla muunnettujen kasvien ympäristövaikutuksiin vaikuttavista tekijöistä ja niitä koskevista riskinarviointimenetelmistä. Kokemusta siirtogeenisten kasvien pitkäaikaisista ympäristövaikutuksista ei vielä ole ja tämä raportti on lähinnä kirjallisuuden pohjalta tehty katsaus aiheeseen. Raportti on tehty Pohjois-Savon ympäristökeskuksen tutkimusyksikössä. Työn ovat rahoittaneet ympäristöministeriön ympäristönsuojeluosasto ja Pohjois-Savon ympäristökeskus.

Ajatus tämän raportin kirjoittamisesta lähti alunperin Pohjois-Savon ympäristökeskuksesta, mutta suuren kiitoksen ansaitsee myös ylitarkastaja Tiina Huvio ympäristöministeriöstä, joka on osallistunut ideointiin ja työn eteenpäin viemiseen alusta asti. Haluamme myös kiittää ohjausryhmän jäseniä dos. Hely Häggmania Metsäntutkimuslaitoksen Punkaharjun tutkimusasemalta, agr. Reino Aikasaloa Boreal Suomen kasvinjalostuksesta ja dos. Jussi Tammisola maa- ja metsätalousministeriöstä.

Kiitämme lämpimästi kaikkia projektiin osallistuneita henkilöitä ja tahoja. Erityisen kiitoksen haluamme esittää Suomen ympäristökeskuksen asiantuntijaryhmälle, jonka kanssa raportin tiimoilta on pidetty lukuisia kokouksia ja jonka avulla asiat ovat jäsentyneet ja työ on saatu päätökseen. Kemikaaliyksikön ylitarkastaja Marja Ruohonen-Lehto on ehdottomasti ollut yksi projektin liikkeellä pitävistä voimista. Hänen lisäksi haluamme kiittää ryhmään kuuluneita kemikaaliyksikön MMM, DI Jyrki Pitkäjärveä ja FT Kirsi Törmäkangasta hyvistä ja asiantuntevista neuvoista ja etenkin kieliasun korjaamisesta, sekä luonto- ja maankäytön yksikön vanhempaa tutkijaa Harry Helmisaarta, joka on tuonut ekologista näkemystä aiheeseen. Tämän ryhmän panos työn lopputulokseen on ollut erittäin suuri. Kiitämme myös prof. Jari Valkosta avusta, jota hän on antanut kasvivi-ruksia koskevissa kysymyksissä.

Erityiskiitoksen ansaitsee Martti Häikiö, joka on kommentoinut työtä useaan otteeseen sen eri vaiheissa, esittänyt hyviä korjausehdotuksia ja tuonut esiin tavallisen ihmisen näkökulmaa aiheeseen. Kiitämme myös Magnus Nyströmiä ja Fred Baubea, jotka auttoivat ruotsin- ja englanninkielisissä käännöksissä, sekä tutkijoita Riitta Nissistä, Timo Turpeista, Mari Valkosta ja Anne Hernesmaata, jotka ovat auttaneet materiaalin hankkimisessa. Lopuksi kiitämme lämpimästi Pohjois-Savon ympäristökeskusta, joka on tarjonnut erinomaiset edellytykset työn tekemiselle, sekä erityisesti tutkimusyksikön henkilökuntaa, jonka kannustavassa ilmapiirissä tämä työ on valmistunut.

Kuopiossa elokuussa 1998

Tekijät



# Sisällys

<i>Alkusanat</i> .....	3
<i>1 Johdanto</i> .....	9
<i>2 Kasvinjalostus ennen ja nyt</i> .....	10
2.1 Perinteiset kasvinjalostusmenetelmät .....	10
2.2 Geeniteknologian läpimurto .....	12
2.3 Siirtogeeniset kasvit tänään .....	14
<i>3 Geenien siirto kasviin</i> .....	18
3.1 Geeninsiirto agrobakteerin avulla .....	19
3.2 Suora geeninsiirto .....	21
3.2.1 DNA:n siirto protoplasteihin .....	21
3.2.2 DNA:n siirto suoraan kasvisolukkaan .....	23
3.3 Geeninsiirto muunnettujen kasvivirusien avulla .....	25
<i>4 Geeninsiirtovektorit</i> .....	27
4.1 Agrobakteerin Ti-plasmidivektorit .....	27
4.1.1 Integroituvat välimuotoiset vektorit .....	27
4.1.2 Binaariset vektorit .....	28
4.2 Suorassa geeninsiirrossa käytettävät vektorit .....	29
4.3 Geenien ilmentymiseen tarvittavat säätelyalueet .....	29
4.3.1 Promoottorit .....	30
4.3.2 Terminaattorit .....	31
4.4 Merkkigeenit .....	32
4.4.1 Reportterigeenit .....	32
4.4.2 Valikoinnissa käytettävät merkkigeenit (selektiomarkkerit) ..	33
4.4.3 Merkkigeenin poisto .....	34
<i>5 Geneettinen ja fenotyyppinen stabiilisuus</i> .....	36
5.1 Transkription aikana tapahtuva inaktivaatio (promoottorin metylaatio) .....	36
5.2 Transkription jälkeen tapahtuva inaktivaatio (kosuppressio) .....	37
5.3 Siirtogeenien pysyvyyden parantaminen .....	38
<i>6 Siirretyt ominaisuudet</i> .....	39
6.1 Herbisidikestävyys .....	39
6.1.1 Glyfosaatti (N-(fosfonometyyli)glysiini) .....	39

6.1.2 Glufosinaattiammonium (fosfotriisiini, bialafos) .....	40
6.1.3 Triatsiinit .....	40
6.1.4 Sulfonyyliureat ja imidatsolinonit .....	41
6.1.5 Bromoksiniiili .....	41
6.1.6 2,4-D .....	41
6.2 Hyönteiskestävyys .....	42
6.3 Viruskestävyys .....	43
6.4 Taudinkestävyys (bakteerit ja sienet) .....	45
6.5 Stressinkestävyys .....	47
6.5.1 Kuiva- ja suolastressi .....	47
6.5.2 Kylmästressi .....	47
6.5.3 Raskasmetallit .....	49
6.6 Laatuominaisuudet .....	49
6.6.1 Rasvahappokoostumuksen muuttaminen .....	49
6.6.2 Aminohappokoostumuksen muuttaminen .....	51
6.6.3 Hiilihydraattikoostumuksen muuttaminen .....	51
6.7 Muut ominaisuudet .....	52
6.7.1 Lääkeaineiden tuottaminen kasveissa .....	52
6.7.2 (Koiras)steriliteetti .....	54
6.7.3 Polymeerien tuottaminen kasveissa .....	55
6.7.4 Koristekasvien ominaisuudet .....	56
6.7.5 Muut ominaisuudet .....	57

## **7 Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutukset**

<b>Suomessa .....</b>	<b>59</b>
7.1 Ympäristövaikutusten arvioinnin periaatteet .....	59
7.1.1 Riskinarviointiin vaikuttavat tekijät .....	59
7.1.2 Riskinarvioinnin lähestymistapoja .....	63
7.2 Siirrettyjen geenien leviäminen ympäristöön .....	65
7.2.1 Kasvin leviäminen ympäristöön .....	65
7.2.2 Geenien siirtyminen lajista toiseen .....	68
7.2.3 Geenien leviämisen estäminen .....	71
7.3 Siirrettyjen ominaisuuksien mahdolliset vaikutukset .....	72
7.3.1 Herbisidikestävyys .....	72
7.3.2 Hyönteiskestävyys .....	74
7.3.3 Viruskestävyys .....	76
7.3.4 Taudinkestävyys (bakteerit ja sienet) .....	78
7.3.5 Stressinkestävyys .....	78
7.3.6 Antibioottikestävyys .....	78
7.3.7 Muut ominaisuudet .....	79
7.3.8 Siirrettyjen ominaisuuksien vaikutukset maaperän eliöihin ....	80
7.3.9 Geenien inaktivaation ympäristövaikutukset .....	81
7.4 Riskinarviointia esimerkkikasvien avulla .....	81
7.4.1 Sädelatva (Gerbera hybrida) .....	82
7.4.2 Tupakka (Nicotiana tabacum; virginiantupakka) .....	82
7.4.3 Lituruoho (Arabidopsis thaliana) .....	82
7.4.4 Rauduskoivu (Betula pendula) .....	83

<b>8 Yhteenveto ja pohdintaa .....</b>	<b>84</b>
<b>Kirjallisuus .....</b>	<b>89</b>
<b>Liite 1. Rasvojen rakenne ja tavallisimmat rasvahapot kasveissa ...</b>	<b>102</b>
<b>Liite 2. Tiedjen ym. (1989) esitys geenitekniikalla muunnettujen organismien riskinarvioinniksi.....</b>	<b>103</b>
<b>Liite 3. Riskinarvioinnin kriteerejä Gaugitschin ja Torgersenin (1995) mukaan.....</b>	<b>106</b>
<b>Liite 4. Geenitekniikan ja (molekyyli)biologian käsitteitä. ....</b>	<b>107</b>
<b>Liite 5. Raportissa esiintyvät geenit ja niiden lopputuotteet. ....</b>	<b>110</b>
<b>Liite 6. Raportissa esiintyvät virukset ja nimien lyhenteet Valkosen (1993) mukaan.....</b>	<b>111</b>





# Johdanto

---

Kasvien perimän muuttaminen geenitekniikan avulla on melko uutta, mutta se on jo saavuttanut merkittävän aseman kasvinjalostuksessa. Maailmassa oli vuoden 1995 loppuun mennessä tehty yli 3500 kenttäkoetta 34 maassa ainakin 56 eri siirtogeenisellä kasvilajilla. Vuoteen 1997 mennessä USA:ssa on ollut laajassa kaupallisessa viljelyssä 22 geenitekniikalla muunnettua kasvilajiketta ja Euroopan markkinoillekin on jo hyväksytty neljä tällaista lajiketta. Siirtogeeniset kasvit tulevat mitä todennäköisimmin olemaan ensimmäiset luonnonympäristössä käytetyt geenitekniikalla muunnetut organismit (GMO:t) Suomessakin ja niiden käyttö luonnonympäristöissä tulee olemaan GMO:ista laajinta. Suomessa on siirtogeenisillä kasveilla vuoteen 1997 mennessä tehty kahdeksan tutkimus- ja kehittämis-koetta — ohralla, perunalla, rapsilla, sokerijuurikkaalla, koivulla, kuusella ja mämmyllä.

Vaikka kenttäkokeita on maailmassa tehty näinkin paljon, siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutuksia ei vielä juurikaan tunneta. Siirtogeenisiä lajikkeita on ollut laajemmassa kaupallisessa viljelyssä vasta muutamia vuosia ja tätä ennen tehdyt kenttäkokeet ovat olleet pienialaisia ja ne on tehty tarkkaan valvotuissa olosuhteissa, jolloin ympäristövaikutukset eivät välttämättä tule näkyviin.

Tässä raportissa tarkastellaan siirtogeenisten kasvien mahdollisia ympäristövaikutuksia tähän mennessä julkaistujen kansainvälisten tutkimusten perusteella. Suomen pohjoiset olosuhteet poikkeavat kuitenkin selvästi esimerkiksi Keski-Euroopan ja USA:n olosuhteista: ympäröivä luonto ja kasvilajisto, jotka täytyy ottaa huomioon siirtogeenien mahdollisen luontoon leviämisen todennäköisyyden arvioinnissa, poikkeavat suuresti eteläisemmistä alueista. Myöskään käytettävät lajit ja lajikkeet eivät ole samoja ja kasveihin siirrettävät ominaisuudet poikkeavat niistä, joita tavoitellaan eteläisemmissä olosuhteissa. Siirtogeeniset puut tulevat olemaan Pohjois-Eurooppaa koskeva erityiskysymys. Tämän raportin tarkoituksena onkin ollut tehdä selvitys Suomen kannalta merkityksellisistä kasvilajeista ja geenitekniikalla muunneltavista ominaisuuksista sekä niiden mahdollisista ympäristövaikutuksista. Raportissa on käsitelty ympäristövaikutusten arviointiin vaikuttavia tekijöitä ja niiden lisäksi joitakin riskinarviointimenetelmiä ja niiden soveltamismahdollisuuksia. Raportin alussa on melko laaja teoriaosa, jossa käsitellään muun muassa geenitekniikan perusmenetelmiä ja geenitekniikalla muunnettujen kasvien historiaa ja nykytilannetta. Teoriaosa otettiin mukaan, jotta ympäristövaikutusten arviointia koskevassa osassa käsiteltävien asioiden taustat ja teoria olisivat helposti löydettävissä samoista kansista, sillä vastaavaa suomenkielistä raporttia ei tähän mennessä ole ollut saatavilla.

# 2

## Kasvinjalostus ennen ja nyt

### 2.1 Perinteiset kasvinjalostusmenetelmät

Kasvinjalostuksen voidaan sanoa alkaneen jo 10 000—15 000 vuotta sitten, jolloin ihminen alkoi suosia tiettyjä kasvilajeja ja kasvattaa niitä omaan käyttöönsä. Tällöin otettiin viljelyyn ensimmäiset viljakasvit, ja ihminen alkoi muokata ympäristöä edullisten viljelyolojen luomiseksi arvokkaiksi havaituille lajeille. Valikoidessaan kasvien joukosta omiin tarkoituksiinsa sopivimpia kasviyksilöitä ihminen alkoi ohjata kasvien evoluutiota nykyisten viljelylajikkeiden suuntaan. Valintaan perustuva jalostus on jatkunut tämän vuosisadan alkuun asti, jolloin Mendelin lakeja alettiin soveltaa käytäntöön ja tieteellisen kasvinjalostuksen voidaan sanoa saaneen alkunsa. Pelkän ilmiasun perusteella tapahtuvan valinnan sijasta, ja sen lisäksi, haluttuja ominaisuuksia alettiin risteytyksen avulla yhdistellä, jolloin ihminen oppi järjestelemään kasvien perintötekijöitä uudella tavalla. **Perinteiset kasvinjalostusmenetelmät perustuvat siis muuntelemaan materiaaliin ja siitä tehtävään valintaan.** Muuntelua yksittäisten ominaisuuksien kohdalla voidaan risteyttämisen lisäksi saada aikaan keinotekoisesti, esimerkiksi mutaatiojalostuksen avulla.

#### Valinta- ja risteytysjalostus

Niin sanottua puhdasta linjaa perustettaessa valitaan yksilöitä suuresta joukosta fenotyypin eli ilmiasun perusteella ja huonot jälkeläiset poistetaan. Yksilövalinnassa valinta kohdistuu tiettyihin yksilöihin, joista kustakin kasvatetaan oma jälkeläistö. Kunkin yksilön arvostelu tapahtuu sen jälkeläistön perusteella. Massavalinnassa tietystä yksilöjoukosta valitaan fenotyypin perusteella joukko yksilöitä, joiden sekoitetut siemenet käsitellään yhtenä kokonaisuutena. Lopullinen yksilöjoukko (linja) on homotsygoottinen eli puhdas halutun ominaisuuden suhteen. Hankaluutena puhtaan linjan valinnassa ovat mahdollisten haitallisten geenien ilmentyminen ja toisaalta hyödyllisten geenien peittyminen. Soijapapu on esimerkiksi kasvista, jonka eri lajikkeita on jalostettu puhtaan linjan valinnan avulla.

Valintajalostusta on viime aikoihin asti käytetty esimerkiksi metsäpuilla. Luonnonvaraisten yksilöiden joukosta on valittu niin sanottuja pluspuita, joiden siemenistä on perustettu siemenviljelyksiä, ja näistä saatavaa siementä on sitten käytetty metsänuudistukseen. Puhtaassa valintajalostuksessa on kuitenkin tyydyttävä jo olemassa olevaan perimäaineistoon, ja jo tämän vuosisadan alkupuolella siirryttiin risteytysjalostukseen, jonka avulla aineiston muuntelua saadaan lisättyä. Risteytysjalostus on kuitenkin aikaa vievää työtä. Muuntelevasta aineistosta on saatava riittävän yhtenäinen jälkeläistö, sillä lajikkeeseen siirrettyjen ominaisuuksien tulee olla pysyviä. Tähän vaiheeseen voidaan päästä viisi—kuusi sukupolvea alkuperäisen risteytyksen jälkeen. Risteytys- ja valintatyöhön yhtenäisen lajikkeen tuottamiseksi voi esimerkiksi ohran tapaisella yksivuotisella itsesiittoisella kasvilla kulua kahdeksasta kymmeneen vuotta (Kivi 1983).

Risteytysjalostuksessa pyritään saamaan aikaan uusia ominaisuusyhdistelmiä. Ennestään hyväiksi todettujen ja keskenään risteytyvien lajikkeiden joukosta valitaan ne, jotka täydentävät toisiaan — esimerkiksi pitkälle jalostettu, satoisa lajike

risteytetään ilmastoa tai tauteja paremmin kestävästä lajikkeesta (usein luonnonvaraiset tai maatiaislajikkeet) kanssa. Risteytyksen avulla luodaan muuntelevaa aineistoa, josta aluksi karsitaan epätoivotut jälkeläiset pois ja valintatyön edetessä siirrytään positiiviseen valintaan, haluttujen linjojen tallentamiseen.

### Heterosijalostus (hybridisaatio)

Heterosijalostus perustuu niin sanottuun hybridielinvoimaan eli heteroosiin. Hybridielinvoiman molekulaarista perustaa ei tiedetä, mutta risteytettäessä homotsygoottisia itsesiittoisia linjoja tuloksena on heterotsygoottisia jälkeläisiä, jotka ovat kooltaan suurempia ja yleensä myös satoisampia. Heteroosivaikutus on voimakkaimmillaan silloin, kun risteytettävät vanhemmat poikkeavat toisistaan mahdollisimman paljon.

Maissi on normaalisti ristipölytteinen kasvi, mutta se voidaan pakottaa itse-pölytykseen, jolloin sillä voidaan todeta voimakas itsesiitosheikkeneminen. Kun 6–7 sukupolven itse-pölytyksen jälkeen kaksi homotsygoottista linjaa risteytetään keskenään, perinnöllisen erilaisuuden aste kasvaa yhtäkkiä voimakkaasti. Tuloksena on  $F_1$ -hybridimaissi, joka on elinvoimainen, satoisa ja geneettiseltä koostumukseltaan yhtenäinen. Toisaalta  $F_1$ -hybridin siemen ei ole enää yhtenäinen, joten hybridisiemen pitää tuottaa joka vuosi uudestaan. Suuri osa maissin lajikkeista on niin sanottuja kaksoishybridejä eli  $F_1$ - polven ja sukusiitoslinjan tai kahden  $F_1$ -linjan risteymiä. Maissin lisäksi esimerkiksi useimmat tomaattilajikkeet ovat hybridejä.

Hybridisiemenen valmistuksessa ristipölytyksen varmistaminen on tärkeää. Tähän asti menetelmänä on käytetty hedekukintojen poistoa, mikä on kuitenkin työlästä ja useilla pieniheteisillä lajeilla lähes mahdotonta. Maissista löydettiin 1950-luvulla Teksasissa linja, joka oli koirassteriili (niin sanottu CMS-T-tyyppi; CMS = *cytoplasmic male sterility*) ja jota käytettiin parikymmentä vuotta hybridisiemenen valmistukseen. 1960-luvun lopulla kuitenkin todettiin, että CMS-T-tyyppi on erittäin herkkä *Bipolaris maydis* -sienipatogeenille. Tämä sieni aiheutti laajoja epidemioita maissiviljelmillä USA:ssa, minkä jälkeen CMS-T-maissin käyttö lopetettiin. Nykyään voidaan geenitekniikan avulla tuottaa koirassteriilejä kasveja, jotka eivät tuota siitepölyä.

### Somaattiset hybridit

Myös laji- ja sukujenvälisiä hybridejä voidaan tuottaa. Hankaluutena on kuitenkin usein yhteensopimattomuus (inkompatibiliteetti) laji- välillä, jolloin niiden risteyttäminen keskenään ei onnistu. Tätä ongelmaa on yritetty ratkaista niin sanottujen somaattisten hybridien eli protoplastifusion avulla. Protoplastit ovat kasvisoluja, joilta on poistettu soluseinä. Solujen fuusio onkin mahdollista, mutta lisääntymiskykyisten kasvien kasvattaminen näistä yhdistyneistä soluista ei yleensä onnistu. Onnistuneita laji- välisiä somaattisia hybridejä on kuitenkin saatu aikaan muun muassa tupakalla ja petuniolla sekä joillakin ristikukkaisilla kasveilla (*Brassicaceae*).

### Mutaatiojalostus

Keinotekoisia mutaatioita voidaan saada aikaan erilaisten kemikaalien tai ionisoivan säteilyn avulla. Siemenaineistoa käsittelemällä saadaan melko helposti aikaan mutaatioita. Useimmat niistä ovat haitallisia luonnonoloissa, mutta eivät välttämättä viljelyssä (esimerkiksi kasvihuonetomaatilla). Somaattiset mutaatiot syntyvät yksilönkehityksen aikana tietyissä solukoissa; niitä voidaan käyttää hyväksi kasvullisesti lisääntyvillä lajeilla. Tällaisia mutaatioita ovat esimerkiksi *Dahlia*

valkokukkainen muoto ja eräät omenan hedelmän värimutaatiot. Mutaatiojalostuksen etuna on se, että toisin kuin risteytysjalostuksessa, valintaa ei tarvitse tehdä muuntelevan aineiston joukosta useiden sukupolvien ajan vaan mutaatiojalostukseen käytettävä lähtöaineisto on jo valmiiksi yhtenäistä.

## Polyploidia

Normaalisti kasvit ovat diploideja eli ne sisältävät kaksinkertaisen kromosomiston. Kasvit, joilla kromosomistoja on kolme tai enemmän, ovat polyploideja. Polyploidit kasvit ovat yleensä suurempia kuin diploidit. Ne ovat kuitenkin usein myös lisääntymiskyvyttömiä. Tämä ei toisaalta haittaa esimerkiksi koristekasveilla, joita lisätään kasvullisesti.

Polyploidia saadaan keinotekoisesti aikaan kolkisiinin avulla, joka estää tumasukkulan muodostumisen ja kromosomien jakautumisen solunjakautumisen aikana. Tytärkromosomistot jäävät samaan soluun ja kromosomisto kaksinkertaistuu. Tätä lajin sisäistä polyploidiaa sanotaan autopolyploidiksi. Viljakasveista tärkein autopolyploidi on tetraploidiruis, jonka etuna on jyvän suurempi koko. Haittana on risteytyminen diploidin rukiin kanssa, jolloin syntyvät jälkeläiset ovat triploideja ja steriilejä. Sokerijuurikkaan lajikkeista suuri osa on triploideja, joita tuotetaan risteyttämällä tetraploideja ja diploideja lajikkeita. Tällainen lajike ei kuitenkaan tuota tervettä siementä, joten kylvösiemen pitää ostaa joka vuosi uudelleen.

Lajien välistä polyploidiaa sanotaan allopolyploidiksi. Koska allopolyploidiaassa yhdistyvät kahden eri lajin geenistöt, se lisää geneettistä muuntelua. Tunnetuin esimerkki allopolyploidista lienee ruisvehnä (*Triticale*).

## 2.2 Geeniteknologian läpimurto

Kun perinteinen kasvinjalostus perustuu lähinnä kromosomitason manipulaatioon, geenitekniikalla päästään vaikuttamaan yksittäisten geenien ilmentymiseen eli ekspressioon. Perinteinen risteytyksen ja valinnan avulla tapahtunut kasvinjalostus on perustunut geenien eri alleelien valikointiin. Alleelit ovat saman geenin erilaisia muotoja. Evoluution aikana luonnonkasveihin ovat valikoituneet alleelit, jotka ovat sopeuttaneet kasvit elämään tietyssä ympäristössä. Risteytysjalostuksessa villityypin alleeleja on korvattu ihmisen tarpeisiin paremmin soveltuvilla alleeleilla, jolloin kasvin kilpailukyky luonnossa on yleensä vähentynyt. Tämän vuoksi jalostetut lajit eivät usein enää tule toimeen luonnonoloissa. Risteytysjalostuksessa ongelmana on usein geenien kytkeytyminen eli geenien sijaitseminen niin lähekkäin, että niitä ei saada risteytyksessä eroamaan toisistaan. Tällöin halutun ominaisuuden lisäksi jälkeläisiin saattaa siirtyä ei-toivottuja ominaisuuksia. Geenitekniikan avulla kasveihin voidaan siirtää ylimääräisiä geneejiä niissä jo olevien ominaisuuksien lisäksi. Tällöin jalostuksessa jo saavutettuja ominaisuuksia ei menetetä kuten saattaa tapahtua risteytysjalostuksessa, jossa geeneillä käydään ikään kuin vaihtokauppaa.

Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla geneejiä kyetään nykyään siirtämään bakteeri-, hiiva-, kasvi- ja eläinsolujen välillä. Restriktioentsyymien eli rajaavien endonukleaasien avulla DNA:ta voidaan pilkkoa spesifisistä kohdista, ja ligaasientsyymien avulla DNA-paloja voidaan liittää toisiinsa. Bakteereissa olevia itsestään lisääntyviä DNA-molekyylejä eli plasmideja voidaan käyttää kuljettajina eli vektoreina siirrettäessä DNA:ta solusta toiseen.

Läpimurto kasvinjalostuksessa tapahtui vuonna 1983, kun kolme tutkijaryhmää onnistui siirtämään **antibioottikestävyysgeenin** kasvisoluun *Agrobacterium tumefaciensin* avulla (Bevan ym. 1983, Fraley ym. 1983, Herrera-Estrella ym. 1983).

Agrobakteerista oli poistettu kasvaimen aiheuttavat geenit ja niiden tilalle oli siirretty neomysiinifosfotransferaasigeeni, joka saa aikaan kestävyuden kanamysiini-antibioottia vastaan. Kasvisolut, joihin tämä geeni oli onnistuneesti siirretty, voitiin valita kasvattamalla niitä kanamysiiniä sisältävällä alustalla. Kasvisolut, jotka olivat saaneet kestävyysgeenin, kasvoivat alustalla, kun taas siirtogeenittömät solut kuolivat. Tällaisia geenejä, joiden avulla siirtogeenisiä soluja voidaan valikoida, sanotaan merkkigeeneiksi. Tämä menetelmä loi perustan tuleville geenisiirroille.

Vuonna 1986 **tupakkaan** siirrettiin agrobakteerimenetelmän avulla tupakan mosaikkiviruksen kuoriproteiinia koodittava geeni, joka sai aikaan ainakin osittaisen **viruskestävyyden** siirtogeenisistä soluista kasvatetuissa tupakantaimissa (Abel ym. 1986). Agrobakteerimenetelmän avulla siirrettiin myös **herbisidikestävyys** kasviin, esimerkiksi petuniaan siirrettiin glyfosaattikestävyys (Shah ym. 1986). Samana vuonna tehtiin myös ensimmäiset **tutkimus- ja kehittämiskokeet (kenttäkokeet)** siirtogeenisillä kasveilla Euroopassa ja USA:ssa (Leemans 1993).

Vuonna 1987 tupakkaan siirrettiin agrobakteerimenetelmän avulla *Bacillus thuringiensis* -bakteerin erästä Bt-toksiinia koodittava geeni (Vaeck ym. 1987). Tomaattiin siirrettiin vastaavasti toisen *B. thuringiensis* -kannan toksinigeeni (Fischhoff ym. 1987). Kukin toksini on myrkyllinen vain tietyille hyönteisille. Ilmentyessään kasvin lehdistä Bt-toksiini tappaa niitä syövät hyönteiset ja saa siten aikaan **hyönteiskestävyuden** kasvissa. Klein ym. (1987) kehittivät menetelmän, jolla DNA:ta saatiin suoraan siirrettyä kasvisoluun. Tässä niin sanotussa **mikroammus- eli partikkelipommitusmenetelmässä** pieniä volframikuulia, joiden pinnalla on DNA:ta tai RNA:ta, ammutaan suoraan soluun. Klein ym. (1987) ampuivat tupakan mosaikkiviruksen RNA:ta sipulin pintasolukkuun ja saivat aikaan viruspartikkeleiden muodostumisen soluissa. Tämä menetelmä tekee mahdolliseksi DNA:n tai RNA:n suoran siirron kasvisoluun silloin, kun agrobakteeria ei voida käyttää (esimerkiksi yksisirkkaisilla kasveilla). Christou ym. (1988) kehittivät menetelmästä muunnelman, jossa DNA:lla päällystettyjä kultahiukkasia ammuttiin voimakkaan sähköpurkauksen avulla soijapavun alkioista tehtyihin protoplasteihin. Umbeck ym. (1987) siirsivät agrobakteerimenetelmän avulla **puuvillaan** kanamysiinikestävyysgeenin. Samana vuonna onnistuttiin ensimmäisen **puuvartisen** kasvin geeninsiirrossa. Fillatti ym. (1987) siirsivät agrobakteerimenetelmällä poppeliin geenin, joka sai aikaan glyfosaattikestävyysgeenin.

Vuonna 1988 **soijapapuun** siirrettiin sekä kanamysiini- että herbisidikestävyys infektoimalla sirkkalehtiä agrobakteerilla (Hinchee ym. 1988). Uudet versot saatiin syntymään suoraan infektoiduista sirkkalehdistä. **Riisiin** siirrettiin kanamysiinikestävyys protoplastien elektroporaation avulla (Toriyama ym. 1988). Tomaatin hedelmän kypsymisen säätelämiseksi tomaattiin siirrettiin agrobakteerimenetelmän avulla polygalakturonaasientsyymien **antisense-RNA** (Sheehy ym. 1988). Antisense-RNA on komplementaarinen geenin lähetti-RNA:n kanssa ja estää geenin ilmentymisen paritumalla sen lähetti-RNA:n kanssa. Koska polygalakturonaasi edistää kypsymisvaiheessa hedelmän soluseinien hajoamista ja siten hedelmän pehmenemistä, tällä antisense-tekniikalla saatiin kypsä tomaatti säilymään pitempään kiinteänä ja käyttökelpoisena. **Maissiin** saatiin siirrettyä herbisidikestävyysgeeni mikroammusmenetelmän avulla; kohdesoluina käytettiin embryogeenista solususpensiota (Gordon-Kamm ym. 1990).

**Koirassteriliteettiä** on käytetty hyväksi hybridisiemenen tuotannossa, koska sen avulla voidaan varmistaa kahden linjan ristipölytyksen. Mariani ym. (1990) siirsivät tupakkaan ja rapsiin ribonukleaasigeenin, joka saatiin ilmentymään spesifisesti siitepölyn muodostumisvaiheessa. Tämä ribonukleaasi (barnaasi) tuhoaa heiteen pölyn lokeron seinämän niin sanotun tapetum-solukon, joka toimii nor-

maalisti siitepölyhiukkasten ravintosolukkona. Tällöin siitepölyä ei muodostu, ja nämä koirassteriilit kasvit voidaan pölyttää toisen kannan siitepölyllä, eikä vaaraa itse-pölytyksestä ole.

Vuonna 1992 sama ryhmä (Mariani ym. 1992) onnistui **palauttamaan siitepölyn tuottamiskyvyn** kasveille, jotka oli aikaisemmin tehty koirassteriileiksi. Rap-siin siirrettiin ribonukleaasi-inhibiittorigeeni, joka esti aikaisemmin siirretyn ribonukleaasin toiminnan, jolloin lisääntymiskyky palautui. Tämä on tärkeää etenkin lajeilla, jotka kasvatetaan hybridisiemenestä, mutta joiden hedelmät tai siemenet kerätään satona (esimerkiksi tomaatti, vehnä ja riisi). Samana vuonna Vasil ym. (1992) siirsivät herbisidikestävyysgeenin **vehnään**. Vehnä on luonnostaan vastustuskykyinen kanamysiinille, joten merkkigeeniksi valittiin fosfinotrisiinikestävyys (fosfinotrisiini eli glufosinaattiammonium on vaikuttavana aineena muun muassa Basta<sup>®</sup>-herbisidissä). Geeni siirrettiin vehnän kallussolukkoon mikroammusmenetelmän avulla. Vehnällä, kuten muillakin yksisirkkaisilla ongelmana ei ole niinkään geenien siirtäminen kasvisoluun, vaan uusien kasvien kasvattaminen siirtogeenisistä soluista. Vasilin ym. (1992) menetelmässä DNA:ta ei siirretä protoplasteihin vaan embryogeeniseen kallussolukkoon, josta kasveja voidaan kasvattaa suoraan ilman pitkiä soluviljelyvaiheita.

### 2.3 Siirtogeeniset kasvit tänään

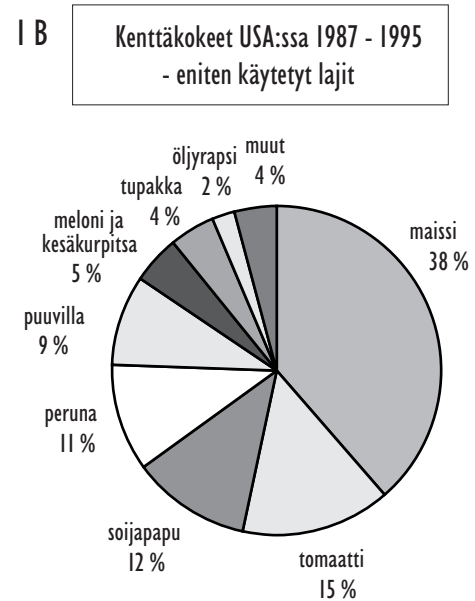
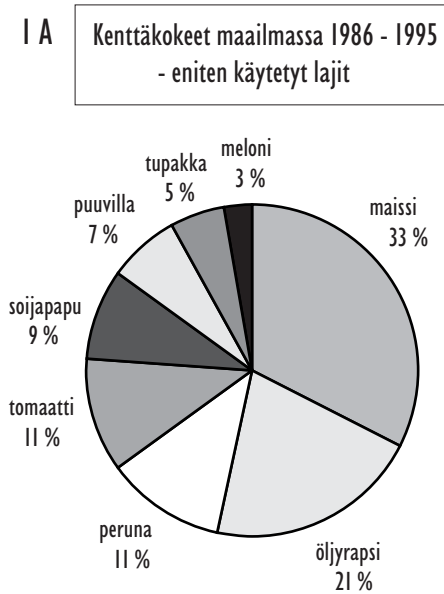
Vuosien 1986 ja 1995 välillä oli 34 maassa tehty yli 3500 kenttakoetta ainakin 56 eri siirtogeenisellä kasvilajilla (taulukko 1(s. 15); James ja Krattiger 1996). Eniten kenttäkokeita on tehty Pohjois-Amerikassa (67 %) ja EU:n alueella (22 %). Eri lähteistä kerätyt tiedot tehdyistä kenttäkokeista vaihtelevat, koska 'kenttäkoe' voidaan määritellä usealla eri tavalla. Jamesin ja Krattigerin (1996) raportissa kenttäkokeella tarkoitetaan tietylle lajille ja siihen siirretylle tietylle ominaisuudelle tietyntyyppinen vuonna haettua lupaa. Luvan perusteella kenttäkokeita voidaan tehdä useassa paikassa, mutta ne lasketaan yhdeksi kenttäkokeeksi. USA:sa on lisäksi vuodesta 1993 lähtien ollut käytössä niin sanottu ilmoitusmenettely kuudelle eniten testatulle kasvilajille (maissi, tomaatti, soijapapu, peruna, puuvilla ja tupakka). Näitä kasveja varten ei tarvitse erikseen anoa lupaa kenttäkokeiden suorittamiseksi, vaan koska näistä lajeista katsotaan olevan jo tarpeeksi taustatietoa, pelkkä ilmoitus asianomaiselle viranomaiselle riittää. Taulukkoon 1 on listattu maittain vuoden 1995 loppuun mennessä tehdyt kenttäkokeet Jamesin ja Krattigerin (1996) mukaan. USA:n kohdalle on merkitty sekä varsinaisen lupamenettelyn (628 kpl) että ilmoitusmenettelyn (1324 kpl) kautta hyväksytyt kenttäkokeet.

Geeninsiirto onnistuu nykyään kaikilla tärkeimmillä viljelykasveilla. Kuvassa 1A (s. 16) näkyvät kenttäkokeissa yleisimmin käytetyt lajit koko maailmassa (James ja Krattiger 1996), ja koska USA:ssa tehdään yli puolet kaikista kenttäkokeista, kuvassa 1B esitetään vertailun vuoksi yleisimmin käytetyt lajit USA:ssa (USDA—APHIS 1997). Kenttäkokeita on tehty eniten maissilla, tomaatilla, perunalla, soijapavulla, öljyrapsilla, puuvillalla, tupakalla, eri melonilajeilla ja sokerijuurikkaalla. Tämän lisäksi kenttäkokeita on tehty ainakin seuraavilla lajeilla: sinimailanen, vehnä, riisi, kurkku, auringonkukka, pellava, lehtisalaatti, lituruoho, maapähkinä, mansikka, omena, paprika, petunia, *Brassica* sp. (kaalit), ohra, poppeli, porkkana, saksanpähkinä, munakoiso, belladonna, luumu, papaija, tuomipihlaja, bataatti, *Chrysanthemum*, *Gladiolus*, *Pelargonium*, herne, karpalo, kastanja, kuusi, mänty, sikuri, sipuli, sokeriruoko, vadelma, viinirypäle, eukalyptus, sädelatva, kivi, koivu, parsa, pihlaja, apila, *Agrostis palustris*, lupiini, neilikka ja ambrapuu.

Taulukko 1. Kenttäkokeet maailmassa vuosina 1986—1995

	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	yht.
<b>POHJOIS-AMERIKA</b>											
Yhdysvallat	3	5	16	30	51	90	160	306	574	707	1952
Kanada	0	0	10	28	40	39	40	89	113	127	486
<b>yht.</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>26</b>	<b>58</b>	<b>91</b>	<b>129</b>	<b>200</b>	<b>395</b>	<b>697</b>	<b>834</b>	<b>2438</b>
<b>EUROOPPA</b>											
Ranska	2	5	9	14	26	31	22	29	53	62	253
Belgia	0	1	4	9	14	14	12	19	15	9	97
Iso-Britannia	0	1	1	4	11	13	13	11	29	50	133
Alankomaat	0	0	1	1	1	13	16	20	27	34	113
Suomi	0	0	1	1	2	0	3	1	2	0	10
Unkari	0	0	0	0	0	0	0	2	10	10	22
Espanja	0	0	2	4	5	0	0	3	11	5	30
Ruotsi	0	0	0	1	1	1	2	3	3	7	18
Tanska	0	0	0	0	2	1	3	4	5	1	16
Saksa	0	0	0	0	1	1	1	3	11	32	49
Italia	0	0	0	1	1	0	1	7	20	39	69
Portugali	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	5
Sveitsi	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Norja	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<b>yht.</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>18</b>	<b>35</b>	<b>64</b>	<b>75</b>	<b>75</b>	<b>104</b>	<b>188</b>	<b>250</b>	<b>818</b>
<b>KESKI- JA ETELÄ-AMERIKA</b>											
Argentiina	0	0	0	0	0	4	9	13	18	34	78
Belize	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	5
Bolivia	0	0	0	0	0	3	1	0	1	1	6
Chile	0	1	0	0	0	0	4	7	6	21	39
Costa Rica	0	0	0	0	0	1	4	0	2	10	17
Kuuba	0	0	0	0	1	1	2	4	5	5	18
Guatemala	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	3
Meksiko	0	0	2	0	0	0	4	11	8	13	38
<b>yht.</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>41</b>	<b>85</b>	<b>204</b>
<b>AASIA</b>											
Australia	0	0	0	0	0	1	6	7	17	15	46
Japani	0	0	0	0	0	2	0	4	8	11	25
Uusi-Seelanti	0	0	4	4	3	1	1	1	1	0	15
Kiina	0	0	0	2	2	2	5	9	10	30	60
Thaimaa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Venäjä	0	0	0	0	0	0	0	0	2	9	11
<b>yht.</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>21</b>	<b>39</b>	<b>66</b>	<b>159</b>
<b>AFRIKKA</b>											
Egypti	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
Etelä-Afrikka	0	0	0	0	1	1	1	6	5	8	22
Zimbabwe	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<b>yht.</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>25</b>
<b>koko maailma</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>162</b>	<b>221</b>	<b>316</b>	<b>562</b>	<b>971</b>	<b>1247</b>	<b>3647</b>
teollisuusmaat	5	12	48	97	158	208	282	509	901	1100	3320
kehitysmaat ja Itä-Eurooppa	0	1	2	3	4	13	34	53	70	147	327

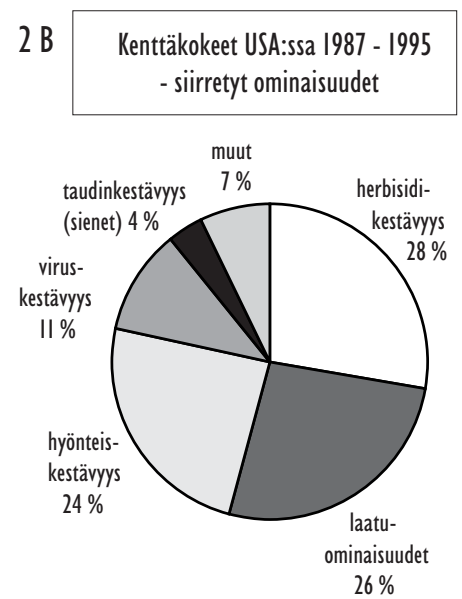
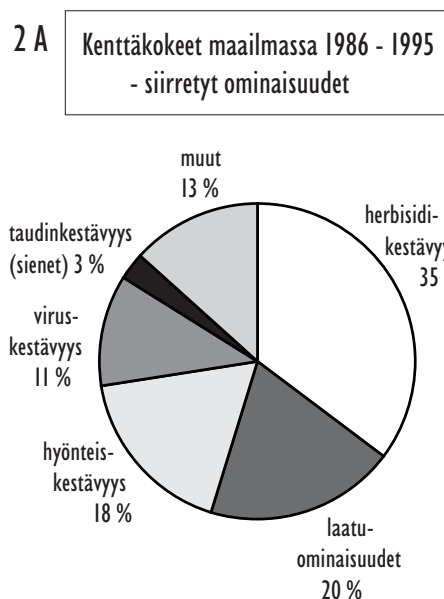
Kuva 1. Kenttäkokeissa yleisimmin käytetyt lajit koko maailmassa (1A) ja USA:ssa (1B). (Huom! Kuvaan 1A on merkitty vain kahdeksan yleisimmin käytettyä lajia. Muita kenttäkokeissa käytettyjä lajeja ei ollut erikseen listattu Jamesin ja Krattigerin (1996) raportissa, josta tiedot on otettu.)



Yleisimmin siirrettyjä ominaisuuksia ovat olleet herbisidikestävyys sekä virus- ja hyönteiskestävyys. Tulevaisuudessa keskityttäneen entistä enemmän niin sanottuihin laatuominaisuuksiin (esimerkiksi satona kerättävien kasvinosien hiilihydraatti-, aminohappo- tai rasvahappokoostumuksen parantamiseen) sekä muun muassa lääkeaineiden ja erilaisten teollisuudessa käytettävien entsyymien tuottamiseen kasveissa. Kuvaan 2A on merkitty yleisimmin siirretyt ominaisuudet koko maailmassa (James ja Krattiger 1996) ja kuvaan 2B erikseen USA:ssa (USDA—APHIS 1997).

Ensimmäiset siirtogeeniset kasvit (viruksia kestävä tupakka ja myöhemmin viruksia kestävä tomaatti) hyväksyttiin kaupalliseen tuotantoon Kiinassa 1990-luvun alussa. USA:ssa tuli vuonna 1994 markkinoille hitaasti kypsävä Flavr Savr™-tomaatti. Taulukkoon 2 on listattu USA:ssa markkinoilla olevat siirtogeeniset kas-

Kuva 2. Kasveihin yleisimmin siirretyt ominaisuudet koko maailmassa (2A) ja USA:ssa (2B).





vit. Euroopan Unionin alueella on kaupalliseen käyttöön tähän mennessä hyväksytty bromoksiniilia kestävä tupakka (SEITA), glufosinaattia kestävä öljyrapsi (Plant Genetic Systems), glyfosaattia kestävä soijapapu (Monsanto), glufosinaattia kestävä koirassteriili sikuri (Bejo-Zaden BV) sekä hyönteis- ja glufosinaatti-kestävä maissi (Ciba-Geigy).

Taulukko 2. Kaupalliseen tuotantoon hyväksytyt siirtogeeniset kasvit USA:ssa.

tuote	tuotenimi	tuottaja	siirretty ominaisuus	hyväksymisvuosi
tomaatti	<i>Flavr Savr™</i>	Calgene	hidas kypsyminen	1994
puuvilla	<i>Bollgard™</i>	Monsanto	hyönteiskestävyys (Bt-toksiini; Lepidoptera)	1995
puuvilla	<i>Roundup Ready™</i>	Monsanto	herbisidikestävyys (glyfosaatti)	1995
puuvilla	<i>BXN Cotton™</i>	Calgene	herbisidikestävyys (bromoksiniili)	1995
soijapapu	<i>Roundup Ready™</i>	Monsanto	herbisidikestävyys (glyfosaatti)	1995
maissi	<i>Maximizer™</i>	Ciba-Geigy	hyönteiskestävyys (Bt-toksiini)	1995
öljyrapsi	<i>Laurical™</i>	Calgene	muutettu öljykoostumus (korkea lauriinihappopitoisuus)	1995
peruna	<i>New Leaf™</i>	Monsanto	hyönteiskestävyys (Bt-toksiini)	1995
kesäkurpitsa	<i>Freedom II™</i>	Asgrow	viruskestävyys	1995
tomaatti	<i>Endless Summer™</i>	DNA Plant Technology	hidas kypsyminen	1995
tomaatti		Monsanto	hidas kypsyminen	1995
tomaatti		Zeneca/ Peto Seed	paksumpi kuori, muutettu pektiinikoostumus	1995
maissi		DeKalb	herbisidikestävyys (glufosinaatti)	1996
maissi	<i>Liberty Link™</i>	AgrEvo	herbisidikestävyys (glufosinaatti)	1996
maissi		PGS	koirassteriliteetti + herbisidikestävyys	1996
maissi		Monsanto	hyönteiskestävyys (Bt-toksiini; Lepidoptera)	1996
maissi		Northrup King	hyönteiskestävyys (Bt-toksiini; maissikoisa)	1996
puuvilla		Dupont	herbisidikestävyys (sulfonyyliurea)	1996
tomaatti		Agritope	kypsymisen säätely	1996
peruna		Monsanto	hyönteiskestävyys (Bt-toksiini, koloradok.)	1996
papaija		Cornell Univ.	viruskestävyys (PRSV)	1997
soijapapu		AgrEvo	herbisidikestävyys (glufosinaatti)	1997

Maailmalla tehtävistä kenttäkokeista on mahdollista saada ajankohtaista tietoa internetistä muun muassa APHIS:n (*Animal and Plant Health Inspection Service, USA*) ja OECD:n (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) kotisivuilta. APHIS:n sivuilta löytyy päivitettävä tietokanta USA:ssa tehtävistä kenttäkokeista ja lisäksi tietoa muun muassa ilmoituksista, lupamenettelystä ja säännöksistä (<http://www.aphis.usda.gov:80/bbep/bp/>). OECD pitää yllä vastaavaa tietokantaa jäsenmaissaan tehtävistä kenttäkokeista (<http://www.olis.oecd.org/biotrack.nsf>).

# 3

## Geenien siirto kasviin

Geenien siirtämiseksi kasviin on kehitetty useita tehokkaita menetelmiä. Vieraiden geenien toimimista kasvisolussa voidaan tutkia siirtämällä soluun merkkigeeni ja tarkastelemalla geenin niin sanottua **lyhytaikaista ilmentymistä** (*transient expression*). Vieras geeni saattaa ilmentyä kasvisolussa, vaikka se ei olisikaan pysyvästi kiinnittynyt kasvigenomiin. Esimerkiksi kromogeenista merkkigeeniä, joka kasvisolussa ekspressoituessaan saa aikaan värin muodostumisen ja on näin osoituksena geenin toimimisesta, sanotaan **reportterigeeniksi**.  $\beta$ -glukuronidaasia (GUS) koodittava geeni on yksi yleisimmistä käytetyistä reportterigeeneistä. Testiliuoksessa solut, joihin on siirretty  $\beta$ -glukuronidaasigeeni, värjäytyvät sinisiksi. Lyhytaikaisen ilmentymisen avulla voidaan siten todeta geenin siirtyminen kasvisoluun. Reportterigeenien avulla voidaan myös tarkastella geenien ja niiden säätelyalueiden (esimerkiksi promoottoreiden) toimintaa kasvisolussa.

Varsinaisesta geneettisestä transformaatiosta puhutaan silloin, kun vieras geeni saadaan siirrettyä **pysyväksi osaksi kasvisolun genomia** ja näistä soluista saadaan kasvatettua (regeneroitua) uusia kasveja, jotka sisältävät siirretyn geenin kaikissa soluissaan. Geeninsiirrossa käytetään yleensä niin sanottuja **selektiomarkkereita eli merkkigeenejä**, jotka antavat siirtogeenisille soluille kyvyn kasvaa tietyllä alustalla. Tällaisia merkkigeenejä ovat esimerkiksi erilaiset antibioottiresistenssi- eli antibiootikestävyysgeenit. Solut, joihin on siirretty kestävyysgeeni, kasvavat antibioottia sisältävällä alustalla. Vastaavasti solut, joilla kestävyysgeeniä ei ole, kuolevat. Näistä antibioottia kestävästä ja siten siirtogeenisistä soluista kasvatetaan uusia kasveja. Geenin kiinnittyminen kasvigenomiin varmistetaan DNA-tasolla.

Perustana siirtogeenisten kasvien tuottamiselle on tiettyjen kasvisolujen **totipotenssi** eli jo erilaistuneiden solujen kyky muuttua erilaistumattomiksi, jakaantua ja uudelleen erilaistua mihin tahansa suuntaan ja jopa muodostaa kokonaisia uusia kasveja. *In vitro* -kasvatusmenetelmät mahdollistavat kasvisolujen geenitekniikan muuntamisen ja siirtogeenisten kasvien tuotannon. Kasvisoluja voidaan eristää, ja niihin yksittäisiin, eristettyihin soluihin voidaan siirtää DNA:ta. Siirtogeenisistä soluista ja solukoista voidaan edelleen kasvattaa kokonaisia kasveja, jotka sisältävät uuden geneettisen informaation. Joillakin lajeilla (esimerkiksi tupakka ja porkkana) *in vitro* -kasvatus voidaan aloittaa lähes mistä tahansa kasvinosasta. Yleensä kuitenkin käytetään nuoria ja kasvuvaiheessa olevia osia. Yksisirkkaisilla käyttö rajoittuu lähinnä kasvusolukoihin (meristeemeihin) ja muihin erilaistumattomiin kasvinosiin.

Kun kasvia haavoitetaan, vaurioitusalueelle syntyy **kallusolukkoa**. Kallusolut ovat erilaistumattomia, nopeasti jakaantuvia soluja, jotka erilaistuvat myöhemmin ja korvaavat haavoitusalueella tuhoutuneet solut. Tätä haavakallusta käytetään hyväksi perustettaessa *in vitro* -solukasvatuksia. Yksisirkkaisilla kasveilla vaurioittaminen ei saa aikaan kalluksen muodostumista, minkä vuoksi *in vitro* -kasvatus niillä on hankalaa.

Kasvien *in vitro* -kasvatuksessa uudet versot kasvavat joko suoraan vanhasta solukosta (**suora organogeneesi**) tai solukosta muodostuneesta kalluksesta (**epäsuora organogeneesi**). Säätämällä kasvihormonien eli kasvunsäätäjien (auksiinien ja sytokiniinien) määriä kasvatusalustassa solukko saadaan muodostamaan versoja tai juuria. Jos auksiinin määrä sytokiniiniin verrattuna on pieni, syntyy

versoja. Jos taas auksiinin suhde sytokiniiniin on suuri, muodostuu juuria. Pitämällä hormonien määrät keskenään yhtä suurina saadaan aikaan kalluksen muodostuminen. Suora organogeneesi on menetelmänä parempi kuin epäsuora, koska kallussolukossa saattaa solujen jakaantuessa ja kasvatusaikojen pidentyessä tapahtua niin sanottua somaklonaalista muuntelua esimerkiksi kallussolukon soluissa tapahtuvien mutaatioiden vuoksi. Tällöin samasta kalluksesta kasvaneet versot eivät olekaan geneettisesti identtisiä.

Joskus somaattisista (kasvullisista) kasvisoluista voidaan saada muodostumaan alkioita, ja näistä saadaan kasvatettua kokonaisia kasveja. Tätä sanotaan **somaattiseksi embryogeneesiksi**. Embryogeneesi tapahtuu yleensä kalluksen kautta, mutta se voi tapahtua myös suoraan somaattisesta kasvisolukosta. Auksiinin avulla saadaan aikaan alkioiden eli embryoidien muodostuminen ja pidetään yllä solujen jakaantumista. Kun auksiini poistetaan kasvatusalustasta, alkiot alkavat kehittyä ja lopulta itävät. Esimerkiksi riisillä uusia kasveja saadaan kasvatettua somaattisen embryogeneesin kautta (Abdullah ym. 1986). Vehnä (Vasil ym. 1992) ja maissi (Fromm ym. 1990) on saatu pysyvästi transformoitua siirtämällä DNA:ta suoraan embryogeeniseen kallussoluksoon. Somaattista embryogeneesiä käytetään myös hyväksi kloonattaessa havupuita (Gupta ym. 1993). Näitä embryoviljelmiä voidaan säilyttää pakastettuna nestemäisessä työssä, jolloin saadaan talteen erilaisia genotyyppisiä. Kenttäkokeiden jälkeen sopivat genotyypit voidaan valikoida.

Kallusviljelmää voidaan pitää yllä sellaisenaan puolikiinteällä alustalla, tai siitä voidaan perustaa liuoskasvatuksia. Liuoskasvatukset ja niiden kautta eristetyt protoplastit ovat tärkeitä etenkin siirrettäessä geenejä yksisirkkaisiin kasveihin, koska kaksisirkkaisilla käytetty agrobakteerimenetelmä ei niillä yleensä toimi. Soluseinän puuttuminen protoplasteilta helpottaa aineiden (esimerkiksi vieraan DNA:n) pääsemistä kasvisolun sisään.

### 3.1 Geeninsiirto agrobakteerin avulla

*Agrobacterium tumefaciens* on maassa elävä gram-negatiivinen bakteeri, joka aiheuttaa aitosyöpätautia (*crown gall disease*) kaksisirkkaisilla kasveilla. Se saa aikaan kasvisolujen muuttumisen kasvainsoluiksi ja äkämän muodostumisen haavoitusalueelle. *A. rhizogenes* aiheuttaa vastaavasti karvajuuritaudin (*hairy root disease*) infektoimalla kasvin juuren, joka alkaa haaroittua voimakkaasti.

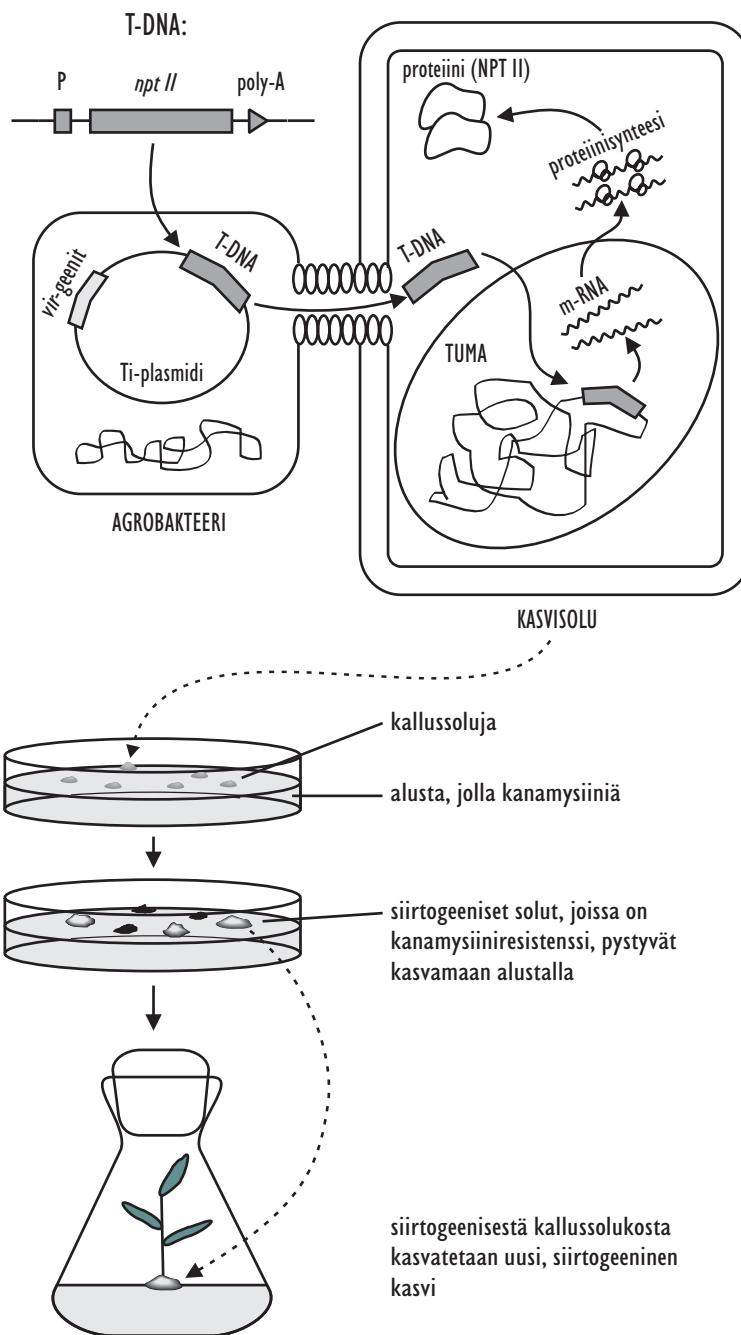
Bakteerit sisältävät kromosomaalisen DNA:n lisäksi itsenäisesti lisääntyviä rengasmaisia DNA-molekyylejä, plasmideja. *A. tumefaciens*in Ti-plasmidi (*tumor inducing*) saa aikaan kasvaimen muodostumisen infektiokohdassa. Infektiossa pieni pala Ti-plasmidin DNA:ta (T-DNA; *transferred DNA*) siirtyy osaksi kasvigenomia. T-DNA:ta rajoittavat niin sanotut reuna-alueet, joita tarvitaan T-DNA:n siirrossa kasvisoluun. Periaatteessa kaikki reuna-alueiden välillä oleva DNA siirtyy kasvisoluun — agrobakteeri on siis luonnon oma geeninsiirtäjä. Tätä ominaisuutta voidaan käyttää hyväksi siirrettäessä vieraita geenejä kasviin eli transformoitaessa kasveja (kuva 3.).

T-DNA sisältää geenejä, jotka koodittavat kasvihormonien (auksiini ja sytokiniini) synteesiä. Kun T-DNA siirtyy osaksi kasvigenomia, kasvisolu alkaa tuottaa ylimäärin näitä hormoneja ja muuttuu kasvainsoluksi. T-DNA koodittaa myös entsyymejä, jotka saavat kasvisolussa aikaan eräänlaisten aminohappojohdannaisen, opiinien, synteesin. Kasvisolut eivät voi käyttää opiineja aineenvaihduntaansa, mutta bakteerit voivat. Agrobakteeri valjastaa täten kasvisolun aineenvaihduntakoneiston tuottamaan aineita, joita vain se itse voi käyttää aineenvaihduntaansa.

Kasvisolukon täytyy olla vaurioitunut, jotta agrobakteeri voi aiheuttaa infektion. Vaurioituneet solut erittävät fenoliyhdisteitä, jotka saavat aikaan Ti-plasmidissa sijaitsevien *vir*-geenien induktion. *Vir*-geenit saavat aikaan T-DNA:n irtoamisen Ti-plasmidista ja sen siirtymisen kasvisoluun.

Geenien siirtoon agrobakteerista kasviin tarvitaan siis kaksi Ti-plasmidin aluetta: *vir*-alue, jossa sijaitsevat geenit T-DNA:n siirtoa varten, sekä itse T-DNA ja sen reuna-alueet. T-DNA ei sisällä geeninsiirtoon tarvittavia geenejä, joten tällä alueella sijaitsevia geenejä voidaan poistaa ilman, että se vaikuttaa T-DNA:n siirtymiseen. Käsittelemätöntä, luonnonvaraista Ti-plasmidia ei voida käyttää vieraiden geenien siirtämiseksi kasviin, koska normaalien kasvien kasvattaminen siirtogeenisistä soluista ei onnistu T-DNA:n sisältämien kasvaingeenien vuoksi. Nämä geenit (onkogeinit) voidaan kuitenkin poistaa, jolloin siirtogeenisistä soluista saa-

Kuva 3. Geenin siirtäminen kasvisoluun agrobakteerin avulla. A. tumefaciensin T-DNA-alueelta on poistettu kasvaingeenit ja niiden tilalle on siirretty kanamysiinikestävyyden aikaansaava *npt II*-geeni. Ti-plasmidissa sijaitsevat *vir*-geenit auttavat T-DNA:ta irtoamaan plasmidista ja siirtymään kasvisoluun. T-DNA kiinnittyy osaksi kasvigenomia ja alkaa ilmentää *npt II*-geeniä eli tuottaa neomysiini-fosfo-transferaasia (NPT II), joka saa aikaan kasvisolun kanamysiinikestävyyden. Siirtogeeniset solut löydetään kanamysiiniä sisältävällä alustalla ja valitaan jatkokasvatuksiin.



daan kasvamaan normaaleja kasveja. Kaikki T-DNA:ssa sijaitsevat geenit voidaan haluttaessa poistaa ja niiden tilalle voidaan lisätä vierasta DNA:ta, joka siten saadaan siirrettyä kasvisoluun ja osaksi kasvin omaa genomia.

*Agrobacterium rhizogenes* siirtää kasvisoluun osan Ri-plasmidiaan (*root inducing*) ja saa aikaan juurten voimakkaan haaroittumisen. Näistä juurista voidaan suoraan kasvattaa uusia kokonaisia kasveja, eikä kallusvaihetta tarvita. *A. rhizogenes*in transformoima kasvimateriaali on helppo tunnistaa versoistakin: lehdet ovat ryppyisiä, nivelvälit lyhyitä ja kukat normaalista poikkeavia. Siirtogeenisten kasvien juuret kasvavat nopeasti ja niistä voidaan perustaa juurikasvatuksia, joita voidaan käyttää esimerkiksi sekundaaristen aineenvaihduntatuotteiden tuotantoon.

Geenejä on agrobakteerin avulla siirretty sekä protoplasteihin että kasvisolukkuun ja onpa agrobakteerilla infektoitu suoraan lituruohon (*Arabidopsis thaliana*) siemeniäkin (Feldmann ja Marks 1987). Kaksisirkkaisilla käytetään yleisesti niin sanottua lehtikiekkomenetelmää tai sen muunnoksia, jossa kasvin lehdestä tai muusta solukosta leikattua palaa inkuboidaan agrobakteerin kanssa muutaman päivän ajan, minkä jälkeen agrobakteerin kasvu pysäytetään esimerkiksi karbenisilliinillä. Lehtikiekot siirretään alustalle, jossa on tiettyä antibioottia ja joka saa aikaan kalluksen tai suoraan verson muodostumisen soluista, joihin on siirretty kestävyys kyseistä antibioottia vastaan. Antibioottia kestävästä ja siten siirtogeenin sisältävästä soluista kasvatetaan sitten kokonaisia siirtogeenisiä kasveja.

Geeninsiirto agrobakteerin avulla on tehokasta niillä lajeilla, joilla se toimii. Moniin lajeihin, varsinkin yksisirkkaisiin, ei kuitenkaan voida siirtää geenejä agrobakteerin avulla. Transformaatio tapahtuu vain haavoittuneessa kasvisolukossa ja sen täytyy tapahtua silloin kun vauriokohdan solut alkavat jakaantua. Yksisirkkaiset kasvit eivät yleensä muodosta vauriokohtaan kallussolukkoa, vaan solut vauriokohdan ympäriltä kuolevat, jolloin geeninsiirrolle sopivia soluja ei ole. Myös kaksisirkkaisilla on huomattavia eroja transformatioherkkydessä lajien välillä ja lajien sisälläkin.

## 3.2 Suora geeninsiirto

### 3.2.1 DNA:n siirto protoplasteihin

Koska agrobakteerimenetelmä ei toimi kaikilla kasveilla, on kehitetty erilaisia menetelmiä DNA:n siirtämiseksi suoraan kasvisoluihin. Protoplastit ovat kasvisoluja, joiden soluseinä on poistettu. DNA:n siirtymistä protoplasteihin voidaan helpottaa esimerkiksi käyttämällä erilaisia kemikaaleja, elektroporaatiota tai sonikaatiota. Protoplasteihin on siirretty geenejä myös agrobakteerimenetelmän sekä muun muassa mikroinjektion avulla. DNA siirretään yleensä osana plasmidivektoria. Protoplasteja on käytetty lähinnä geenien lyhytaikaisen ilmentymisen tutkimiseen, mutta lajeilla, joilla uusien kasvien kasvattaminen protoplasteista onnistuu, on saatu aikaan pysyvästi siirtogeenisiä kasveja.

#### PEG

Aikaisemmin protoplasteja transformoitaessa käytettiin poly-L-ornitiinia. Nykyisin yleisimmin käytetty kemikaali on polyetyleeniglykoli (PEG), jota usein käytetään  $Mg^{2+}$ :n tai  $Ca^{2+}$ :n kanssa. PEG lisää solukalvon läpäisevyyttä ja helpottaa siten DNA:n ottoa soluun. PEG:ia on käytetty myös somaattisten hybridien tuotannossa. PEG-menetelmän avulla on muun muassa onnistuttu siirtämään geenejä tupakan kloroplasteihin (Golds ym. 1993).

## Elektroporaatio

Elektroporaatiossa protoplasteille annetaan lyhytaikainen voimakas sähköshokki, joka hetkeksi avaa huokosia protoplastien solukalvossa helpottaen pienten molekyylien pääsyä solun sisään. DNA:ta voidaan elektroporaation avulla siirtää myös suoraan kasvisoluihin, joissa soluseinä on jäljellä, mutta siirtyminen on protoplasteilla 20—50 kertaa tehokkaampaa (Lindsey ja Jones 1990). Soluseinän osittainenkin hajottaminen pektinaasin avulla helpottaa geeninsiirtoa huomattavasti.

Fromm ym. (1986) siirsivät elektroporaation avulla kanamysiinikestävyyden maissin protoplasteihin, ja Toriyama ym. (1988) onnistuivat samoin siirtämään kanamysiinikestävyyden riisin protoplasteihin ja kasvattamaan näistä soluista siirtogeenisiä kasveja.

## Sonikaatio (ultraäänimenetelmä)

DNA:ta voidaan siirtää protoplasteihin sonikaation avulla eli antamalla protoplasteille lyhyt ultraäänikäsittely. Geeninsiirtoa voidaan tehostaa käyttämällä lisäksi esimerkiksi dimetyylisulfoksidia (DMSO).

## Mikroinjektio

Mikroinjektioita on aikaisemmin käytetty lähinnä eläinsoluilla, mutta nykyään tekniikkaa käytetään myös kasvisoluilla ja etenkin protoplasteilla (Neuhaus ja Spangenberg 1990). Tässä menetelmässä DNA:ta siirretään mikroskooppiä käyttäen mikrokapillaarilla suoraan soluun. Protoplastit pitää ensin saada liikkumattomiksi upottamalla ne esimerkiksi agarosiin tai natriumalginaattiin, tai niitä voidaan pitää paikallaan toisen kapillaarin avulla. Tämän jälkeen DNA siirretään mikrokapillaarilla yhteen protoplastiin kerrallaan. Soluihin voidaan samalla ruiskuttaa esimerkiksi fluoresoivaa väriä, jonka avulla siirtogeeniset protoplastit voidaan tunnistaa.

Mikroinjektio on menetelmänä hyvin tarkka, koska geeninsiirtoa voidaan koko ajan tarkkailla mikroskoopin avulla. Se ei myöskään vahingoita soluja. Geenit voidaan ohjata tiettyihin soluihin, ja jos kustakin protoplastista perustetaan oma linja, soluihin ei välttämättä tarvitse siirtää merkkigenejä, jolloin voidaan hypätä valikoivan kasvatusvaiheen yli. Menetelmä ei rajoitu tiettyihin lajeihin kuten agrobakteerimenetelmä. Mikroinjektion käyttö geeninsiirrossa on kuitenkin työlästä ja aikaa vievää, koska jokainen protoplasti täytyy käsitellä erikseen. Eläinsoluilla mikroinjektioita käytetään rutiininomaisesti, mutta kasvisoluilla menetelmää ollaan vasta kehittäneissä. Mikroinjektion avulla on jo kuitenkin siirretty geenejä esimerkiksi rapsiin (Neuhaus ym. 1987).

## Liposomit

Liposomit ovat keinotekoisia yksinkertaisesta fosfolipidikalvosta muodostuneita rakkuloita. Niiden sisään voidaan sulkea DNA:ta tai RNA:ta (Caboche 1990). Samalla ne suojaavat nukleiinihappoja nukleaasien hajotukselta. Yhtyessään protoplastin solukalvoon ne vapauttavat sisältönsä soluun. Liposomien avulla protoplasteihin voidaan tehokkaasti siirtää esimerkiksi virus-RNA:ta. Menetelmä sopii hyvin lyhytaikaisen ilmentymisen tutkimiseen ja on tehokkuudeltaan verrattavissa PEG-menetelmään, mutta ei ole yhtä tehokas kuin elektroporaatio DNA:n siirrossa. Tupakka on saatu pysyvästi transformoitua liposomien avulla, mutta menetelmä ei sovellu tähän tarkoitukseen kovin hyvin. Geenin sitoutumista kasvi-genomiin ei voida kontrolloida ja usein genomissa tapahtuukin uudelleenjärjestäytymistä. Siirrettävän DNA:n koko on myös rajallinen (5—10 kb).

## Piikarbidikuidut

Kaeppler ym. (1990) siirsivät GUS-reportterigeenin maissin ja tupakan soluihin ravistelemalla niitä voimakkaasti liuoksessa, joka sisälsi plasmidi-DNA:ta ja piikarbidikuituja. Piikarbidikuidut toimivat eräänlaisina injektioneuloina, joitka lävistävät soluseinän ja joita pitkin DNA saadaan kulkeutumaan solun sisään. GUS-aktiivisuus saatiin ilmentymään soluissa, ja käsiteltyjä soluja mikroskoopilla tarkasteltaessa nähtiin, että käsittely ei ollut vahingoittanut niitä.

## Transposonit

Transposonit ovat DNA-jaksoja, jotka voivat irrota ja siirtyä genomissa paikasta toiseen. Niitä on käytetty myös geeninsiirron apuna (Lebel ym. 1995). Maissin Ac/Ds -systemiin kuuluu kaksi elementtiä. Näistä Ac (*activator*) koodittaa transposasientsyymiä, joka saa aikaan DNA:n irtoamisen ja siirtymisen paikasta toiseen. Se voi siirtyä itse tai auttaa muiden jaksojen (Ds, *dissociation*) siirtymistä. Kun siirrettävä geeni liitetään plasmidissa olevan Ds-elementin päissä olevien toistuvien jaksojen väliin ja aktivaattori (Ac) lisätään toisessa plasmidissa, geeni saadaan siirtymään osaksi kasvigenomaa. Lebel ym. (1995) tutkivat maissin Ac/Ds -systemin sopivuutta geeninsiirtoihin siirtämällä merkkigeenejä tupakan ja lituruohon protoplasteihin. Useimmat geenit siirtyivät kasvigenomiin yhtenä kopiona. Monissa menetelmissä huonona puolena on siirrettävän geenin koon rajallisuus, mutta transposonien avulla voidaan siirtää pitkiäkin DNA-jaksoja.

## Agrobakteeri

Geenejä voidaan siirtää protoplasteihin myös agrobakteerimenetelmän avulla. Protoplasteja käytetään lähinnä vain silloin, kun geenejä ei voida siirtää suoraan kasvisolukkoon (lehtikielkoihin tai muihin kasvinosiin).

### 3.2.2 DNA:n siirto suoraan kasvisolukkoon

Protoplastien eristäminen on hankalaa, sillä eristämisolosuhteet on optimoitava jokaiselle kasvilajille ja jopa kasvinosalle erikseen. Proroplastien elinkyky myös usein heikkenee jatkokasvatuksen aikana, ja kalluksen ja uusien kokonaisten kasvien kasvatusta on hankalaa. Suorien DNA-siirtomenetelmien tavoitteena onkin ollut päästä eroon protoplastien eristys- ja kasvatusvaiheesta.

## Partikkelipommitus

Klein ym. (1987) sekä Christou ym. (1988) kehittivät niin sanotun mikroammus- eli partikkelipommitusmenetelmän, jossa DNA:lla tai RNA:lla päällystettyjä pieniä (yleensä läpimitaltaan 0.4—2.0 µm) volframi- tai kultapartikkeleita ammutaan suoraan kasvisolukkoon. Kleinin ym. (1987) alkuperäisessä tutkimuksessa tupakan mosaiikkiviruksen RNA:ta ammuttiin sipulin epidermisolukkoon ja mikroskoopilla tarkasteltaessa havaittiin viruspartikkeleiden muodostuminen soluissa. Sittemmin partikkelipommituksen avulla on geenejä siirretty muun muassa maissiin, riisiin, vehnään ja soijapapuun. Geeninsiirron kohteena voidaan käyttää lähes mitä kasvisolukkoa tahansa, esimerkiksi embryogeenista solususpensiota (maissi; Fromm ym. 1990) tai meristeesolukkoa (soijapapu; McCabe ym. 1988), joista on sitten mahdollista kasvattaa kokonaisia kasveja. Partikkelipommitus näyttää myös olevan ainoa keino siirrettäessä geenejä kloroplasteihin ja mitokondrioihin. Vuonna 1988 onnistuttiin geeninsiirrossa *Chlamydomonas reinhardtii* -viherlevän klorop-

lastiin (Boynton ym. 1988) sekä hiivasolun mitokondrioon (Johnston ym. 1988). Myöhemmin Svab ym. (1990) siirsivät tupakan kloroplastiin antibioottikestävyyserkkigeenin.

Partikkelipommitus on menetelmänä melko yksinkertainen ja nopea, DNA:ta tarvitaan vähän eikä erityisiä vektorisysteemejä tarvita. DNA:ta voidaan siirtää lähes mihin tahansa solukkaan ja mikroammukset tunkeutuvat alempiinkin solukerroksiin. Etenkin havupuuden kohdalla partikkelipommitus on osoittautunut toimivaksi menetelmäksi (Ellis ym. 1993, Walter ym. 1994). Ongelmana voi olla siirtogeenisten kasvien mosaiikkimainen luonne, jolloin osa kasveista sisältää siirretyn geenin ja osa ei, koska DNA-ammukset osuvat satunnaisesti kasvisolukon yksittäisiin soluihin. Käyttämällä sopivia merkkigeenejä siirtogeeniset solut voidaan kuitenkin löytää ja niistä voidaan kasvattaa pysyvästi siirtogeenisiä jälkeläisiä. Geeni kiinnittyy myös usein kromosomiin useana kopiona ja geenien uudelleenjärjestäytymistä voi tapahtua.

### **Mikroinjektio**

Mikroinjektion avulla DNA:ta voidaan siirtää kasvisoluun myös soluseinän läpi. Tällä menetelmällä on siirretty muun muassa kanamysiinikestävyys rapsin siitepölyn emoluista muodostuneisiin proembryoihin (Neuhaus ym. 1987). Myös eri viljakasvien tsygoottisia proembryoita on yritetty transformoida (Potrykus 1990). Gaillard ym. (1992) kokeilivat keltaisen väriaineen avulla mikroinjektiota maissin siitepölyhiukkasiin. Väri saatiinkin leviämään tasaisesti siitepölyhiukkaseen sisällä, jos sen uloin seinäkerros ei ollut vielä ehtinyt kokonaan muodostua.

### **Makroinjektio**

De la Peña ym. (1987) siirsivät kanamysiinikestävyyden rukiiseen niin sanotun makroinjektion avulla. Kestävyysgeenin sisältävä plasmidi ruiskutettiin injektioneulalla rukiin varteen nuoren kukinnan alapuolelle. Tutkimusryhmä oli todennut, että tietyssä kehitysvaiheessa siitepölyn emoluut ovat herkkiä kolkisiini- ja kofeiinikäsittelyille. He olettivat, että tässä vaiheessa solut voisivat ottaa sisäänsä myös muita aineita, esimerkiksi DNA:ta. Plasmidiliuksen oletettiin kulkeutuvan johtojänteitä pitkin kukintoon ja siirtyvän siitepölyn emoluuihin ja solusta toiseen soluseinässä olevien huokosten, plasmodesmien kautta.

Käsitteltyt kasvit kasvatettiin täysikokoisiksi ja pölytettiin keskenään. Siemenet kerättiin ja idätettiin kanamysiiniä sisältävällä alustalla. Muutamia siirtogeenisiä yksilöitä saatiin kasvatettua. Tätä koetta ei kuitenkaan ole saatu toistettua, joten sen soveltuvuus geeninsiirtoon on kyseenalainen.

### **Elektroporaatio**

Elektroporaatiota käytetään rutiinimenetelmänä geeninsiirrossa protoplasteihin. Kokonaisia soluja käytettäessäkin se helpottaa DNA:n siirtymistä jonkin verran, mutta on huomattavasti tehottomampaa kuin protoplasteilla. Soluseinä rajoittaa myös siirrettävän DNA:n kokoa. Säättämällä olosuhteet tarkasti Lindsey ja Jones (1990) saivat kuitenkin CAT-reportterigeenin ilmentymään sokerijuurikkaan soluviljelmässä. He arvelivat soluseinän pektiinin estävän DNA:n siirtoa, ja soluseinän käsittely pektinaasilla lisäsi CAT:n lyhytaikaista ilmentymistä soluisa. Dekeyser ym. (1990) siirsivät elektroporaation avulla GUS-reportterigeenin riisin lehtikannan solukkaan ja myös muihin yksisirkkaisiin (vehnä, maissi ja ohra).



## Liposomit

Liposomeja on käytetty siirrettäessä DNA:ta protoplasteihin, jolloin ne yhtyvät suoraan protoplastin solukalvoon ja vapauttavat sisältönsä (DNA:n) sytoplasmaan. Soluseinä estää suoran kontaktin solukalvon kanssa. Soluseinäessä on kuitenkin huokosia, plasmodesmeja, joiden kautta vierekkäisten solujen solukalvot ovat yhteydessä toisiinsa. On ajateltu, että liposomit voisivat kulkeutua näiden plasmodesmien läpi. Myös siitepölyn soluseinäessä on huokosia, ja liposomien onkin havaittu kulkeutuvan siitepölyyn ja yhtyvän sen solukalvon kanssa. Liposomien avulla on DNA:ta siirretty myös kallussolukkuon.

Lucas ym. (1990) siirsivät tulikärpäsen lusiferaasigeenin tupakan, maissin, porkkanan ja riisin soluihin injektoimalla liposomeja kasvisolun vakuoliin. Yhtyessään vakuolin kalvoon, tonoplastiin, liposomi vapauttaa sisältönsä sytoplasmaan. Mikroinjektion onnistumista seurattiin väriaineen avulla, joka vapautuikin sytoplasmaan, mutta lusiferaasigeenin ilmentymistä ei näissä kokeissa havaittu.

## Muita menetelmiä

DNA:n siirtymistä kasvisoluun on yritetty helpottaa tekemällä mikrolasersäteellä väliaikaisia aukkoja kasvisolun seinään ja solukalvoon (Weber ym. 1990). DNA on paineen avulla siirretty soluun näiden aukkojen kautta pitämällä soluja hypertonisessa puskuriliuoksessa. DNA:n siirtyminen soluihin voidaan varmistaa leimaimalla sitä fluoresoivalla väriaineella tai tarkastelemalla reportterigeenin lyhytaikaista ilmentymistä. Lasersäde voidaan myös kohdistaa esimerkiksi pelkästään kloroplastiin kasvisolun sisällä.

Kypsymättömiä siitepölyhiukkasia voidaan eristää heteistä ja niitä voidaan kasvattaa *in vitro*. Siitepölyyn on kypsymisen aikana muun muassa siirretty GUS-reportterigeeni kasvattamalla sitä agrobakteerin kanssa (Alwen ym. 1990). Geenin siirtäminen siitepölyyn agrobakteerimenetelmän avulla ei kuitenkaan useinkaan onnistu, sillä siitepölyhiukkasen seinämissä on nukleaaseja, joiden tehtävänä on luultavasti muun muassa estää vieraan DNA:n pääsy soluun. Partikkeli-pommitus toimii tässä paremmin, ja sen avulla on geenejä siirretty muun muassa kuusen ja männyn siitepölyyn (Häggman ym. 1997).

Siitepölyhiukkasen itäessä emin luotilla siitä kasvaa siiteputki alkiorakkoon. Luo ja Wu (1989) siirsivät DNA:ta suoraan riisin emin vartaloon katkaistuaan ensin luotin ja oletivat DNA:n siirtyvän alkiorakkoon siiteputken kautta. Transformaation onnistumista ei kuitenkaan ole luotettavasti todistettu.

DNA:ta on myös yritetty siirtää vilja- ja hernekasvien eristettyihin alkioihin imeyttämällä niihin kanamysiinikestävyyden sisältävää plasmidiliuosta (Töpfer ym. 1989). Menetelmän arvellaan soveltuvan lyhytaikaisen ilmentymisen tutkimiseen.

## 3.3 Geeninsiirto muunnettujen kasvivirusien avulla

Useimpien kasvivirusien genomi koostuu RNA:sta, mikä tekee niiden käytön geeninsiirrossa hankalaksi. Kaulimovirusten ryhmään kuuluvan kukkakaalin mosaikkiviruksen (CaMV) genomi on kuitenkin DNA:ta. CaMV:n genomissa on kahdeksan geeniä. Kaksi näistä voidaan korvata vieraalla DNA:lla, joka saadaan siten siirrettyä kasvisoluun ja viruksen lisääntymiskoneiston avulla myös ilmentymään siellä. Toisaalta RNA-virusten genomistakin voidaan tuottaa cDNA-kopio, joka on infektiokykyinen, ainakin käytettäessä CaMV:n 35S-promoottoria.

Virusinfektio voi levitä systeemisesti koko kasviin, mutta siirtogeeni ei periydy, koska se ei kiinnity osaksi kasvigenomia. Tämän vuoksi viruksia ei voida käyttää siirtogeenisten kasvien tuotantoon. Niiden avulla voidaan kuitenkin tuottaa suuria määriä (vieraita) proteiineja kasvisoluissa. Tupakan mosaiikkivirus (TMV) infektoi kasveja tehokkaasti ja tuottaa suuria määriä viruspartikkeleita infektion jälkeen. Turpen ym. (1995) lisäsivät TMV:n kuoriproteiinigeeniin lyhyen, kuutta aminohappoa koodittavan DNA-jakson, joka toimii malariainfektiossa niin sanottuna epitooppina eli antigeenijaksona, jonka vasta-aine tunnistaa. Kun tupakka infektoidaan tällä viruksella, infektio leviää systeemisesti koko kasviin ja muunnettua viruspartikkeleita, jotka sisältävät tämän rokotteenomaisen DNA-jakson, tuotetaan suuria määriä. Virusten avulla voitaisiin siis tuottaa helposti ja verrattain halvalla rokotteita. TMV:n kuoriproteiiniin liitettävä DNA-jakso ei kuitenkaan voi olla kovin pitkä, mikä rajoittaa mahdollisuuksia tuottaa proteiineja kasvisoluissa. Santa Cruz ym. (1996) liittivät perunan X-viruksen (PVX) kuoriproteiiniin GFP-merkkigeenin (*green fluorescent protein*), jolloin infektion leviämistä kasvissa voitiin seurata fluoresenssin avulla. Liitetty GFP oli kooltaan yhtä suuri kuin itse kuoriproteiini. Infektio levisi systeemisesti koko kasviin, joskin tavallista hitaammin. Tämän kokeen perusteella voidaan kuitenkin olettaa, että suurempiakin proteiineja voidaan tuottaa virusten avulla kasvisoluissa. Myös muita merkkigeenejä on onnistuneesti liitetty PVX:n kuoriproteiiniin (Santa Cruz ym. 1996).

## Geeninsiirtovektorit

### 4.1 Agrobakteerin Ti-plasmidivektorit

Agrobakteerin Ti-plasmidin geeninsiirtomekanismia on käytetty hyväksi rakennettaessa vektoreita, joiden avulla vierasta DNA:ta voidaan siirtää kasviin.

Infektoidessaan kasvin agrobakteeri siirtää kasvisoluun osan Ti (tai Ri) -plasmidiaan, T-DNA:n. T-DNA:n reuna-alueet ovat välttämättömät geeninsiirrolle, T-DNA-alueella sijaitsevat geenit sen sijaan eivät. Siirtoon tarvitaan lisäksi muualla plasmidissa sijaitsevia *vir*-geenejä. Näiden ei kuitenkaan tarvitse olla samassa plasmidissa siirrettävän T-DNA:n kanssa. T-DNA-alueella normaalisti sijaitsevien geenien tilalle voidaan siirtää haluttuja vieraita geenejä, jotka sitten siirtyvät kasvisoluun.

Vektoreiden suunnittelussa täytyy ottaa huomioon kolme asiaa. Ensinnäkin T-DNA-alueella täytyy olla katkaisupaikkoja sopiville restriktioentsyymeille. Tämä mahdollistaa vieraiden geenien liittämisen T-DNA-alueelle. Toiseksi T-DNA:han täytyy sijoittaa kasvissa ilmentyvä merkkigeeni, jotta siirtogeeniset kasvisolut voidaan myöhemmin valikoida. Kolmanneksi plasmidissa on oltava bakteerissa ilmentyvä merkkigeeni, jotta bakteerit (sekä *E. coli* että *Agrobacterium*), joissa on siirrettävän geenin sisältävä plasmidivektori, voidaan valita. Agrobakteerin Ti-plasmidiin pohjautuvia geeninsiirtovektoreita on kahta tyyppiä: (1) integroituva välimuotoinen vektori sekä (2) binaarinen vektori. Nykyään geeninsiirroissa käytetään lähes yksinomaan binaarisia vektoreita.

#### 4.1.1 Integroituvat välimuotoiset vektorit

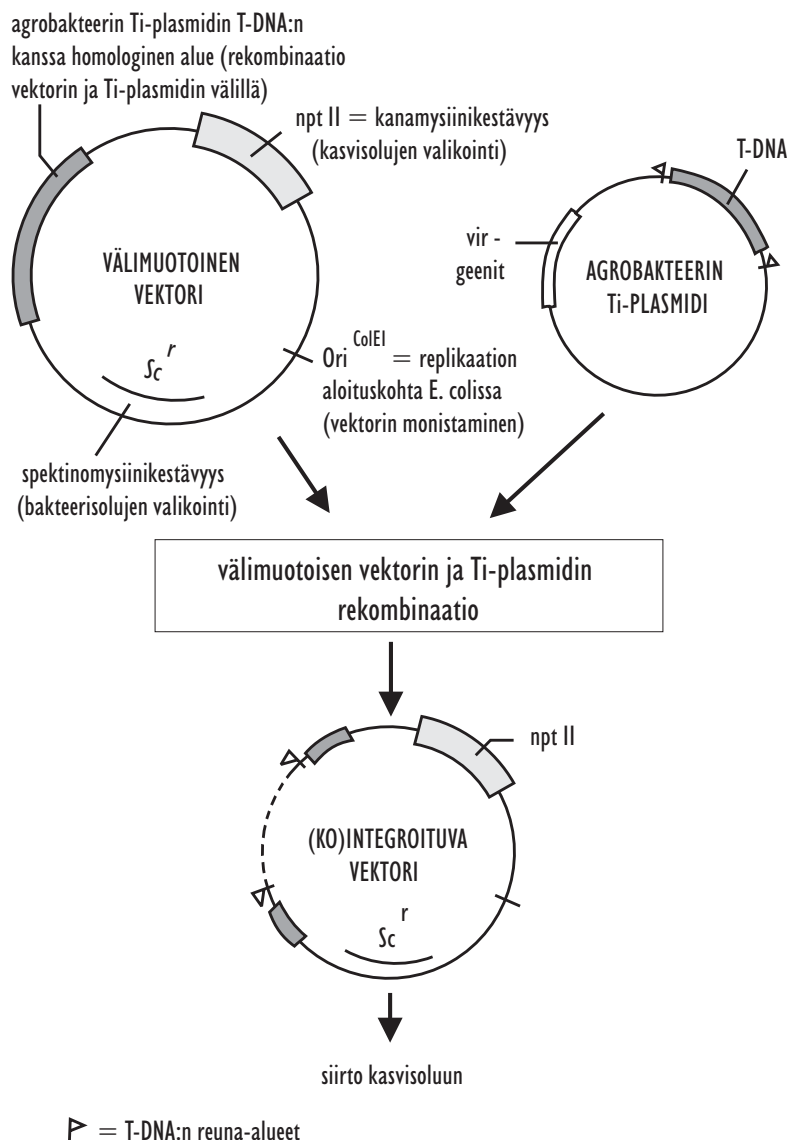
Tässä menetelmässä rakennetaan ensin välimuotoinen vektori, johon liitetään siirrettävä geeni sekä muut tarvittavat alueet (kuva 4.). Vektoria monistetaan *Escherichia coli* -bakteerissa, minkä jälkeen se siirretään agrobakteeriin, jossa se kiinnittyy osaksi Ti-plasmidia, plasmidin T-DNA-alueelle. Ti-plasmidin siirtomekanismin avulla geeni saadaan siirrettyä kasvisoluun.

Siirrettävää geeniä kloonataan eli monistetaan välimuotoisen vektorin avulla *E. coli* -bakteerissa. Vieras geeni liitetään plasmidiin paikalle, jossa on katkaisukohtat sopiville restriktioentsyymeille. Plasmidissa on replikaation aloituskohta, jonka avulla se voi lisääntyä *E. colissa* mutta ei agrobakteerissa. Tällöin plasmidi lisääntyessään monistaa samalla vierasta geeniä.

Välimuotoinen vektori siirretään agrobakteeriin usein niin sanotun triparentaalisen konjugaation kautta, jolloin siirtymiseen tarvittavat geenit sijaitsevat toisessa *E. coli* -kannassa niin sanotussa auttajaplasmidissa. Agrobakteerisolut, joihin vektori on siirtynyt, valitaan antibiootikestävyyden avulla. Välimuotoisessa vektorissa on jokin antibiootikestävyydsgeeni (esimerkiksi spektinomysiini- tai tetrasykliinikestävyys), joka ilmentyy vain bakteereissa. Vain agrobakteerit, joihin vektori on siirtynyt, pystyvät kasvamaan antibioottia sisältävällä alustalla.

Kun plasmidi on siirtynyt agrobakteeriin, se kiinnittyy osaksi bakteerin Ti-plasmidia homologisen rekombinaation avulla. Välimuotoisessa vektorissa on DNA-jakso, joka vastaa jaksoa agrobakteerin Ti-plasmidin T-DNA:ssa, eli on ho-

Kuva 4. Integroituva välimuotoinen vektori. Välimuotoista vektoria, joka sisältää merkkigeenit sekä bakteerissa että kasvisoluissa tapahtuvaa valikointia varten (ja tämän lisäksi mahdollisesti varsinaisen siirrettävän geenin), monistetaan *E. colissa*. Välimuotoinen vektori siirretään agrobakteeriin, missä se rekombinoituu agrobakteerin Ti-plasmidin kanssa, ja halutut geenit siirtyvät T-DNA-alueelle. Ti-plasmidissa ovat myös T-DNA:n siirtymiseen tarvittavat vir-geenit. Syntyy (ko)integroituva vektori, joka siirretään edelleen kasvisoluun, ja T-DNA-alueella sijaitsevat geenit siirtyvät osaksi kasvigenomaa.

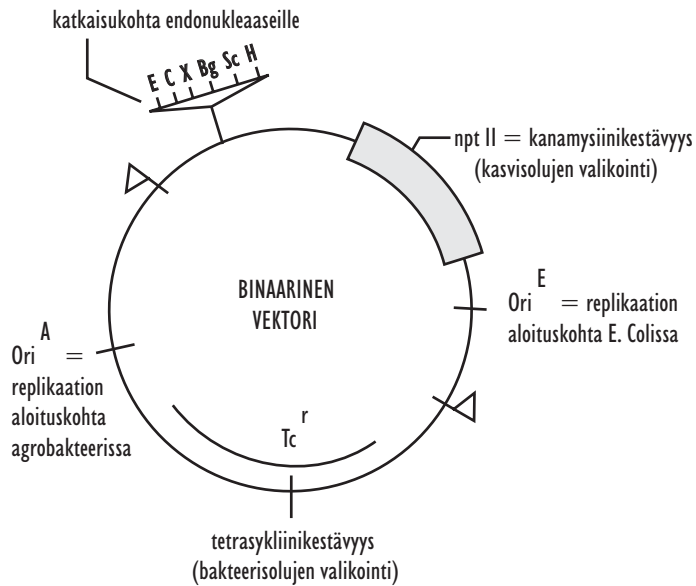


mologinen sen kanssa. Välimuotoinen vektori kiinnittyy Ti-plasmidiin tämän jakson kohdalle. Näin vieras geeni saadaan liitettyä osaksi agrobakteerin Ti-plasmidia, jolloin se on valmis siirrettäväksi kasvisoluun. Alkuperäiseen vektoriin on (vieraan geenin lisäksi) kloonattu kasvissa ilmestyvä merkkigeeni (esimerkiksi antibiootti- tai herbisidikestävyys), joka siirtyy kasvisoluun Ti-plasmidin T-DNA:n mukana ja jonka avulla siirtogeeniset kasvisolut voidaan valita.

#### 4.1.2 Binaariset vektorit

Binaariset vektorit eroavat välimuotoisista vektoreista siinä, että niiden ei tarvitse kiinnittyä Ti-plasmidiin siirtyäkseen kasvisoluun.

Binaarinen vektori pystyy lisääntymään sekä *E. colissa* että agrobakteerissa. Siinä ovat merkkigeenit sekä bakteeri- että kasvisolujen valikointia varten. Binaarisessa vektorissa ovat valmiina T-DNA:n reuna-alueet, ja niiden välissä ovat katkaisupaikat restriktioentsyymeille, jotta siirrettävä geeni voidaan kloonata T-DNA-alueelle (kuva 5.). Binaarinen vektori ei missään vaiheessa kiinnity agrobakteerin Ti-plasmidiin, vaan sisältää itse siirtyvän T-DNA-alueen. T-DNA:n siirtymiseen tarvitaan lisäksi *vir*-geenejä, mutta ne saavat aikaan siirtymisen, vaikka sijaitsivat eri plasmidissa — tässä tapauksessa agrobakteerin alkuperäisessä Ti-plasmidissa.



Kuva 5. Binaarinen vektori. Binaarinen vektori sisältää sekä kasvi- että bakteerisolujen valikointiin tarvittavat geenit, itse siirrettävän geenin sekä geenien siirtymiseen tarvittavat T-DNA:n reuna-alueet. Se pystyy lisääntymään sekä E. colissa että agrobakteerissa eikä sen tarvitse kiinnittyä Ti-plasmidiin voidakseen siirtyä kasvisoluun. T-DNA:n irtoamiseen tarvittavat vir-geenit voivat sijaita erillisessä plasmidissa.

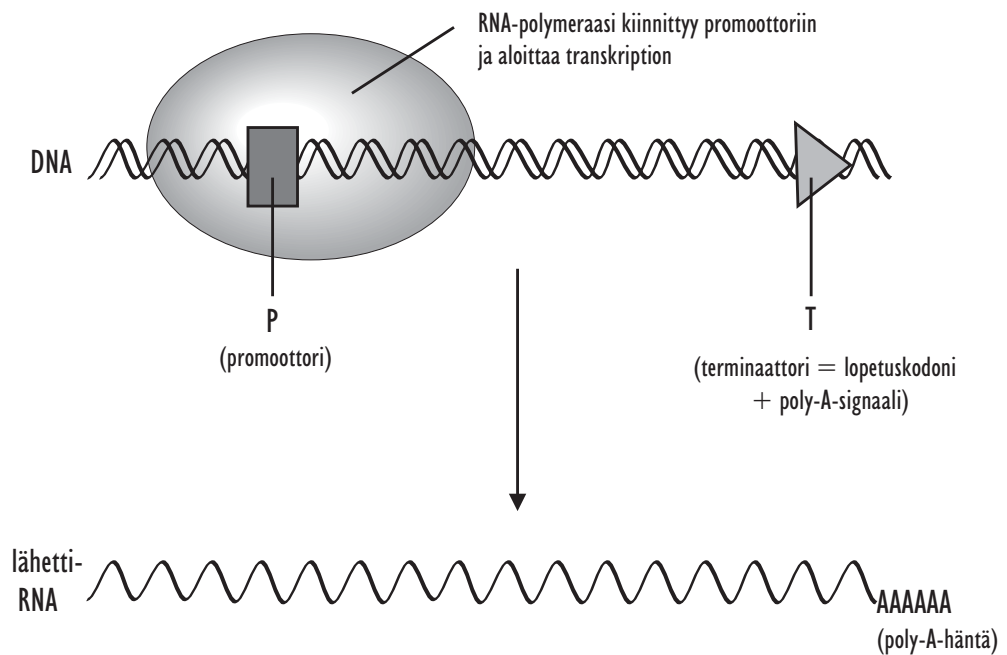
## 4.2 Suorassa geeninsirrossa käytettävät vektorit

Myös suorassa geeninsirrossa käytetään yleensä plasmidivektoreita. Plasmidiin on liitetty merkkigeeni säätelyalueineen. Näiden vektoreiden rakentaminen on yksinkertaisempaa kuin agrobakteerivektoreiden, koska Ti-plasmidin geeninsirto mekanismeja ei tarvita.

## 4.3 Geenien ilmentymiseen tarvittavat säätelyalueet

Jotta vieras geeni ilmentyisi solussa, siihen täytyy liittää mukaan tarvittavat säätelyalueet (kuva 6.). RNA-polymeraasi on entsyymi, joka transkriptiovaiheessa valmistaa geenistä lähetti-RNA:n alkuperäisen DNA-mallin mukaan. RNA-polymeraasi vaatii transkription aloitusta varten tunnistuskohdan, jota sanotaan **promoottoriksi**. Promoottori sijaitsee yleensä ennen geeniä samassa DNA-juosteessa sen kanssa. Kiinnittyttyään promoottorialueelle RNA-polymeraasi liikkuu pitkin DNA-juostetta, kunnes kohtaa lopetussignaalin. Lähetti-RNA:n loppupäähän geenin perään lisätään yleensä niin sanottu poly(A)-häntä eli jakso peräkkäisiä adenosiniemäksiä, joiden oletetaan osallistuvan lähetti-RNA:n kuljetukseen tumasta sytoplasmaan, missä lopullinen proteiinisynteesi tapahtuu. Jotta vieras geeni saataisiin ilmentymään kasvisolussa, geenin perään täytyy siis liittää toinen DNA-jakso, **terminaattori**, joka sisältää lopetuskodonin lisäksi poly(A)-signaalin. Geenien ilmentymiseen vaikuttaa lisäksi joukko DNA:han sitoutuvia proteiineja, jotka kooditetaan muualla genomissa ja jotka tehostavat transkriptiota. Näitä proteiineja ja niiden toimintaa ei vielä paljonkaan tunneta, mutta on havaittu, että joidenkin geenien intronit (alueet geenin sisällä, jotka eivät koodita osaa proteiinista ja joita ei siten transloida) toimivat tällaisina transkription tehostajina, ja niitä on liitetty siirrettäviin geneihin osana promoottoria (Somers ym. 1992, Kyozyuka ym. 1993).

Kuva 6. Geenin ilmentymiseen tarvittavat säätelyalueet. Promoottori (P) on ennen geeniä samassa DNA-juosteessa sijaitseva kohta, jonka RNA-polymeraasi tunnistaa aloittaessaan transkription. Transkriptio jatkuu terminaattoriin (T) saakka, joka sisältää lopetuskodonin lisäksi poly(A)-signaalin.



### 4.3.1 Promoottorit

Vieraan geenin oma promoottori ei välttämättä toimi toiseen soluun siirrettäessä. Prokaryoottien promoottorit eroavat eukaryoottipromoottoreista, jolloin siirrettäessä bakteerigeeni (esimerkiksi bakteerin koodittama neomysiinifosfotransferaasigeeni, joka saa aikaan kanamysiinikestävyyden) kasvisoluun bakteerigeenin oma promoottori ei saa aikaan geenin ilmentymistä. Tällöin täytyy löytää promoottori, joka toimii kasvisolussa.

#### Konstitutiiviset eli jatkuvatoimiset promoottorit

Geeninsiirroissa käytetään yleisimmin kukkakaalin mosaiikkiviruksen (CaMV) 35S-promoottoria, joka ohjaa CaMV:n koko genomien pituisen RNA:n ilmentymistä. Tämä virus infektoi normaalisti *Brassicaceae*-heimon kasveja. Promoottorin on havaittu toimivan myös monissa muissa kaksisirkkaisissa kasveissa ja kasviin siirrettynä se saa aikaan voimakkaan ilmentymisen lähes kaikissa soluissa (Benfey ja Chua 1990). Toinen kaksisirkkaisilla usein käytetty promoottori on agrobakteerin Ti-plasmidin nopaliinisyntetaasigeenin (*nos*) promoottori, joka myös saa aikaan geenin ilmentymisen kaikissa soluissa. Se ei kuitenkaan ole yhtä tehokas kuin CaMV:n 35S-promoottori.

CaMV:n 35S-promoottori ei toimi kovinkaan hyvin yksisirkkaisilla kasveilla. Sen on havaittu aiheuttavan solukkospesifisyyttä eli siirrettävät geenit ilmentyvät vain tietyissä soluissa (esimerkiksi johtojänteiden ympärillä riisillä; Terada ja Shimamoto 1990). Myös maissin alkoholidehydrogenaasigeenin (*Adh1*) promoottoria on kokeiltu riisillä (Kyozuka ym. 1991), mutta se toimii lähinnä vain hapettomissa oloissa. Somers ym. (1992) käyttivät kuitenkin *Adh1*-promoottoria yksin tai yhdessä CaMV:n 35S-promoottorin kanssa siirtäessään genejä kauraan ja saivat aikaan tehokkaan ilmentymisen. Riisin aktiinigeenin (*Act1*) promoottorin on todettu toimivan tehokkaasti kaikissa soluissa ainakin siirtogeenisellä riisillä (Zhang ym. 1991). Aktiini on proteiini, joka muodostaa osan kasvisolun sisäistä tukiranka- ja sytoskeletonia. Tämän vuoksi sen voisi ajatella toimivan kaikissa soluissa ja soluissa. Ohran (Wan ja Lemaux 1994) ja vehnän (Weeks ym. 1993) geeninsiirroissa on käytetty maissin ubikitiinigeenin (*Ubi1*) promoottoria, joka myös saa aikaan geenin konstitutiivisen ilmentymisen.

## Indusoituvat promoottorit

CaMV:n 35S-promoottori saa aikaan konstitutiivisen ekspresion eli vieras geeni ilmentyy jatkuvasti kaikissa soluissa ja solukoissa. Tämän lisäksi on olemassa niin sanottuja indusoituvia promoottoreita, jotka toimivat vain tietyssä solukossa tai kehitysvaiheessa. Promoottorin toiminnan voivat myös saada aikaan eli indusoida kasvihormonit tai kemikaalit tai jopa ympäröivät fysikaaliset olosuhteet.

Esimerkkinä **solukko- ja kehitysvaihespesifisestä** ilmentymisestä voidaan mainita Marianin ym. (1990, 1992) käyttämä TA29-promoottori, joka saa aikaan geenin ilmentymisen siitepölyn muodostumisvaiheessa ponneksen lokeron seinämän niin sanotussa tapetum-kerroksessa. Kun tämän promoottorin alaisuudessa kasviin siirretään ribonukleaasigeeni, se tuhoaa tapetum-solukon ja estää siitepölyn muodostumisen ja saa siten aikaan koirassteriliteetin. Promoottori on samalla sekä solukko- että kehitysvaihespesifinen, koska tapetum-solukkoa tarvitaan vain tietyssä siitepölyn kehitysvaiheessa. Naarasteriliteetti on vastaavasti saatu aikaan käyttämällä ribonukleaasigeenin kanssa promoottoria, joka toimii vain emiinin luotissa solukossa (Goldman ym. 1994). Tällöin luotille joutuva siitepöly kyllä itää, mutta ei pääse tunkeutumaan emiinin vartaloon ja sitä kautta sikiäimeen, jolloin hedelmöitystä ei tapahdu. Oakes ym. (1991) käyttivät patatiinigeenin promoottoria saadakseen siirtogeenin ilmentymään perunan mukulassa. Tomaatin E8-promoottori aktivoituu tomaatin hedelmän kypsymisen alkaessa (Peñarrubia ym. 1992). *Vicia faba* legumiini B4 -promoottori saa puolestaan aikaan geenin ilmentymisen siemenessä (Saalbach ym. 1995).

Rubisco-entsyymien pientä alayksikköä koodittava *RbcS*-geeni aktivoituu valossa. *RbcS*-geenin promoottori saa aikaan geenin ilmentymisen lehden mesofyllisolukossa, mutta ei lehden epidermissä, johtojänteissä tai juurissa (Lam ja Chua 1990). Promoottori on siis sekä **valoindusoituva** että solukkospesifinen. Kyojuka ym. (1993) testasivat tomaatin (kaksisirkkainen) ja riisin (yksisirkkainen) *RbcS*-promoottorin toimintaa riisillä ja totesivat, että riisin oma promoottori toimii sillä tehokkaammin. Yksi- ja kaksisirkkaisten *RbcS*-promoottorit eroavat toisistaan jonkin verran ja onkin arveltu, että yksi- ja kaksisirkkaiset kasvit säätelevät geenin ilmentymistä eri tavalla. Tämänkin vuoksi oikean promoottorin valinta on tärkeää geeninsiirron onnistumisen kannalta.

Siirtäessään hyönteiskestävyuden aiheuttavan geenin tupakkaan Williams ym. (1992) käyttivät promoottoria, joka aktivoituu **kemiallisen** induktion avulla. Kasveihin siirretyn *Bacillus thuringiensis* -toksiinin pelättä saavan aikaan resistenttejä hyönteiskantoja silloin, kun siirretty geeni ilmentyy jatkuvasti kasveissa ja aiheuttaa suuren valintapaineen hyönteispopulaatioissa. PR-1 (*pathogenesis related*) on geeni, joka aktivoituu erilaisten **taudinaiheuttajien** ja **kemikaalien** (esimerkiksi salisyyli- tai polyakryylihappon) vaikutuksesta. PR-1-promoottorin avulla toksiinigeenin aktivoituminen saatiin aikaan halutulla hetkellä altistamalla kasvit tietyille kemikaalille.

Ueda ym. (1996) käyttivät lituruohon HSP81-1-geenin (*heat shock protein*) promoottoria, joka aktivoituu **lämpöshokin** vaikutuksesta ja toimii kaikissa solukoissa. ABA ja etyleeni ovat niin sanottuja stressihormoneja, joiden avulla indusoituvia promoottoreita on myös käytetty.

### 4.3.2 Terminaattorit

Terminaattoriksi kutsutaan geenin jäljessä sijaitsevaa DNA-jaksoa, joka sisältää lopetuskodonin ja poly(A)-signaalin. Terminaattorina voitaneen periaatteessa käyttää minkä tahansa geenin poly(A)-signaalia, mutta yleisimmin on käytetty agrobakteerin nopaliinisyntetaasigeenin (*nos*) terminaattorialuetta.

## 4.4 Merkkigeenit

Merkkigeenejä tarvitaan, kun halutaan varmistaa geenin siirtyminen soluun ja sen ilmentyminen siellä. Aikaisemmin merkkigeeneinä käytettiin luonnollisia mutatioita, jotka saivat aikaan esimerkiksi morfologisia muutoksia kasvilla tai muutoksia entsyymien toiminnassa ja biokemiallisissa reaktioissa. Kun kasvisoluun opittiin siirtämään kokonaisia geenejä, merkkigeeneinä on voitu käyttää eri organismeista peräisin olevia valmiita geenejä. Jotta siirtogeeniset solut voidaan valikoida, merkkigeenin täytyy olla sellainen, että sitä ei esiinny luonnostaan solussa, johon se siirretään. Tämän vuoksi useat merkkigeenit ovatkin peräisin bakteereilta. Toisaalta geeni ei myöskään saa ilmentyä bakteerissa, jotta voidaan olla varmoja, että ilmentyminen tapahtuu kasvisolussa eikä esimerkiksi soluun jääneessä geeninsiirtoon käytetyssä agrobakteerissa. Tämän vuoksi geenien edellä käytetään yleensä eukaryoottisia promoottoreita. Varmistaakseen merkkigeenin ilmentymisen ainoastaan kasvisolussa Vancanneyt ym. (1990) siirsivät geenin keskelle intronin. Bakteerisolut eivät pysty poistamaan introneita, jolloin toimivaa geenituotetta syntyi ainoastaan kasvisoluissa.

### 4.4.1 Reportterigeenit

Reportterigeenejä käytetään yleensä silloin, kun halutaan tarkastella geenin siirtymistä soluun ja sen ilmentymistä siellä. Reportterigeenit koodittavat yleensä entsyymejä ja proteiineja, joiden toimiminen solussa voidaan havaita helposti esimerkiksi värireaktion avulla tai joiden määrä solussa voidaan tarkasti määrittää. Reportterigeenien avulla voidaan myös tutkia erilaisten promoottoreiden ja säätelysekvenssien toimintaa. Koska varsinaisen siirrettävän geenin toimimista kohdesolussa voi olla vaikea havaita, siihen liitetään usein saman promoottorin alaisuudessa toimiva reportterigeeni, joka on helpommin määritettävissä. Tällöin reportterigeenin ilmentyminen solussa on samalla merkinä varsinaisen siirrettävän geenin ilmentymisestä.

Yleisimmin käytetty reportterigeeni on *E. coli*-bakteerista eristetty  **$\beta$ -glukuronidaasia** (GUS) koodittava *uidA*-geeni (Jefferson 1989). Normaalisti tämä entsyymi toimii suolistossa hajottaen glukuronideja, joita syntyy maksassa ja muissa selkärankaisten elimissä.  $\beta$ -glukuronidaasin substraatteja ovat myös monet kromogeeniset eli väriä muodostavat glukuronidit, kuten X-GLUC (5-bromo-4-kloro-3-indolyyli- $\gamma$ -D-glukuronidi). Kun kasvisolua, joka sisältää GUS-reportterigeenin, käsitellään edellä mainitulla aineella, solun sytoplasmaan syntyy sinistä väriä. Värinmuodostuksen avulla voidaan todeta (fuusio)geenin siirtyminen soluihin ja sen ilmentyminen siellä. Myös *E. colista* eristettyä  **$\beta$ -galaktosidaasia** koodittavaa *lacZ*-geeniä on käytetty reportterigeeninä.  $\beta$ -galaktosidaasi toimii samalla periaattella kuin GUS, mutta tätä entsyymiä tuotetaan myös kasvisoluissa itsessään, jolloin siirrettyä  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuutta on hankala erottaa kasvin omasta entsyymiaktiivisuudesta (Teeri ym. 1989). Myös  $\beta$ -glukuronidaasiaktiivisuutta on huomattu esiintyvän kasvisoluissa jonkin verran, etenkin hedelmien ja siementen kypsymisen aikana (Hu ym. 1990), mikä tulee huomioida GUS-merkkigeeniä käytettäessä. Ongelmana on myös välituotteen leviäminen viereisiin, mahdollisesti ei-siirtogeenisiin soluihin. Kolmas *E. colista* eristetty reportterigeeni on **kloramfenikoliasetyylitransferaasia** (CAT) koodittava *cat*-geeni. CAT:n aktiivisuus voidaan määrittää kasvisolusta melko tarkasti, mutta ongelmana tässäkin menetelmässä on joillakin lajeilla esiintyvä sisäsyntyinen entsyymiaktiivisuus.

**Spektinomysiini** ja **spektromysiini** ovat antibiootteja, jotka estävät kloroplastien normaalin kehittymisen. Soluja, jotka eivät pysty yhteyttämään, voidaan kuitenkin kasvattaa alustalla, jossa on sakkaroosia. Toimivien kloroplastien puut-



tuessa ne eivät kuitenkaan muutu vihreiksi. Geenejä, jotka saavat aikaan kestävyden näitä antibiootteja vastaan, voidaan käyttää reportterigeeneinä, jolloin kestävyysgeenin sisältävät solut voidaan erottaa vihreän värinsä avulla. Kloroplasteja transformoitaessa on käytetty kloroplastin 16S rRNA:ta koodittavaa geeniä, jossa tapahtuneet pistemutaatiot ovat saaneet aikaan kestävyden näitä kah-ta antibioottia vastaan (Svab ym. 1990).

Bakteerista (*Vibrio harveyi*, Koncz ym. 1987) tai hyönteisestä (*Photinus pyralis*, Ow ym. 1986; *Pyrophorus plagiophthalmus*, Wood ym. 1989) peräisin olevia **lusife-raaseja** koodittavia geenejä voidaan myös käyttää reportterigeeneinä. Reagoides-saan ulkoisesti lisätyn substraattinsa, lusiferiinin, kanssa lusiferaasi tuottaa valoa ja tämä bioluminesenssi voidaan havaita kasvisolukossa, johon lusiferaasi on siir-retty. Bioluminesenssia voidaan mitata eristetyistä kasvisoluista tai kasvin paloista luminometrillä tai kokonaista kasveista ja kasvin paloista valottamalla röntgenfil-miä. Myös erityisiä kamerajärjestelmiä voidaan käyttää. Esimerkiksi Ow ym. (1986) siirsivät tupakkaan tulikärpäsen lusiferaasin ja mittasivat bioluminesenssia rönt-genfilmiltä kasteltuaan kasveja lusiferiinia sisältävällä liuoksella. Wood ym. (1989) eristivät *Pyrophorus plagiophthalmukselta* useita eri lusiferaasigeenejä, jotka kaikki lusiferiinin kanssa reagoidessaan tuottivat eri väristä valoa. Tässä tutkimuksessa geenejä siirrettiin *E. coliin*, mutta niitä voitaisiin tulevaisuudessa ajatella käytettä-vän myös kasveilla ja erityisesti silloin, kun halutaan yhtä aikaa siirtää monta re-portterigeeniä, jolloin kunkin geenin ilmentyminen voidaan havaita erikseen eri värisenä valona.

Bioluminesenssiin perustuu myös eräästä meduusajista (*Aequorea victoria*) eristetyyn niin sanotun **vihreän fluoresoivan proteiinin (GFP; green fluorescent pro-tein)** käyttö reportterina (Chalfie ym. 1994). Sinisessä tai ultraviolettivalossa tämä proteiini fluoresoi vihreänä, eikä valon tuotantoon tarvita lisättyä substraattia tai entsyymiä. Geenin ilmentyminen voidaan havaita suoraan kasvista uv-valon alla ilman monimutkaisia biokemiallisia analyysejä, jolloin siirtogeenisiä kasveja voi-taisiin tarkastella kenttäolosuhteissa ja jopa valvoa geenin mahdollista leviämistä luonnossa (Stewart 1996). Siirrettäessä *gfp*-geeni kasviin yhdessä muiden geenien kanssa siirtogeeniset kasvit löydetään helposti ilman valikoivia kasvatusvaiheita. GFP ei myöskään vaikuta siirtogeenisen kasvin kasvuun tai lisääntymiskykyyn. Yksittäisten aminohappojen muutoksilla saadaan GFP:sta muotoja, jotka fluoresoi-vat eri aallonpituuksilla, jolloin niitä voitaisiin käyttää useiden geenien yhtäaika-seen siirtämiseen (Prasher 1995).

**Antosyaanit** ovat kasvien yleisimpiä pigmenttiaineita. Geenejä, jotka koodit-tavat antosyaanien synteesiin osallistuvia entsyymejä tai joitakin geenien ilmen-tymiseen vaikuttavia säätelytekijöitä, voidaan käyttää merkkigeeneinä (Ludwig ym. 1990).

#### 4.4.2 Valikoinnissa käytettävät merkkigeenit (selektiomarkkerit)

Selektiomarkkereiksi sanotaan merkkigeenejä, joiden avulla siirtogeeniset kasvi(solu)t voidaan erotella kasveista (kasvisoluista), joissa geeniä ei ole. Tavalli-simmin käytetään antibiootti- tai herbisidikestävyysgeenejä, jolloin ainoastaan kasvit, joihin merkkigeeni on siirretty, voivat kasvaa kyseistä antibioottia tai her-bisidiä sisältävällä alustalla.

Yleisimmin käytetty **antibioottikestävyysgeeni** on *E. colista* eristetty kana-mysiinikestävyys aiheuttava neomysiinifosfotransferaasigeeni (*npt II*). Baktee-rit, jotka tuottavat antibiootteja, sisältävät myös geenejä, joiden avulla ne voivat itse suojautua antibiooteilta. Normaalisti kanamysiini tappaa solut estämällä pro-teiinisynteesin. Kun siirtogeenisiä kasvisoluja kasvatetaan kanamysiiniä tai neo-mysiiniä sisältävällä alustalla, NPTII inaktivoi antibiootin fosforyloimalla sen, jol-

loin geenin sisältävät kasvisolut pystyvät kasvamaan alustalla. Muita *E.colista* eristettyjä merkkigeenejä ovat muun muassa bleomysiini-, hygromysiini-, gentamiysiini- ja metotreksaattikestävyysgeenit. Kaikki toimivat samalla periaatteella tehden valikoivalla alustalla olevan antibiootin siirtogeenisille kasveille vaarattomaksi.

Monet yksisirkkaiset kasvit ovat luonnostaan vastustuskykyisiä kanamysiinille, jolloin niillä käytetään valikoivasti merkkigeeninä **herbisidikestävyyttä**. Tällaisia merkkigeenejä ovat muun muassa glyfosaatti-, fosfinotrisiini- ja klorosulfuronikestävyysgeenit. Esimerkiksi kaura on luonnostaan vastustuskykyinen kanamysiinille ja klorosulfuronille, joten merkkigeeninä on käytetty fosfinotrisiinikestävyysgeeninä saavaa geeniä (Somers ym. 1992).

### 4.4.3 Merkkigeenin poisto

Antibiootti- ja herbisidikestävyysgeenejä merkkigeeneinä käytettäessä on herännyt kysymys siitä, voivatko nämä geenit olla haitallisia ihmisille ja ympäristölle. Merkkigeenejä tarvitaan vain siirtogeenisten kasvien valikoivassa kasvatusvaiheessa, ja niitä siirretään kasviin yhdessä varsinaisen halutun ominaisuuden kanssa. Kanamysiinikestävyys on yleisimmin valikoivasti käytetty merkkigeeni, ja sen mahdollisia riskejä ihmiselle ja ympäristölle on selvitetty (esimerkiksi Flavell ym. 1992, Fuchs ym. 1993). Tutkimuksissa on todettu, että kanamysiinikestävyys ei vaaranna ihmisten terveyttä, ei voi siirtyä siirtogeenisestä kasvista ihmiseen eikä myöskään aiheuta haittaa mahdollisesti siirtyessään luonnossa kasvilajista toiseen. Toisaalta esimerkiksi herbisidikestävyysgeenin käyttö merkkigeeninä voi muodostua ongelmaksi, jos geenillä on mahdollisuus siirtyä lähisukuiseen rikkakasvilajiin. Samaa merkkigeeniä ei myöskään voida käyttää siirrettäessä useita ominaisuuksia peräkkäin samaan lajiin. Tämän vuoksi onkin kehitelty menetelmiä, joiden avulla merkkigeeni voidaan poistaa kasvista alkuperäisen valinnan jälkeen (Yoder ja Goldsbrough 1994).

**Kotransformaatio** merkkigeeni ja haluttu geeni siirretään kasviin kahdessa eri vektorissa. Jos geenit kiinnittyvät kasvigenomiin tarpeeksi kauas toisistaan, ne eroavat toisistaan solujakautumisessa, jolloin seuraavasta sukupolvesta voidaan valita kannat, joista merkkigeeni on hävinnyt ja joissa on vain haluttu geeni.

Merkkigeenejä voidaan poistaa myös **paikkaspesifisen rekombinaation**, esimerkiksi bakteriofagi P1:stä peräisin olevan *Cre-lox*-systeemin avulla (Dale ja Ow 1990, Russell ym. 1992). Merkkigeenin molemmiin puoliin tarvitaan tietyt DNA-jaksot (*lox*), jotka rekombinaasientsyymi (*Cre*) tunnistaa. Kun nämä DNA-jaksot rekombinoituvat keskenään, niiden välissä oleva DNA irtoaa tai kääntyy toisin päin, jolloin merkkigeeni ei ekspressoidu. Kasvigenomissa *lox*-alueiden välissä oleva geeni voidaan siis poistaa tai inaktivoida seuraavassa sukupolvessa (tai missä tahansa sukupolvessa alkuperäisen geeninsiirron jälkeen) siirtämällä samaan kasviin erikseen *Cre*-rekombinaasi tai risteyttämällä toisen linjan kanssa, joka sisältää rekombinaasientsyymien.

**Transposonit** ovat DNA-jaksoja, jotka voivat irrota ja siirtyä genomissa paikasta toiseen. DNA:n siirtymiseen tarvitaan käänteiset toistoalueet geenin molemmiin puoliin, sekä yleensä erillinen translokaasientsyymi, jota koodittava geeni voi olla toisessa kromosomissa. Jos merkkigeeni sijoitetaan toistoalueiden väliin, se voi siirtyä genomissa paikasta toiseen ja tarpeeksi kauas itse siirrettävästä geenistä, jotta nämä geenit solunjakautumisessa eroavat toisistaan ja merkkigeeni saadaan poistettua (Goldsbrough ym. 1993). Ebinuma ym. (1997) käyttivät merkkigeeninä agrobakteerin *ipt*-geeniä, joka koodittaa isopentenyyli transferaasia. Tämä entsyymi osallistuu sytokiniinien esiasteiden synteesiin ja saa siirtogeenisissä kasveissa aikaan apikaalidominanssin häviämisen, jolloin geenin sisältävät kasvit voi-

daan tunnistaa fenotyypin perusteella. Kun geeni liitettiin maissin *Ac*-transposonin yhteyteen, osa siirtogeenisistä kasveista menetti *ipt*-geenin valikoinnin jälkeen, minkä jälkeen kasvit kasvoivat normaalisti. Näin saadaan siis aikaan normaalisti kasvavia siirtogeenisiä kasveja, joista merkkigeeni on hävinnyt. Transposonien avulla voidaan myös tutkia, miten geenin sijoittuminen tiettyyn paikkaan genomissa vaikuttaa sen ilmentymiseen.

Geeni voidaan myös sijoittaa **solukko- tai kehitysvaihespesifisen promoottorin** alaisuuteen. Özcan ym. (1993) käyttivät promoottoria, joka aktivoituu vain haavoitusalueella. Tällöin geenin ilmentyminen havaitaan geeninsiirron alkuvaiheessa (ilmentyminen oli voimakasta neljän ensimmäisen vuorokauden ajan), jolloin alustava valinta voidaan tehdä. Täysi-ikäisissä kasveissa geeni ei enää ilmenty.

# 5

## Geneettinen ja fenotyyppinen stabiilisuus

Siirrettyjen geenien ilmentyminen ei aina ole pysyvää siirtogeenisissä kasveissa (mm. Finnegan ja McElroy 1994; Matzke ja Matzke 1995). Ilmentymisen tehokkuus riippuu usein kasviin siirtyneiden geenikopioiden määrästä tai paikasta, johon ne ovat kromosomissa kiinnittyneet. Geenien ilmentyminen voi myös muuttua ympäröivien olosuhteiden muuttuessa, esimerkiksi siirrettäessä kasvit kasvihuoneista ulos kenttäkokeisiin.

*In vitro* -kasvatuksessa somaklonaalinen muuntelu saa aikaan vaihtelua geenien ilmentymisessä yksilöiden välillä. Geeniä heikosti ilmentävät yksilöt pystytään kuitenkin helposti poistamaan valitsemalla kasvatuksen alkuvaiheessa siirtogeenisten kasvien joukosta sopivat yksilöt. Geenien ilmentymisessä voi kuitenkin esiintyä vaihtelua myös valikoinnin jälkeen jo ensimmäisen kasvisukupolven aikana. Ilmentymisen häviäminen ei johdu itse geenin häviämisestä vaan **geenin "hiljenemisestä"** (*gene silencing*). Vaikka siirtogeeni olisi kiinnittynyt pysyvästi kasvigenomiin ja näyttäisi ilmentyvän siellä, ilmentyminen saattaa kuitenkin loppua, jolloin siirtogeeninen kasvi ei olekaan ilmiasultaan halutunlainen. Tällainen geenin hiljeneminen johtuu geenin inaktivaatiosta. Inaktivaatio voi tapahtua usealla eri tavalla geenien transkription aikana tai sen jälkeen. Geenien hiljeneminen saattaa olla puolustuskeino, jolla kasvit estävät vieraan, esimerkiksi haitallisen virus- tai patogeeni-DNA:n ilmentymisen soluissa (Finnegan ja McElroy 1994).

Geenien hiljeneminen vaatii yleensä jonkinasteisen homologian siirtogeenin ja alkuperäisen geenin välillä (Matzke ja Matzke 1995). Homologinen alue saattaa sijaita promoottorissa tai geenin koodittavalla alueella. Homologiset alueet voivat vaikuttaa toisiinsa sijaitessaan samassa kromosomissa (cis-inaktivaatio) tai eri kromosomissa (trans-inaktivaatio). Niin sanotussa kosuppressiossa sekä siirtogeeni että kasvin alkuperäinen, homologinen geeni inaktivoituvat. Inaktivaatio voi tapahtua myös vain jommassa kummassa geenissä.

### 5.1 Transkription aikana tapahtuva inaktivaatio (promoottorin metylaatio)

Esimerkkinä siirtogeenin inaktivaatiosta voidaan mainita petunian valkokukkaiseen muotoon siirretty maissin *A1*-geeni, joka saa aikaan tiilenpunaisen värin, jota ei normaalisti esiinny petunialla (Meyer ym. 1987). Geeni ei kuitenkaan ilmentynyt tasaisesti kasveissa vaan kenttäkokeissa kukkien väri vaihteli valkoisesta erisävyiseen tiilenpunaiseen (Meyer ym. 1992). Kukan väri saattoi myös vaihdella samassa kasvissa kasvukauden aikana. Kun valkokukkaisia yksilöitä tutkittiin tarkemmin, havaittiin siirtogeenillä käytetyn 35S-promoottorin metyloituneen. DNA-juosteen sytosiinitähteiden metylaatio johtaa geenin inaktivoitumiseen, ja metylaatio säätelee useiden geenien promoottoreiden toimintaa sekä kasveilla että eläimillä. Kasvatusolosuhteet ja sääolot vaikuttivat metylaatioon ja *A1*-geenin ilmentymiseen petunialla (Meyer ym. 1992). Metylaatiota tapahtui vain siirretyllä geenillä, mikä osoittaa, että kasvi tunnisti spesifisesti siirretyn DNA:n eikä kasvin oma DNA inaktivoitunut. Tässä tapauksessa kasviin oli kiinnittynyt vain yksi ko-

pio geenistä, mikä osoittaa, että yksittäisetkin geenit voivat inaktivoitua. Geenien hiljenemisen on kuitenkin todettu olevan yleisempää silloin, kun kasvigenomiin on kiinnittynyt useita kopioita samasta geenistä (Finnegan ja McElroy 1994).

Siirrettäessä samaan kasviin useita geenejä saman promoottorin käyttäminen voi saada aikaan siirtogeenien inaktivaation. Matzke ym. (1989) siirsivät tupakkaan peräkkäin kaksi merkkigeeniä saman promoottorin alaisuudessa ja huomasi, että jälkimmäinen geeni inaktivoi ensimmäisenä siirretyn geenin. Inaktivaatio johtui promoottorin metylaatiosta ja sen sai aikaan nimenomaan toinen siirtogeeni. Kasveissa, joissa oli vain ensiksi siirretty geeni, metylaatiota ei tapahtunut ja geeni ilmentyi normaalisti.

## 5.2 Transkription jälkeen tapahtuva inaktivaatio (kosuppressio)

Kasviin voidaan siirtää kopioita sen omista geeneistä silloin, kun halutaan voimistaa näiden geenien ilmentymistä soluissa. Usein kuitenkin geenituotteen ylituotannon sijasta sekä siirretty geeni että kasvin alkuperäinen geeni inaktivoituvat. Tätä sanotaan kosuppressioksi.

Hart ym. (1992) tutkivat tupakan kitinaasin ilmentymistä *Nicotiana sylvestrik-sellä*. Suurimmalla osalla siirtogeenisistä kasveista kitinaasia kerääntyi lehtiin jopa 120 kertaa enemmän kuin verrokkikasveilla. Osalla siirtogeenisistä kasveista kitinaasia kuitenkin kerääntyi lehtiin jopa vähemmän kuin ei-siirtogeenisillä kasveilla. Tämä johtui kitinaasigeenien kosuppressiosta. Kosuppressio on periaatteessa satunnainen tapahtuma, mutta ympäröivät olosuhteet vaikuttivat tässä tapauksessa selvästi geenien inaktivaatioon. Siirtogeenisillä kasveilla, jotka kasvatettiin siemenistä asti suoraan kasvihuoneessa, ei tapahtunut inaktivaatiota. Sen sijaan kasveilla, jotka kasvatettiin taimivaiheeseen asti suljetuissa kasvatusastioissa, havaittiin kitinaasigeenin inaktivaatiota. Inaktivaatio ei kuitenkaan ollut pysyvää, vaan "hiljentyneiden" kasvien jälkeläiset saattoivat tuottaa taas suuria määriä kitinaasia. Inaktivaatio näytti myös riippuvan kasvin kehitysvaiheesta. Samassa kasvissa saattoi olla lehtiä, joissa tuotettiin paljon kitinaasia ja toisaalta lehtiä, joissa geenit olivat inaktivoituneet. Vastaavanlaista kasvatusolosuhteista johtuvaa geenien inaktivaatiota on havaittu tapahtuvan myös tupakalla, johon oli siirretty sulfonyyliureakestävyys (Brandle ym. 1995). Aikaisemmissa kasvihuonekokeissa herbisidikestävyys näytti olevan pysyvää, mutta kun kasvit siirrettiin kenttäkokeisiin pelloille, kaikki kasvit eivät enää olleetkaan kestäviä. Suoraan pelloille kylvetyistä siemenistä kasvaneet kasvit olivat vastustuskykyisiä, mutta kasveilla, jotka oli kasvatettu taimiksi kasvatusastioissa havaittiin geenien kosuppressiota.

Transkription jälkeistä inaktivaatiota tutkittaessa on huomattu, että siirtogeenin ja alkuperäisen geenin transkriptio tapahtuu normaalisti, mutta RNA:ta ei kuitenkaan keräänny soluihin. Smith ym. (1994) esittivät teorian inaktivaation syystä tutkiessaan viruskestävyyden syntymistä tupakalla, johon oli siirretty perunan Y-viruksen (PVY) kuoriproteiini. Heidän mukaansa RNA:ta alettaisiin hajottaa, kun sen määrä solussa ylittää tietyn rajan. Siirtogeenin ja alkuperäisen geenin RNA kerääntyisi soluun tiettyyn määrään asti, minkä jälkeen sitä alettaisiin hajottaa. Tämä johtaisi molempien geenien kosuppressioon ja siten viruskestävyyteen. Goodwinin ym. (1996) mukaan myös genomiin kiinnittyneiden geenikopioiden määrä vaikuttaa geenien inaktivaatioon. Jos kasvissa oli vain yksi kopio geenistä, viruskestävyys eli RNA:n hajoaminen ilmeni hitaasti. Kaksi geenikopiota kasvissa sai aikaan viruskestävyyden nopean induktion. Kolme kopiota tai enemmän sai heti aikaan täydellisen viruskestävyyden. Tässä tapauksessa siirtogeenisistä kasveista siis kannattaa valita yksilöt, joissa on useita geenikopioita, jotta viruskestävyys ilmentyisi heti ja olisi pysyvää.

### 5.3 Siirtogeenien pysyvyyden parantaminen

Koska geenit, joista on genomissa useita kopioita, inaktivoituvat helposti, kannattaa heti alkuvaiheessa valita solut, joissa siirretystä geenistä on vain yksi kopio. Tämä on ongelmallista etenkin yksisirkkaisilla kasveilla, joilla täytyy yleensä käyttää suoria geeninsiirtomenetelmiä, jolloin kasvigenomiin usein kiinnittyy monta kopiota geenistä.

Kun kasviin siirretään peräkkäin useita geenejä, ei pitäisi käyttää samoja promoottoreita ja merkkigeenejä, jotta homologisia alueita olisi mahdollisimman vähän.

Kun kasvissa halutaan ilmentää ylimäärin jotakin kasvin omaa proteiinia, kosuppressiolta on vaikea välttyä. Yksi mahdollisuus olisi paikkaspesifisen rekombinaation käyttäminen. Tällöin kasvin oma geeni korvataan vahvan promoottorin alaisuudessa olevalla siirtogeenillä.

Siirtogeenien ilmentymisen vaihtelua voidaan mahdollisesti vähentää käyttämällä niin sanottuja SAR- (*scaffold attachment region*; Breyne ym. 1992, Allen ym. 1993) tai MAR- (*matrix attachment region*; Mlynárová ym. 1996) alueita siirrettävien geenien kummallakin puolen. Näiden alueiden ajatellaan suojaavan geenejä ympäröivän kromatiinin vaikutuksilta ja/tai estävän geenien kiinnittymisen inaktiiviselle heterokromatiinialueelle (Mlynárová ym. 1996).

Kasvien geenit koostuvat DNA-jaksoista, jotka ovat koostumukseltaan tasalaatuisia ja sisältävät tietyn määrän C- ja G-emäksiä. Jos siirretyn geenin emäskoostumus poikkeaa paljon ympäröivän DNA:n emäskoostumuksesta, geeni tunnustetaan vieraaksi DNA:ksi ja inaktivoidaan. Esimerkiksi Bt-toksiinien ilmentyminen kasvissa on saatu tehokkaammaksi ja pysyvämmäksi muuttamalla geenin emäskoostumusta muistuttamaan enemmän kasvi-DNA:n koostumusta (Perlak ym. 1990).

## Siirretyt ominaisuudet

### 6.1 Herbisidikestävyys

Rikkakasvit kilpailevat viljelykasvien kanssa vedestä, valosta ja ravinteista, ja voivat vähentää sadon rahallista arvoa 10—20 prosentilla. Rikkakasveja vastaan on kehitetty monenlaisia kemiallisia torjunta-aineita eli herbisidejä, joiden tarkoituksena on tappaa rikkakasvit ja säästää itse viljelykasvit, ja jotka toisaalta eivät vahingoita ympäristöä, ihmisiä ja eläimiä. Viljelykasveilla voidaan käyttää vain tiettyjä torjunta-aineita, joita ne kestävät luonnostaan. Tällaiset valikoivat torjunta-aineet tappavat kuitenkin valikoiden myös rikkakasveja. Tehokkaammat, valikoimattomat torjunta-aineet taas vahingoittavat rikkakasvien lisäksi myös viljelykasveja. Jos viljelykasvit saataisiin kestävämmän näitä herbisidejä, käytettävien herbisidien valikoimaa voitaisiin laajentaa ja voitaisiin siirtyä käyttämään pieninä määrinä tehoavia aineita, jolloin torjunta-aineiden käyttömäärätkin ehkä pienenisivät. Aikaisemmin herbisidejä kestäviä kasveja on saatu lähinnä valitsemalla viljelykasvien tai niiden lähisukulaisten joukosta kestäviä yksilöitä ja risteyttämällä niitä keskenään. Nykyään kasveihin voidaan geenitekniikan avulla siirtää geenejä, jotka saavat aikaan kestävyuden rikkakasvihävitteitä vastaan. Nämä geenit voivat vaikuttaa kolmella tavalla: (1) muuttamalla herbisidin kohdeproteiinia, (2) tuottamalla kohdeproteiinia ylimäärin tai (3) muuttamalla herbisidin myrkyttömäksi.

#### 6.1.1 Glyfosaatti (N-(fosfonometyyli)glysiini)

Glyfosaatti on tehoaineena mm. Roundup-torjunta-aineessa. Se on valikoimaton lehtiherbisidi ja kulkeutuu tehokkaasti johtojänteitä pitkin lehdistä juurakoihin. Valikoimattomana herbisidinä se vahingoittaa rikkakasvien lisäksi myös viljelykasveja. Se on verraten vähän haitallinen herbisidi, koska maahan jouduttuaan se inaktivoituu nopeasti kiinnittyen maahiukkasiin, eikä siten esimerkiksi huuhtoudu helposti pohjavesiin tai ole vaaraksi maaperän mikrobeille. Glyfosaattia on käytetty muun muassa rikkakasvien torjuntaan viljelysmailla ja (ohjattuna ruiskutuksena) hedelmätarhoissa sadonkorjuun jälkeen sekä tienvarsilla, pientareilla ja metsänuudistusaloilla puuvartisten kasvien hävittämiseen (Mukula ja Salonen 1990). Glyfosaatti estää aromaattisten aminohappojen (fenyyialaniini, tyrosiini ja tryptofaani) synteesin estämällä kloroplastin 5-enolipyruvaattishikimaatti-3-fosfaattisyntaasin (EPSPS) toiminnan. Tämä entsyymi puuttuu eläimiltä kokonaan, minkä vuoksi glyfosaatti ei ole myrkyllistä eläimille. Tosin epäilyksiä glyfosaatin, ja etenkin kaupallisen Roundup-valmisteen, genotoksisista (DNA:ta vaurioittavista) vaikutuksista on esitetty (Bolognesi ym. 1997).

Jonkinasteinen kestävyys voidaan saada aikaan tuottamalla EPSPS-entsyymiä kasvissa ylimäärin. Parempi kestävyys saadaan kuitenkin aikaan mutatoituneella entsyymillä. Muun muassa *Salmonella typhimurium* -bakteerista ja *E. colista* on löydetty EPSPS-mutantteja, joissa yhden aminohapon muutos saa aikaan kestävyuden glyfosaattia vastaan. Kestävyyttä voidaan vielä parantaa liittämällä geeni kloroplastin genomiin. Koska kloroplasti sisältää jopa tuhansia kopioita genomistaan, geenin ilmentyminen kloroplastissa on hyvin tehokasta. Daniell ym.

(1998) saivat aikaan tehokkaan glyfosaattikestävyyden siirtämällä tupakan kloroplastiin petunian EPSP-syntaasia koodittavan geenin, vaikka tämä petuniasta eristetty geeni ei olekaan erityisen kestävä glyfosaattia kohtaan. Prokaryooteista peräisin olevien mutatoituneiden *aroA*-geenien siirtäminen prokaryoottista alkupe-  
rää oleviin kloroplasteihin voisi tehostaa ilmentymistä edelleen. Eräiltä maaperän bakteereilta on myös eristetty glyfosaattia hajottavan entsyymin, glyfosaattioksi-  
doreduktaasin (GOX), geeni. Glyfosaattikestävyys on siirretty ainakin maissiin, soijapapuun, sokerijuurikkaaseen, rapsiin ja poppeliin.

### 6.1.2 Glufosinaattiammonium (fosfinotrisiini, bialafos)

Glufosinaattiammonium on valikoimaton lehtiherbisidi ja se on vaikuttavana ai-  
neena muun muassa Basta<sup>®</sup>-herbisidissä. Se on synteettinen versio *Streptomyces*  
*hygroscopicus* -sädebakteerista eristetyistä bialafos-tripeptidistä. Glufosinaattiammo-  
nium hajoo maassa mikrobien toimesta nopeasti, eikä sillä siten ole myrkkyyvai-  
kutuksia maaperässä. Nopean hajoamisensa ansiosta se ei myöskään todennäköi-  
sesti ehdi huuhtoutua pohjavesiin. Suomessa glufosinaattia käytetään rikkakasvi-  
en torjuntaan lähinnä perunan ja porkkanan viljelyssä sekä ohjattuina ruiskutuk-  
sina mansikan ja vadelman riviväleissä ja hedelmäpuiden ja herukkapensaiden  
alustoilla (Mukula ja Salonen 1990).

Glufosinaattiammonium estää glutamiinisyntetaasientsyymin (GS) toiminnan,  
jolloin soluihin kertyy myrkyllisiä määriä ammoniakkia. Glufosinaattia kestäviä  
kasveja on saatu aikaan tuottamalla soluissa ylimäärin glutamiinisyntetaasia tai  
siirtämällä kasviin *Streptomyces hygroscopicus* -bakteerista eristetty asetyyli-transfe-  
raasigeeni (*bar*) tai *S. viridochromogenes*istä eristetty vastaava geeni (*pat*), jotka saa-  
vat aikaan glufosinaatin inaktivaation (De Block ym. 1987; Wehrmann ym. 1996).  
Glufosinaattikestävyyttä on myös käytetty paljon merkkigeeninä geeninsiirrois-  
sa. Lisäksi Uchimiya ym. (1993) huomasivat, että käsiteltäessä glufosinaattia kestä-  
vää riisiä tällä torjunta-aineella se esti samalla *Rhizoctonia solani* -sienen aiheutta-  
man infektion. Glufosinaattikestävyys on siirretty muun muassa sokerijuurikkaa-  
seen, maissiin ja rapsiin.

### 6.1.3 Triatsiinit

Triatsiinit (esimerkiksi atratsiini ja simatsiini) ovat tehokkaita ja melko valikoimat-  
tomia rikkaruohomyrkkijä, jotka estävät kasvien fotosynteettisen elektroninsiir-  
ron valoreaktio II:ssa olevalle plastokinonille kilpailemalla sen kanssa samasta si-  
toutumiskohdasta. Triatsiineja on käytetty etenkin maissin viljelyssä, ja Suomessa  
ne on hyväksytyt käytettäväksi hedelmäpuiden ja marjapensaiden alustoilla, pe-  
rennojen viljelyssä ja metsäpuiden taimitarhoissa sekä viljelemättömillä alueilla  
(Mukula ja Salonen 1990).

Triatsiinikestävyyden voi saada aikaan yhden aminohapon muutos kasvin  
D1-proteiinin kohdassa, johon plastokinoni normaalisti sitoutuu elektroninsiir-  
ron aikana. Mutaatio D1-proteiinissa voi toisaalta myös haitata fotosynteesiä ja  
hidastaa kasvua. Kestävyyttä on yritetty saada aikaan siirtämällä kasviin mutatoi-  
tu D1-proteiini, mutta ainakaan tupakalla se ei saanut aikaan kunnollista kestä-  
vyyttä. D1-proteiinia koodittava *psbA*-geeni on kloroplastigeeni ja sen vuoksi siir-  
rettävään geeniin täytyy liittää kuljetussekvenssi, jotta geeni saadaan ilmentymään  
kloroplastissa. Tähän mennessä atratsiinikestävyys on siirretty ainakin kaaliin.



#### 6.1.4 Sulfonyyliureat ja imidatsolinonit

Sulfonyyliureat ja imidatsolinonit ovat valikoivia ja tehokkaita torjunta-aineita, joiden käytettävät määrät ovat pieniä (vain muutama gramma hehtaaria kohti). Ne eivät ole myrkyllisiä nisäkkäille mutta toisaalta ne ovat erittäin myrkyllisiä vesikasveille ja leville. Ne ovat myös hitaasti hajoavia ja helposti kulkeutuvia. Suomessa sulfonyyliureoita käytetään lähinnä viljamailla ja pellavaviljelyksillä ennen viljelykasvien pituuskasvun alkamista (Mukula ja Salonen 1990).

Sulfonyyliureaherbisidit estävät kasvisolun asetolaktaattisyntetaasin (ALS) toiminnan. Tämä entsyymi toimii haaroittuneiden aminohappojen (valiini, leusiini ja isoleusiini) synteesissä. Myös imidatsolinoni- ja triatsolopyrimidiiniherbisidien vaikutus kohdistuu tähän entsyymiin. Monet viljelykasvit ovat kuitenkin herkkiä näille torjunta-aineille. Bakteereista, leivinhivasta ja kasveista on löydetty ALS-entsyymien mutanttimuotoja, jotka saavat aikaan kestävyden sulfonyyliureaherbisidejä vastaan. Tupakasta on eristetty kestävyden aikaan saava *als*-geeni ja lituruoholta *csr1-1*-geeni, joita on siirretty muun muassa tupakkaan, perunaan ja rapsiin.

Ott ym. (1996) tekivät ALS-entsyymiin paikkaspesifisiä mutaatioita ja tutkivat niiden vaikutusta sulfonyyliurea- ja imidatsolinonikestävyteen. He etsivät entsyymistä kohdan, johon torjunta-aineet vaikuttavat ja muuttivat yksittäisiä aminohappoja tältä alueelta. Mutatoivat aminohapot etsittiin tietokonemallin avulla. Yhden aminohapon muutos entsyymissä sai aikaan melkein täydellisen kestävyden tiettyä imidatsolinonia vastaan, mutta entsyymien aktiivisuus väheni huomattavasti. Tämän perusteella löydettiin kuitenkin torjunta-aineen vaikutuskohdan ja kun seuraavalla kerralla aminohappo vaihdettiin toiseen, entsyymiaktiivisuuskin saatiin säilymään. Mutatoitu entsyymi kesti imidatsolinoneja mutta oli samalla herkkä sulfonyyliureaherbisideille, eli tällä menetelmällä saatiin aikaan hyvin spesifinen herbisidikestävyys.

Sulfonyyliureakestävyttä voidaan käyttää myös merkkigeeninä yksisirkkaisilla kasveilla. Kaksisirkkaisille se ei sovellu yhtä hyvin (Hinchee ym. 1993).

Sulfonyyliureakestävyys on siirretty muun muassa rapsiin, kaaliin, puuvillaan, tomaattiin, tupakkaan ja maissiin. Imidatsolinonikestävyttä on siirretty rapsiin, puuvillaan, tupakkaan, perunaan ja maissiin.

#### 6.1.5 Bromoksiniiili

Bromoksiniiili on valikoiva herbisidi, jota käytetään usein seoksena muiden herbisidien kanssa syys- ja kevätviljamailla sekä heinän siemenviljelyksillä (Mukula ja Salonen 1990). Se on kosketusvaikutteinen lehtiherbisidi ja tehoaa yrttimäisiin kertarikkakasveihin. Se toimii estämällä fotosynteettisen elektroninsiirron. Bromoksiniiili hajoaa maaperässä nopeasti bakteerien toimesta. Maaperässä yleisesti esiintyvän *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* -bakteerin nitrilaasi muuttaa bromoksiniiilin myrkyttömäksi yhdisteeksi. Stalker ym. (1988) siirsivät nitrilaasia koodittavan *bxn*-geenin tupakkaan ja saivat aikaan bromoksiniiilikestävyden. Tämä geeni on sen jälkeen siirretty ainakin puuvillaan, rapsiin ja perunaan.

#### 6.1.6 2,4-D

Fenoksihappoherbisideihin kuuluva 2,4-D on yleisimmin käytettyjä herbisidejä maailmassa ja se vaikuttaa kasvihormoni auksiinin tavoin, mutta paljon voimakkaammin, ja aiheuttaa kasveissa epämuodostumia ja muun muassa johtojänteiden

den tukkeutumista. 2,4-D on valikoiva ja erittäin tehokas rikkaruohomyrkkä, mutta se vahingoittaa helposti myös viljelykasveja. Suomessa 2,4-D:tä käytetään yrttimäisten rikkakasvien torjuntaan nurmikentiltä, pientareilta ja tienvarsilta sekä lepän ja koivun versojen hävittämiseen pientareilta ja tienvarsilta (Mukula ja Salonen 1990). Monet maaperän bakteerit pystyvät hajottamaan 2,4-D:tä, ja eräältä tällaiselta bakteerilta (*Alcaligenes eutrophus*) eristetty geeni (*tfdA*) on siirretty muun muassa tupakkaan, jossa se sai aikaan kestävyden 2,4-D:tä sekä eräitä muita fenoksihappoherbisidettä vastaan (Hinchee ym. 1993). Tämän jälkeen 2,4-D-kestävyys on siirretty muun muassa puuvillaan ja perunaan.

## 6.2 Hyönteiskestävyys

Maailmassa on taloudellisesti merkittäviä vahinkoja aiheuttavia hyönteislajeja useita tuhansia ja ne aiheuttavat vuosittain yli 15 prosentin satotappiot. Suurin osa näistä hyönteisistä on perhosten ryhmään (*Lepidoptera*) kuuluvia. Tuhohyönteisiä vastaan voidaan fysikaalisen ja biologisen torjunnan lisäksi käyttää erilaisia kemikaaleja. Näistä osa on keinotekoisia. Loput ovat kasveissa, bakteereissa ja sienissä luonnostaan esiintyviä aineita.

Monet keinotekoiset hyönteismyrkyt ovat laajavaikutteisia ja ne tehoavat useisiin haitallisiin lajeihin. Haittana on, että ne voivat samalla vahingoittaa myös hyödyllisiä hyönteislajeja, kuten mehiläisiä, sekä maahan joutuessaan myös maaperän eliöstöä. Kun hyönteismyrkkyjä levitetään istutuksille suuria määriä, syntyy valintapaineita myrkkäjä kestävien hyönteiskantojen kehittymiseen. Geenitekniologian avulla on nykyään mahdollista siirtää kasveihin geenejä, jotka saavat aikaan kestävyden tiettyjä tuhohyönteislajeja vastaan.

*Bacillus thuringiensis* on maassa vapaana elävä gram-positiivinen bakteeri, jonka soluihin kerääntyy itiömuodostuksen aikana hyönteisille myrkyllisiä proteiineja, niin sanottuja **δ-endotoksiineja (Bt-toksiinit)**. Näitä toksiineja on käytetty hyönteismyrkkinä jo vuosikymmenien ajan, mutta niiden tuottaminen bakteereja fermentoimalla on kallista ja ne hajoavat luonnossa nopeasti, minkä vuoksi myrkkäjä pitää levittää istutuksille useita kertoja kasvukauden aikana. Nopea hajoaminen toisaalta vähentää tuotteen haitallisia ympäristövaikutuksia. Spesifisyytensä takia nämä toksiinit ovat vaarattomia pölyttäjinä toimiville hyönteisille ja selkärangaisille.

Bt-toksiinit ovat kidemäisiä proteiineja. Proteiini syntetoidaan bakteerisolussa niin sanottuna protoksiinina, jonka hyönteisen suolen proteaasientsyymi hajottaa aktiiviseksi toksiiniksi, joka puolestaan kiinnittyy suolen seinämässä oleviin reseptorimolekyyliin. Tämä saa aikaan suolen seinämän hajoamisen ja lopulta hyönteisen kuoleman.

Bt-toksiineja on löydetty useita erilaisia ja niitä koodittavat geenit voidaan DNA-jaksojen homologian mukaan jakaa neljään ryhmään (*cryI–IV*), jotka kukin vaikuttavat eri hyönteisryhmiin (*cryI*: perhoset, *cryII*: perhoset ja kaksisiipiset, *cryIII*: kovakuoriaiset, *cryIV*: kaksisiipiset). Myöhemmin tähän jaotteluun on lisätty vielä kaksi ryhmää (*cryV* ja *cryVI*), kun löydettiin toksiineja, jotka ovat myrkyllisiä maassa eläville sukkulamadoille. Ryhmän *cryI* endotoksiinit tunnetaan parhaiten ja niiden avulla on saatu aikaan kestävyys useita perhoslajeja vastaan. Ryhmän *cryIII* toksiinit tehoavat muun muassa pahaan perunan tuholaiseen koloradonkuoriaiseen.

Vuonna 1987 kaksi tutkijaryhmää (Fischhoff ym. 1987, Vaeck ym. 1987) siirsivät ensimmäisinä Bt-toksiinigeenin kasviin. Bt-toksiinin varsinainen vaikuttava osa käsittää vain ensimmäiset 600 aminohappoa kokonaisesta protoksiinimolekyylistä. Tämän vuoksi kokonainen geeni ei saakaan aikaan myrkkäjävaikutusta kasvisolussa, vaan geeni pitää katkaista. Katkaistu geeni ilmentyykin solussa, mutta ei

kovin tehokkaasti ja sai aikaan vain osittaisen kestävyuden. Näiden niin sanottujen ensimmäisen sukupolven geeninsiirtojen jälkeen kasveihin on siirretty “syn-teettisiä” Bt-toksiinigeenejä, joiden DNA on muunnettu muistuttamaan enemmän kasvigeenien rakennetta (Perlak ym. 1990, Barton ja Miller 1993, Strizhov ym. 1996), jolloin geenien ilmentyminen on saatu huomattavasti tehokkaammaksi ja kestävyys täydelliseksi. Eri Bt-toksiinit vaikuttavat eri hyönteislajeihin ja näitä toksineja löydetään koko ajan lisää. Siirtämällä kasviin kahden Bt-geenin yhdistelmä voidaan saada aikaan kestävyys useita lajeja vastaan (Van der Salm ym. 1994). Asiaa on lähestytty myös toiselta kannalta siirtämällä Bt-toksiinigeeni kasvin johtosolu-kossa elävään *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* -bakteeriin, mikä sai aikaan ‘systemisen’ hyönteiskestävyuden maissilla (Lampel ym. 1994).

Kasveissa on proteiineja, jotka toimivat kasvien luonnollisissa puolustusreaktioissa. Tällaisia ovat muun muassa erilaiset **proteinaasi-inhibiittorit**, jotka estävät hyönteisten ruoansulatusentsyymien toiminnan. Duan ym. (1996) eristivät perunan proteinaasi-inhibiittori II -geenin (*pin2*) ja siirsivät sen riisiin haavoitusalueella indusoituvan promoottorin kanssa ja saivat siten aikaan kestävyuden riisin tuholaista *Sesamia inferensia* vastaan. Narváez-Vásquez ym. (1993) saivat proteinaasi-inhibiittorin ilmentymään juurihuntusolukossa, jolloin se voisi suojata myös maaperän hyönteisiltä ja mikrobeilta. Myös muita proteinaasi-inhibiittoreita (esimerkiksi ihmisen kystatiini) on siirretty kasveihin.

Useat hernekasvit sisältävät **lektiinejä**, hiilihydraatteja sitovia proteiineja. Ne toimivat kasvien puolustusreaktioissa sitoutumalla kasveja syövien hyönteisten tai eläinten suolen seinämään estäen siten ravinteiden imeytymisen. Tarhapavun siemenet sisältävät **α-amylaasi-inhibiittoria**, joka on lektiinin sukuinen aine ja myrkyllinen siemeniä syöville hyönteisille. Schroeder ym. (1995) siirsivät tarhapavun α-amylaasi-inhibiittorigeenin (*αa1*) siemenessä indusoituvan promoottorin alaisuudessa herneeseen, joka muuttui näin myrkylliseksi tietyille siemeniä syöväille kärsäkäs-lajille.

**Sukkulamadot** aiheuttavat suuria sadonmenetyksiä monilla savikkakasveilla, kuten sokerijuurikkaalla, sekä ristikkukaisilla, kuten rapsilla. Niiden torjumiseksi käytetyt kemikaalit ovat erittäin myrkyllisiä ja torjumiskeinona onkin tähän asti voitu käyttää lähinnä viljelykiertoa. Kestävien lajikkeiden kehittäminen yksinkertaistaisi sukukulamatojen torjuntaa huomattavasti. Viljelyiltä juurikkailta sukukulamadonkestävyysgeenit puuttuvat, mutta niitä on löydetty luonnonvaraisilta juurikaslajeilta. Sokerijuurikkaaseen siirretty *Hs1<sup>pro-1</sup>*-geeni esti *Heterodera schachtii* -sukkulamadon infektion estämällä sen lisääntymisen kasvin juuressa (Cai ym. 1997). Tätä geeniä voitaisiin käyttää siirrettäessä kestävyyttä muihinkin sukukulamatojen kohdekasveihin.

### 6.3 Viruskestävyys

Virustaudit ovat erityisen haitallisia monivuotisille ja suvuttomasti lisättäville kasveille, joilla virustartunta usein runsastuu viljelyn jatkuessa vuodesta toiseen (Valkonen ym. 1996). Kasviviruksia vastaan ei ole olemassa kemiallisia torjunta-aineita. Virusten siirtäjiin voidaan torjunta-aineilla jonkin verran vaikuttaa, mutta tärkein virusten torjuntatapa on kestävien lajikkeiden tuottaminen.

Kasviviruksia vastaan on taisteltu “rokottamalla” kasveja eli tartuttamalla kasvit miedommilla virusroduilla, jolloin miedompi taudinaiheuttaja estää tai viivästyttää ankaramman rodun aiheuttamia tautioireita. Tällä niin sanotulla **ristisuojustamismenetelmällä** on kuitenkin varjopuolensa. Miedommassa rodussa saattaa tapahtua mutaatioita, jotka saavat aikaan rodun muuttumisen vaarallisemmaksi ja tämän rodun valikoitumisen viruksen monistumisen aikana. Miedompi ja ankarampi rotu saattavat yhdessä saada aikaan vakavampia tautioireita kuin kumpi-

kaan yksinään. Mieto virusrotu, joka toimii suojaajana yhdessä kasvilajissa, saattaa olla vaarallinen taudinaiheuttaja toiselle lajille. Miedompi rotu voi myös itsessään aiheuttaa pieniä mutta merkittäviä sadonmenetyksiä (Abel ym. 1986). Kaikelta tältä voitaisiin välttyä, jos ristisuoja saataisiin kokonaisen virusgenomin sijasta aikaan yksittäisten virusgeenien avulla.

Vuonna 1986 Abel ym. siirsivät agrobakteerimenetelmän avulla tupakkaan tupakan mosaiikkiviruksen (TMV) **kuoriproteiinigeenin** ja saivat aikaan tautioireiden viivästymisen ja joissakin tapauksissa estymisen kokonaan. Tämän jälkeen kuoriproteiinin aikaansaamaa kestävyyttä on käytetty monia muita viruksia vastaan useilla kasvilajeilla. Myös kuoriproteiinin antisense-RNA saa aikaan viruskestävyyden, mutta esimerkiksi Cuozzon ym. (1988) kokeissa kurkun mosaiikkiviruksen (CMV) kuoriproteiinin antisense-RNA ei ollut yhtä tehokas kuin oikein päin liitetty geeni. Toisaalta perunaan siirretty perunan kierrelehtiviruksen (PLRV) kuoriproteiinin antisense-RNA esti virusinfektion yhtä tehokkaasti kuin oikein päin oleva geenikin (Kawchuck ym. 1991). Kasviin siirretyn kuoriproteiinigeenin ajatellaan ilmentyessään estävän infektoivaa virusta vapautumasta proteiinikuorestaan replikaatiota varten solussa (Baulcombe 1996).

Viruskestävyys voidaan saada aikaan myös geenillä, joka ei koodita toimivaa geenituotetta. Smith ym. (1994) siirsivät tupakkaan perunan Y-viruksen (PVY) kuoriproteiinigeenin, johon oli heti aloituskodonin perään liitetty lopetuskodoni. Tällöin lähetti-RNA:ta ei voida "kääntää" proteiiniksi. Toimimaton geeni sai viruskestävyyden aikaan niin sanotun kosuppression avulla, jolloin kasvin sisältämä kuoriproteiinigeeni ilmeisesti tekee infektoivan viruksen kuoriproteiinigeenin toimimattomaksi.

Kuoriproteiinin lisäksi myös muiden virusgeenien ilmentyminen kasvilla voi saada aikaan kestävyden. Goleboski ym. (1990) siirsivät tupakkaan osan TMV:n **replikaasientsyymiä** koodittavasta geenistä ja saivat aikaan täydellisen kestävyden virusta vastaan. Samassa laboratoriossa (Anderson ym. 1992) siirrettiin tupakkaan CMV:n replikaasigeeni, josta osa oli poistettu ja joka myös sai aikaan kestävyden kyseistä virusta vastaan.

Osa viruksen genomista koodittaa proteiinia, joka saa aikaan viruksen liikumisen solusta toiseen ja leviämisen kasvilla. Joillakin viruksilla tätä **liikeproteiinia** koodittaa kolmen osittain päällekkäisen geenin ryhmä, joista kukin koodittaa omaa proteiiniaan. Yhteen näistä valkoapilan mosaiikkiviruksen (WCIMV) geeneistä tehtiin mutaatio ja geeni siirrettiin tupakkaan. Mutaatio esti liikeproteiinin toiminnan ja sai aikaan kestävyden useita viruslajeja vastaan (Beck ym. 1994). Cooper ym. (1995) käyttivät tupakalla sekä toimivaa että epätäydellistä TMV:n liikeproteiinigeeniä. Epätäydellinen geeni sai aikaan kestävyden useita eri viruksia vastaan, kun taas toimiva geeni aiheutti tautioireiden voimistumisen. Virukset liikkuvat kasvisolusta toiseen soluseinässä olevien plasmodesmien kautta. Toimimaton liikeproteiini todennäköisesti kilpailee infektoivan viruksen liikeproteiinin kanssa plasmodesmien sitoutumispaikoista ja estää siten viruksen leviämisen kasvilla (Lapidot ym. 1993). Eri virusten liikeproteiinit kiinnittyvät luultavasti samoihin kohtiin plasmodesmeissa, mistä johtuu liikeproteiinin aikaansaama kestävyys useita eri viruksia vastaan.

**Satelliitti-RNA** on yksisäikeinen RNA-molekyyli, joka monistuu auttajaviruksen avulla ja pakkautuu tämän kanssa samaan kuoreen. Yleensä satelliitti-RNA vähentää auttajaviruksensa lisääntymistä kasvisolussa ja lieventää sen aiheuttamia taudinoreita. Tämän vuoksi satelliitti-RNA:n mahdollisuuksia kasvien viruskestävyyden kehittämiseksi onkin tutkittu paljon. Harrison ym. (1987) siirsivät agrobakteerimenetelmän avulla tupakkaan CMV:n satelliitti-RNA:n DNA-kopion ja saivat aikaan kestävyden sekä kyseistä virusta että sen läheistä sukulaisvirusta vastaan. Toisaalta jotkin satelliitti-RNA:t saattavat pahentaa tautioireita tietyillä

isäntälajeilla, ja pienetkin mutaatiot saattavat muuttaa satelliitti-RNA:n taudinaiheuttajaksi, jolloin mahdolliset riskit voivat olla suuremmat kuin toivottu hyöty (Palukaitis ja Roossinck 1996).

Ribotsyymit ovat pieniä RNA-molekyylejä, jotka pystyvät katkomaan RNA:ta spesifisistä kohdista ja estävät siten geenien ilmentymisen. Onkin ajateltu, että ribotsyymejä voitaisiin käyttää estämään etenkin RNA-virusten ja viroidien infektoita. Yang ym. (1997) siirsivät perunaan ribotsyymin, joka estikin tehokkaasti perunan sukkulamukulaviroidin (PSTVd) replikaation kasvisoluissa. Myös kasveista peräisin olevia geneeja voidaan käyttää viruskestävyyden aikaansaamiseksi. Monista kasvilajeista on löydetty ribosomin toiminnan estäviä proteiineja (RIP; *ribosome-inhibiting protein*). Kermesmarjasta (*Phytolacca americana*) eristetty proteiini perunaan ja tupakkaan siirrettynä sai aikaan kestävyyden useita eri viruksia vastaan (Lodge ym. 1993). SAHH (S-adenosyylihomokysteiinihydrolaasi) on kasvientsyymi, joka metyloi DNA:ta ja proteiineja. Metylaatiota tarvitaan myös viruksen lisääntymiseen. Tupakkaan siirretty SAHH:n antisense-RNA esti viruksen lähetti-RNA:n metylaation ja sai siten aikaan kestävyyden useita viruksia vastaan (Masuta ym. 1995). Myös eläimistä peräisin olevilla geneeilla voidaan taistella kasvivirusia vastaan. Truve ym. (1993) eristivät rotalta geenin, joka indusoituu virusinfektion aikana interferonien vaikutuksesta ja estää viruksen lisääntymisen solussa. Tämä geeni sai perunaan siirrettynä aikaan kestävyyden perunan X-virusta (PVX) vastaan. Myös ihmisestä peräisin olevia interferonisysteemin geneeja on siirretty kasveihin (Mitra ym. 1996). Tupakkaan siirrettynä ihmisen 2-5A-syntetaasi ja RNAasi L saivat aikaan kestävyyden monia kasvivirusia vastaan. Tämän menetelmän etuna on se, että 2-5A-systeemi toimii kaikilla RNA-viruksilla, joihin suurin osa kasvivirusista kuuluu. Kestävyys ei siten rajoitu vain tiettyihin viruslajeihin.

## 6.4 Taudinkestävyys (bakteerit ja sienet)

Sieni- ja bakteeritaudit aiheuttavat suuria sadonmenetyksiä vuosittain. Kasveilla on joukko luonnollisia puolustusmekanismeja, joiden avulla ne saavat pidettyä patogeenihyökkäyksen kurissa. Nämä puolustusmekanismit eivät kuitenkaan aina toimi tehokkaasti, jolloin joudutaan käyttämään kalliita torjunta-aineita.

Esimerkkinä kasvien puolustusreaktioista on niin sanottu **hypersensitiivinen reaktio**, jossa infektiotilanteen välittömässä läheisyydessä olevat solut kuolevat ja syntyy kuoliolaikku, joka estää patogeenin leviämisen. Hypersensitiiviseen reaktioon liittyy myös monia biokemiallisia ja fysikaalisia muutoksia, joita ovat (1) muutokset soluseinän koostumuksessa (ligniinin, hydroksiprolinipitoisten glykoproteiinien ja kalloosin kerääntyminen), (2) sienille ja bakteereille myrkyllisten fytoaleksiinien synteesi, (3) hydrolyyttisten, sienien ja bakteerien soluseinää hajottavien, entsyymien (kitinaasi,  $\beta$ -1,3-glukanaasi) synteesi ja (4) muiden niin sanottujen PR-proteiinien (*pathogenesis-related*), esimerkiksi proteinaasi-inhibiittoreiden, synteesi. Joskus mikrobit, jotka eivät aiheuta tautia, voivat saada aikaan hypersensitiivisen reaktion, jolloin kasviin kehittyy niin sanottu systeemisesti hankittu kestävyys (SAR, *systemic acquired resistance*) ja se tulee joksikin aikaa immuniksi monille erilaisille taudinaiheuttajille. Näitä puolustusreaktioihin osallistuvia geneeja onkin paljon tutkittu yritettäessä kehittää paremmin sieni- ja bakteerinfektioita kestäviä kasveja. Strittmatter ym. (1995) saivat perunalla aikaan keinotekoisesti hypersensitiivisen reaktion siirtämällä siihen bakteerista eristetyn ribonukleaasin, barnaasin, sekä spesifisesti sieni-infektiossa indusoituvan promoottorin. Beffa ym. (1995) siirsivät tupakkaan koleratoksiinigeenin, joka saa eläimissä,

sienissä ja kasveissa aikaan PR-proteiinien tuotannon. Koleratoksiini sai aikaan keinotekoisien hypersensitiivisen reaktion ja lisääntyneen kestävyuden *Pseudomonas tabaci* -bakteeria vastaan.

**Kitinaasit** ovat sienissä, bakteereissa ja kasveissa esiintyviä entsyymejä, jotka hydrolysoivat sienten soluseinän kitiiniä ja estävät siten sienen kasvun. Kitinaaseja esiintyy kasveissa normaalisti pieniä määriä ja niiden määrä kasvaa nopeasti patogeenihyökkäyksen aikana. Kitinaaseja on käytetty kasvinsuojelussa lisäämällä entsyymiä kasteluveteen tai suojaavaksi kerrokseksi siemenen ympärille. Kitinaasigeeni voidaan siirtää myös maassa elävään bakteeriin, jolloin se erittää entsyymiä maaperään ja estää sienten kasvua. Geeni voidaan myös siirtää suoraan kasviin ja tuottaa entsyymiä siellä ylimäärin. Broglie ym. (1991) siirsivät tupakkaan pavun kitinaasigeenin, jolloin tupakka muuttui kestäväksi *Rhizoctonia solani* -sienipatogeenia vastaan. Kestävyys voidaan saada paranemaan ja koskemaan myös muita lajeja siirrettäessä kitinaasigeeni kasviin yhdessä esimerkiksi  **$\beta$ -1,3-glukaanasin** kanssa (Zhu ym. 1994). Logemann ym. (1992) siirsivät tupakkaan haavoitusalueella indusoituvan promoottorin kanssa ohran siemenestä eristetyn ribosomien toiminnan estävän proteiinin (**RIP**, *ribosome-inactivating protein*) ja saivat aikaan kestävyuden *R. solania* vastaan. Myös tämän proteiinin on havaittu vaikuttavan tehokkaammin yhdessä kitinaasientsyymien kanssa. Myös muut kasveilta eristetyt **PR-proteiinit** ovat hyviä ehdokkaita kasveihin siirrettäviksi. Liu ym. (1994) siirsivät perunaan ja tupakkaan tupakan osmotiinigeenin, joka on PR-5-luokkaan kuuluva proteiini. Osmotiinin ylituotanto sai aikaan kestävyuden *Phytophthora infestans* -sienipatogeenia vastaan perunalla, mutta ei tupakalla. PR-proteiinien lisäksi kasveista on löydetty pieniä kysteinipitoisia proteiineja, niin sanottuja **defensiinejä**, jotka estävät sienten kasvua. Retiisin siemenestä eristetty Rs-AFP2-proteiini sai tupakkaan siirrettynä aikaan kestävyuden *Alternaria longipes* -sienipatogeenia vastaan (Terras ym. 1995). Mikrobien kasvua estäviä yksittäisiä proteiineja on löydetty myös bakteereilta ja eläimiltä (esimerkiksi silkkiperhosen kekropiini).

Kasvien puolustusreaktioihin osallistuu yleensä useita geenejä, ja vaikuttamalla yhden geenin toimintaan voidaan vaikuttaa koko reaktiosarjaan. Esimerkiksi fenyylialaniiniammonialyaasi (PAL) on avainentsyymi monien kasvien puolustukseen liittyvien aineiden synteesissä ja sen toimintaa muuttamalla voidaan vaikuttaa koko kasvin stressimetaboliaan.

**Fytoaleksiinit** ovat kasvien tuottamia sienille ja bakteereille myrkyllisiä isoflavonoidiyhdisteitä, joita aletaan syntetoida välittömästi patogeenihyökkäyksen jälkeen. Stilbeenit ovat fytoaleksiineja, joita vain tietyt lajit tuottavat. Synteesiin tarvittavia prekursoreita löytyy kuitenkin kaikilta kasveilta. Kun tupakkaan siirrettiin viinirypäleen stilbeenisyntaasigeeni, se saatiin kestävämmäksi *Botrytis cinerea* -patogeenia vastaan (Hain ym. 1993).

Jotkin kasvopatogeenit tuottavat myrkyllisiä aineita, jotka saavat aikaan taudin infektoidussa kasvissa. Eräs tällainen bakteeri on *Pseudomonas syringae*. Taudin leviäminen voidaan saada estettyä, jos kasviin siirretään entsyymi, joka saa aikaan myrkyllisyyden muuttamisen vaarattomaksi (Anzai ym. 1989). Kasviin voidaan myös siirtää toksiinia kestävä kohdeproteiini (de la Fuente-Martínez ym. 1992).

Kasvit reagoivat patogeenien hyökkäykseen myös tuottamalla happiradikaaleja (AOS, *active oxygen species*), esimerkiksi vetyperoksidia. Vetyperoksidi muun muassa aktivoi fytoaleksiinien tuotantoa. Wu ym. (1995) siirsivät perunaan *Aspergillus niger* -bakteerin **glukoosioksidaasigeenin**, joka hapettaa glukoosia tuottaen vetyperoksidia. Tätä entsyymiä ei luonnostaan ole kasveilla, ja kasvanut vetyperoksidin määrä sai aikaan kestävyuden sekä bakteeri- että sienipatogeneja vastaan.

Bakteeritauteja kestävien kasvien tutkimus ei ole vielä yhtä pitkällä kuin sienitauteja kestävien kasvien kehittäminen. Kasveista on nyttemmin eristetty ja kloonattu yksittäisiä kestävyysgeenejä, jotka tunnistavat tietyn patogeenin ja käynnis-

tävät puolustusreaktion (Martin ym. 1993, Bent ym. 1994). Nämä geenit on tunnettu jo pitkään ja niitä on käytetty hyväksi perinteisessä kasvinjalostuksessa, mutta niiden molekyylibiologinen tutkiminen ja käyttäminen geeniteknologiassa on vasta aluillaan.

## 6.5 Stressinkestävyys

### 6.5.1 Kuiva- ja suolastressi

Veden puute on yksi huomattavimpia kasvin kasvua hidastavia stressitekijöitä luonnossa. Kasvi kärsii vesistressistä myös silloin, kun maaperässä on runsaasti suolajä. Suolansieto olisi tärkeä ominaisuus kasveilla etenkin alueilla, joita on aikaisemmin kasteltu voimakkaasti ja joiden maaperä on kastelun loputtua muuttunut suolaiseksi ja emäksiseksi.

Useat kasvit ja bakteerit syntetoivat stressiolosuhteissa niin sanottuja **osmolyyttejä** pitääkseen yllä vesitasapainoa solujen sisällä. Tällaisia osmolyyttejä ovat muun muassa proliini, erilaiset sokerialkoholit ja glysiinibetaiini. Tutkittaessa mahdollisuuksia kuiva- ja suolastressiä sietävien kasvien kehittämiseen onkin lähinnä keskitytty osmolyyttien tuottamiseen ylimäärin kasvisoluissa tai kasvista luonnostaan puuttuvan osmolyytin siirtämiseen kasviin.

Tarczynski ym. (1993) siirsivät tupakkaan bakteerilta peräisin olevan mannitoli-1-fosfaattidehydrogenaasientsyymin, jolloin tupakan soluihin kertyi **mannitolia**, jota siellä ei normaalisti syntetoida. Kun siirtogeenistä tupakkaa sen jälkeen kasvatettiin korkeassa suolapitoisuudessa, se kasvoi verrokkikasveja paremmin. Kishor ym. (1995) siirsivät puolestaan tupakkaan geenin, joka sai aikaan **proliinin** ylituotannon soluissa. Korkeassa suolapitoisuudessa kasvatetut siirtogeeniset kasvit kasvoivat ja kukkivat sekä pystyivät säätämään solujen vesitasapainoa paremmin kuin verrokkikasvit. Pilon-Smits ym. (1995) siirsivät tupakkaan *Bacillus subtilis* -bakteerin fruktosyyli transferaasigeenin, jolloin tupakan soluihin kertyi **fruktaaneja**, fruktoosista koostuneita molekyyliä, joita tupakassa ei normaalisti syntetoida. Kuivastressiä simuloitiin PEG-käsittelyn avulla ja todettiin, että fruktaaneja tuottavat siirtogeeniset tupakat kasvoivat käsittelyolosuhteissa paremmin kuin verrokkikasvit. Fruktaanien vaikutustapaa ei kuitenkaan tiedetä. Soluihin kertyvät määrät ovat niin pieniä, etteivät ne saa aikaan varsinaisia osmoottisia vaikutuksia. **Glysiinibetaiini** on yksi kasveissa yleisimmistä esiintyvistä osmoottisista suoja-aineista. Hanson ym. (1994) löysivät kuivassa ja suolaisessa ympäristössä esiintyvistä *Plumbaginaceae*-heimon kasveista lisäksi muita samansukuisia aineita (koliini-O-sulfaatti,  $\beta$ -alaniini-, proliini- ja hydroksiproliinibetaiini), joita kutakin esiintyy aina tietynlaisessa ympäristössä ja joita käyttämällä voitaisiin ehkä muuttaa kasvien stressinkestävyyttä.

### 6.5.2 Kylmästressi

Monet kasvit ovat herkkiä matalalle lämpötilalle. Lämpötilassa, jossa ei vielä tapahdu jäätymistä (0–15°C), kasvien kasvu hidastuu ja lehdet ja juuret voivat vaurioitua. Tällaisia kylmänherkkiä kasveja ovat muun muassa riisi, maissi, puuvilla, soijapapu, papu, tomaatti ja kurkku. Matala lämpötila saa aikaan muun muassa fotosynteesin ja proteiinisynteesin estymisen ja hengityksen hidastumisen. Kaikkien näiden oireiden taustalla ovat kylmän aiheuttamat muutokset solun eri kalvorakenteissa.

Kylmälle herkkien kasvien solukalvoissa on paljon tyydyttyneitä rasvahappoja ja kylmää kestäville kasveille tyydyttymättömiä (kaksoissidoksia sisältäviä) rasvahappoja on vastaavasti enemmän. Kasvien kylmänsieto-ominaisuuksia onkin yritetty parantaa muuttamalla solukalvojen koostumusta. Ensimmäisissä kokeissa siirrettiin kylmää sietävältä kasvilta rasvahappoja desaturioivan (kaksoissidoksia lisäävän) entsyymien geeni kylmäherkkään kasviin (esimerkiksi Kodama ym. 1994), jolloin tyydyttymättömien rasvahappojen määrä nousi ja kylmänsieto parani jonkin verran. Kodaman ym. (1994) kokeissa siirtogeeniset kasvit vaativat kuitenkin palautumisen normaalissa lämpötilassa kylmäkäsittelyn jälkeen, kun taas todella kylmää sietävät kasvit pystyvät kasvamaan normaalisti matalassakin lämpötilassa.

Korkeampien kasvien **desaturaasientsyymit** ovat hyvin erikoistuneita ja ne pystyvät desaturioimaan vain tiettyjä rasvahappoja, minkä vuoksi niiden teho siirtogeenisissä kasveissa on rajallinen. Ishizaki-Nishizawa ym. (1996) eristivät *Anacystis nidulans* -syanobakteerista desaturaasigeenin, joka ei ole yhtä spesifinen kuin kasvien entsyymit ja joka desaturioi monenlaisia solukalvoissa esiintyviä lipidejä. Geeni siirrettiin tupakkaan ja sen eteen liitettiin lisäksi DNA-jakso, niin sanottu transitseptidi, jonka avulla geeni saatiin kulkeutumaan kloroplastiin ja ilmentymään siellä. Tämä entsyymi sai aikaan rasvahappojen desaturioinnin sekä kloroplastien että muiden soluorganellien kalvoissa, ja huomattavasti parantuneen kylmänsiedon. Kasvit kasvoivat normaalisti kylmäkäsittelyn aikana (1°C, 11 vrk) ja itivät hyvin normaalia matalammassa lämpötilassa (10°C).

Baertlein ym. (1992) siirsivät *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* -bakteerista eristetyn **jääkideaktiivisuutta** koodittavan *inaZ*-geenin tupakkaan ja perunaan. Jääkideiden muodostuminen ytimen ympärille kasvin soluseinässä ja solujen välitilassa (apoplastissa) jo melko korkeissa lämpötiloissa (yli -5°C) saa aikaan veden hitaan poistumisen solusta, jolloin solu kestää jäätymistä paremmin. Vastaavasti kasvisolun alijäähtyminen ja jään muodostuminen nopeasti lämpötilan laskiessa saa aikaan solujen rikkoutumisen ja kuoleamisen. Näissä alustavissa kokeissa Baertlein ym. (1992) saivat aikaan jään kiteytymislämpötilan nousemisen siirtogeenisillä kasveilla ja geeninsiirron optimoinnilla voitaisiin saada aikaan kasvien jäätymiskestävyyden paraneminen.

Entsyymeillä on yleensä tietty optimilämpötila, jossa ne toimivat tehokkaimmin. Samalla entsyymillä voi olla erilainen **lämpötilaoptimi** eri kasvilajeissa. Oliver ym. (1995) siirsivät kurkusta tupakkaan entsyymigeenin (NADH-hydroksipyruvaattireduktaasi, NADH-HPR), jonka lämpötilaoptimi on erilainen kuin tupakan omalla entsyymillä. Kun molemmat geenit saatiin ilmentymään tupakassa, saatiin aikaan entsyymien lämpötilaoptimien huomattava laajeneminen. Tämä voi auttaa kasvia sopeutumaan vaihteleviin lämpötiloihin, jos kyseinen entsyymi on osa tärkeää biokemiallista reaktiketjua.

Monet kylmien merien kalat selviävät hyvin matalissa lämpötiloissa tuottaen "jäänestoaineita", jotka alentavat veren jäätymispistettä sitoutumalla muodostuneisiin jääkiteisiin ja estämällä niiden kasvamisen. Kenward ym. (1993) siirsivät erään kampelalajin (*Pseudopleuronectes americanus*) **jäänestoproteiinia** (AFP, *antifreeze protein*) koodittavan geenin tupakkaan. Proteiinin todettiin kerääntyvän kasvisoluihin matalassa lämpötilassa, mutta sillä ei ole havaittu olevan vaikutusta kasvien kylmänkestävyyteen.

Happiradikaaleja syntyy monenlaisissa stressiolosuhteissa (korkeassa valossa, kylmässä lämpötilassa tai veden puutteessa, ilmansaasteiden tai herbisidien vaikutuksesta) ja ne voivat vahingoittaa solurakenteita. Kasvisolut sisältävät erilaisia **superoksididismutaaseja** (SOD), jotka muuttavat näitä happiradikaaliyhdisteitä vaarattomiksi. Kun kasvissa ylituotetaan tällaista entsyymiä, happiradikaalien aiheuttamat vahingot solussa vähenevät (Bowler ym. 1991, Sen Gupta ym.



1993). Tämän menetelmän avulla esimerkiksi sinimailanen on saatu kestävämpään paremmin kuivuus- ja kylmästressiä (McKersie ym. 1996). Tupakan kloroplastiin siirrettynä SOD vähensi otsonin aiheuttamia vaurioita (Van Camp ym. 1994).

### 6.5.3 Raskasmetallit

Kadmium on haitallinen raskasmetalli. Ihminen saa suurimman osan kadmiumista ravintokasvien kautta, minkä vuoksi on tutkittu mahdollisuuksia kehittää kadmiumia solukkoonsa vähemmän kerääviä kasveja. Kadmium on suurina määrinä myrkyllinen myös kasveille.

Eläimiltä ja nyttemmin myös kasveilta (Robinson ym. 1993) on löydetty raskasmetalleja sitovia proteiineja, **metallotioniineja**. Kasveissa esiintyy myös pienempiä, kysteiinipitoisia peptidejä, jotka sitovat kadmiumia, mutta ne eivät ole yhtä tehokkaita kuin metallotioniinit. Lefebvre ym. (1987) siirsivät ensimmäisinä nisäkkään metallotioniingeenin kasviin kukkakaalin mosaiikiviruksen avulla ja saivat geenin ilmentymään siellä. Maiti ym. (1989) siirsivät hiiren metallotioniingeenin tupakkaan ja tutkivat sen vaikutusta siirtogeenisten kasvien kadmiumin sietoon sekä kadmiumin kerääntymiseen kasvisolukkoon. Nuorilla taimilla kadmiumin sieto lisääntyi ja kadmiumin kerääntyminen lehtisolukkoon väheni.

Eräät bakteerit voivat muuttaa raskasmetalleja vaarattomiksi pelkistämällä ioneja vähemmän myrkylliseen muotoon. **Elohopeaionireduktaasi** (MerA) pelkistää  $Hg^{2+}$ -ionin vaarattommaksi metalliseksi elohopeaksi ( $Hg^0$ ), joka sitten haihtuu solusta. Rugh ym. (1996) siirsivät *merA*-geenin lituruohoon ja totesivat siirtogeenisen kasvin kasvavan elohopeapitoisuuksissa, joissa verrokkikasvit kuolivat. Tällaisia kasveja voitaisiin käyttää muun muassa raskasmetallipitoisen maaperän puhdistamisessa.

Maaperän happamoituminen on ongelmana noin 40 prosentilla maapallon viljelyalasta. Happamoitumisen seurauksena **alumiini** muuttuu liukoiseksi ja se on myrkyllinen useille kasveille. Alumiini estää juurten kehittymisen ja alumiinia sietävien kasvien onkin todettu pystyvän erittämään alumiinia juuren kärjestä. Alumiinin erityys on yhteydessä orgaanisten happojen eritykseen. Orgaaniset hapot, muun muassa sitruunahappo, kelatoivat alumiini-ioneja solukalvon ulkopuolelle. De la Fuente ym. (1997) saivat aikaan alumiinia paremmin sietäviä kasveja siirtämällä tupakkaan ja papaijaan *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin sitraattisyntaasigeenin. Juurisolujen kasvanut sitraatintuotto sai aikaan parantuneen alumiinin siedon näissä kasveissa.

## 6.6 Laatuominaisuudet

### 6.6.1 Rasvahappokoostumuksen muuttaminen

Kasvien tuottamia öljyjä voidaan käyttää sekä ravinnoksi että erilaisiin teollisiin ja muihin tarkoituksiin (muun muassa detergentit, saippuat, voiteluaineet, kosmetiikka, lääkeaineet ja muovit). Kasvit varastoivat öljyjä triglyseridien eli triasyyliglyserolien muodossa, joissa glyserolirunkoon on esteröitynyt kolme rasvahappoa (rasvahappojen rakenteesta ja nimeämisestä on lisätietoa liitteessä 1). Kasvit sisältävät erilaisia määriä eri rasvahappoja. Rasvahappokoostumuksen perusteella kasveja viljellään ja käytetään eri tarkoituksiin. Tärkeimmät öljykasvit maailmalla ovat soijapapu, öljypalmu, rapsi ja auringonkukka. Geeninsiirtomenetelmiä on sovellettu eniten rapsiin.

Rapsiöljy, kuten muutkin lauhkean vyöhykkeen kasvien öljyt, sisältää eniten tyydyttymättömiä 18-hiilisiä rasvahappoja, oleiinihappoa (18:1), linolihappoa (18:2) ja linoleenihappoa (18:3) ja näiden lisäksi jonkin verran tyydyttyneitä steariini- (18:0) ja palmitiinihappoja (16:0). 12-hiilistä **lauriinihappoa** (12:0) käytetään teollisesti detergenttien valmistuksessa ja sitä eristetään normaalisti trooppisista monivuotisista lajeista, kookospähkinästä ja öljypalmusta. Kehitettäessä lauriinihappopitoista rapsia siihen siirrettiin *Umbellularia californica* -kasvista entsyymi, joka pysäyttää rasvahappoketjun pitenemisen ennen aikaisesti, ja syntyy 12-hiilistä lauriinihappoa (Voelker ym. 1992). Kun haluttiin saada aikaan runsaasti **steariinihappoa** (18:0) sisältävä kasvi, siihen siirrettiin antisense-RNA entsyymistä, joka normaalisti lisää steariinihappoon kaksoissidoksia ja desaturoi sen eli muuttaa sen tyydyttymättömäksi. Estämällä tämän entsyymin toiminta saatiin steariinihapon määrä rapsin siemenissä nousemaan 40 prosenttiin rasvahappojen kokonaismäärästä (Knutzon ym. 1992). Steariinihappoa käytetään etenkin margariinien valmistuksessa.

Yuan ym. (1995) tutkivat kahden *Lauraceae*-heimoon kuuluvan kasvin tioesteraasientsyymejä siirtämällä niitä *E. coliin* ja tutkimalla niiden ilmentymistä ja rasvahappojen kerääntymistä soluihin. Entsyymit olivat hyvin homologisia ja poikkesivat toisistaan vain noin kolmenkymmenen aminohapon osalta. Tämä eroavaisuus sai kuitenkin aikaan sen, että lauriini(12:0)- ja myristiinihappoja (14:0) kertyi erilaisia määriä eri entsyymejä sisältäviin soluihin. Tämä osoittaa sen, että pienilläkin muutoksilla voidaan saada aikaan entsyymin substraattispesifisyyden ja siten rasvahappokoostumuksen muuttuminen.

**Monitydyttymättömät rasvahapot** ovat ravinnossa terveellisempiä kuin tyydytetyt. Rasvahappojen tyydyttyneisyysastetta voidaan muuttaa desaturaasientsyymien avulla. Grayburn et al. (1992) siirsivät tupakkaan rotan desaturaasigeenin, jolloin 16:0- ja 18:0-rasvahappojen määrä väheni ja vastaavasti 16:1-rasvahapon määrä lisääntyi. **γ-linoleenihappoa** käytetään monissa luontaistuotteissa mutta sitä esiintyy luonnostaan vain tietyissä kasvilajeissa eikä lainkaan öljykasveissa. Reddy ja Thomas (1996) siirsivät tupakkaan syanobakteerin δ<sup>6</sup>-desaturaasigeenin, jolloin tupakan lehtiin kerääntyi pieniä määriä gammalinoleenihappoa sekä lisäksi monitydyttymättömää oktadekatetraenoiinihappoa, jota voidaan käyttää teollisuudessa filmien, vahojen ja muovien valmistukseen. Siemenissä rasvahappojen kerääntymistä ei havaittu, mutta siihen voitaisiin päästä esimerkiksi siemenspesifistä promoottoria käyttämällä.

Kasvit varastoivat siementen triglyseridit erillisiin organelleihin, **oleosomeihin**. Niitä ympäröi yksinkertainen fosfolipidikalvo, jonka pinnalla on proteiineja, oleosiineja. Oleosiinit ovat lipofiilisiä proteiineja ja ohjautuvat spesifisesti oleosomeihin. Kun oleosiinigeeniin liitetään vieras geeni, tämä saadaan ohjattua oleosomeihin, jotka taas pystytään helposti eristämään muusta siemenmateriaalista. Näin kasvin siemenissä voidaan tuottaa ja niistä voidaan helposti eristää suuria määriä haluttua proteiinia tai peptidiä. Van Rooijen ja Moloney (1995) liittivät oleosiinigeeniin GUS-merkkigeenin siemenspesifisen promoottorin kanssa ja siirsivät sen rapsiin. GUS-aktiivisuutta löytyi pääasiassa siemenistä ja se saatiin eristettyä niistä oleosomien yhteydessä. Kun oleosiini- ja GUS-alueiden väliin lisättiin katkaisukohta proteinaasille, GUS-geenituote saatiin eristettyä oleosomeista. Proteiinia voidaan lisäksi varastoida siemenissä pitkiä aikoja ja eristää vasta tarvittaessa.

## 6.6.2 Aminohappokoostumuksen muuttaminen

Kasvit ja mikrobit pystyvät syntetisoimaan kaikkia tarvitsemiaan aminohappoja, mutta eläinten täytyy saada välttämättömiä aminohappoja (valiini, lysiini, leusiini, treoniini, tryptofaani, isoleusiini, metioniini ja fenyyialaniini) ravinnossaan päivittäin. Useat eläinten rehuksi ja ihmisen ravinnoksi käytettävät kasvit sisältävät vain pieniä määriä näitä välttämättömiä aminohappoja. Ravinnon laadun parantamiseksi on kehitetty keinoja, joilla näiden aminohappojen määrää kasveissa saataisiin lisättyä.

Soijapavun ja maissin siemeniä käytetään paljon eläinten rehuna. Soijapavun siemenet sisältävät kuitenkin vain vähän rikkiä sisältäviä aminohappoja metioniinia ja kysteiniiniä. Maissin siemenissä on vastaavasti liian vähän lysiiniä ja tryptofaania, jolloin näitä aminohappoja pitää yleensä lisätä rehuun erikseen.

Muutamien kasvien siementen varastoproteiinit sisältävät paljon **metioniinia**. Näitä metioniinipitoisia siemenproteiineja on eristetty muun muassa maissista, riisistä, parapähkinästä (*Bertholletia excelsa*) ja auringonkukasta. Zeiinit ovat maissin siementen varastoproteiineja. Näistä yksi, niin sanottu 15 kDa:n proteiini, sisältää erityisen runsaasti metioniinia. Bagga ym. (1995) halusivat tutkia mahdollisuuksia rehukasvien aminohappokoostumuksen parantamiseksi tämän proteiinin avulla. Kun geeni siirrettiin tupakkaan, proteiinia kerääntyi pysyvästi sekä lehtiin että siemeniin.

Parapähkinän siementen varastoproteiinit, niin sanotut 2S-albumiinit, sisältävät runsaasti metioniinia, mutta eivät lainkaan **tryptofaania**. Marcellino ym. (1996) lisäsivät 2S-proteiineihin tryptofaania keinotekoisesti paikkaohjatun mutageenein avulla muuttaen yhden tai useamman aminohapon tryptofaaniksi. Muunnellun 2S-albumiinin geeni siirrettiin tupakkaan ja sen todettiin toimivan siellä normaalisti. Tällä tavoin voidaan muuttaa yksittäisten proteiinien aminohappokoostumusta.

**Treoniini** on aminohappo, jonka synteesiä kasveissa kontrolloidaan niin sanotun feedback-inhibition avulla eli kasvissa oleva vapaa treoniini saa aikaan synteesireitin ensimmäisen entsyymin (aspartaattikinaasin) toiminnan estymisen. Shaul ja Galili (1992) siirsivät tupakkaan *E. coli* -bakteerista eristetyn aspartaattikinaasin, joka ei reagoi vapaan treoniinin määrään. Tämän geeninsiirron avulla treoniinia saatiin kerääntymään kasvisoluihin. Se sai aikaan myös isoleusiinin ja lysiinin määrien lievän lisääntymisen, sillä näiden aminohappojen synteesi tapahtuu osittain samaa tietä kuin treoniinin.

## 6.6.3 Hiilihydraattikoostumuksen muuttaminen

Kasvit varastoivat hiilihydraattia pääasiassa tärkkelyksenä. **Tärkkelys** koostuu glukoosiyksiköistä, jotka liitetään yhteen joko suoraketjuiseksi amyloosiksi tai haarautuneeksi amylopektiiniksi. Amylopektiiniä on yleensä suhteessa tärkkelyksen kokonaismäärään enemmän. Tärkkelystä käytetään ruoka-aineissa ja juomissa ja tärkkelyksen muunneltuja muotoja käytetään moniin teollisiin tarkoituksiin. Jos tärkkelyksen laatua voitaisiin muuttaa jo kasvissa, säästyttäisiin useilta kemiallisilta käsittelyiltä. Tuottavuutta voitaisiin parantaa lisäämällä tärkkelyksen määrää kasveissa.

Peruna on erityisen tärkkelyspitoinen kasvi. Sen mukuloiden kuivapainosta on 75 % tärkkelystä. Perunaan on myös helppo siirtää geenejä, minkä vuoksi tärkkelyskoostumuksen muuttamista on sillä tutkittu paljon.

Eräs tärkkelyksen synteesin avainentsyymeistä on synteesin alkuvaiheessa toimiva ADP-glukoosipyrofosforylaasi. Tämän entsyymin toiminta on kasvissa tiukasti säädelty, mutta siirtämällä kasviin *E. colista* vastaava geeni mukulaspesifisen

promoottorin kanssa tärkkelyksen määrä saatiin kasvamaan 35 % (Stark ym. 1992). Tämän entsyymin toiminta voidaan vastaavasti estää antisense-tekniikan avulla (Müller-Röber ym. 1992), jolloin tärkkelyksen määrä vähenee ja liukoisten sokerien (glukoosin ja sakkaroosin) määrä lisääntyy.

Tärkkelyssyntaasientsyymi GBSS (*granule-bound starch synthase*) vaikuttaa siihen, kuinka paljon amyloosia suhteessa tärkkelyksen kokonaismäärään muodostuu. Kun perunan GBSS:n toiminta estetään antisense-RNA:n avulla (Visser ym. 1991), amyloosia ei syntetoida lainkaan.

**Syklodekstriinit** ovat sykliisiä oligosakkarideja, jotka koostuvat 6–8 glukosimolekyylistä. Syklodekstriinejä muodostavia glykosyylitransferaasientsyymejä tavataan vain joiltakin bakteereilta. Syklodekstriinejä käytetään muun muassa arominvahventeina ja lääkeaineissa sekä esimerkiksi kofeiinin poistamiseen elintarvikkeista. Niitä tuotetaan normaalisti käymissammioissa bakteerien avulla, jolloin lähtöaineena käytetään valmiiksi hydrolysoitua tärkkelystä. Oakes ym. (1991) siirsivät *Klebsiella* -bakteerista geenin perunaan ja saivat pieniä määriä syklodekstriinejä muodostumaan perunan mukulassa.

**Fruktaanit** ovat fruktoosiyksiköistä koostuvia molekyylejä, jotka toimivat varastohiilihydraatteina joillakin lajeilla. Lyhytketjuisia fruktaaneja voidaan käyttää vähäkalorisina makeutusaineina, sillä ne eivät hajoa ihmisen ruuansulatuselimistössä. Fruktaaneja syntetioivien kasvien joukossa ei kuitenkaan juurikaan ole suoraan ravinnoksi käytettäviä kasveja. Tämän vuoksi onkin tutkittu mahdollisuuksia fruktaanien siirtämiseksi ravintokasveihin. Myös muutamilla bakteereilla on entsyymi, joka muuttaa sakkaroosia fruktaaniksi. Ebskamp ym. (1994) siirsivät *Bacillus subtilis* -bakteerin fruktosyylitransferaasigeenin tupakkaan, jolloin fruktaaneja kerääntyikin kasvin kaikkiin solukoihin ja vaikka tupakka normaalisti varastoikin sokereita tärkkelyksenä, fruktaanien synteessillä ei ollut vaikutusta kasvin normaaliin kasvuun.

**Taumatini** ja **monelliini** ovat **proteiineja**, joita on käytetty makeutusaineena. Taumatini esiintyy vain erään afrikkalaisen kasvin (*Thaumatococcus daniellii*) hedelmän siemenvaipassa. Sitä voidaan käyttää sekä makeuttajana että arominvahventeena. Taumatiinigeeni on siirretty ainakin perunaan (Witty 1990). Myös monelliinia on eristetty afrikkalaisesta kasvista (*Dioscoreophyllum cumminsii*) ja se on 100 000 kertaa sokeria makeampi yhdiste. Normaalisti se koostuu kahdesta alayksiköstä ja hajoaa sen vuoksi helposti. Kun alayksiköiden geenit yhdistetään keino-tekoisesti, syntetioitu proteiini vastaa alkuperäistä ja on makea, mutta myös pysyvämpi. Peñarrubia ym. (1992) siirsivät tällaisen monelliinigeenin tomaattiin hedelmäspezifisen promoottorin kanssa. E8-promoottori sai aikaan geenin ilmentymisen tomaatin hedelmän solukossa. Koska E8-promoottori indusoituu hedelmän kypsymisen alkaessa ja koska erällä hedelmillä kypsyminen alkaa etyleenin vaikutuksesta, kypsymättömien hedelmien etyleenikäsittelyllä saatiin monelliinin tuotantoa vielä huomattavasti lisättyä.

## 6.7 Muut ominaisuudet

### 6.7.1 Lääkeaineiden tuottaminen kasveissa

#### Vasta-aineet

Vasta-aineilla on tärkeä tehtävä eläinten immuunijärjestelmässä. Kasvit eivät luonnostaan tuota vasta-aineita, mutta ne voidaan saada syntetioimaan vieraita vasta-aineita soluissaan suurina määriä. Hiatt ym. (1989) loivat perustan vasta-aineiden

tuottamiselle kasvisoluissa saatuaan hiiren immunoglobuliinigeenin ilmentymään tupakassa. He siirsivät vasta-aineen  $\gamma$ - ja  $\kappa$ -ketjun eri tupakkalinjoihin ja risteyttivät linjat keskenään. Tällöin muodostui kasvi, jossa syntetoiitiin molempia ketjuja ja ketjut liittyivät yhteen toimivaksi vasta-ainemolekyyliksi. Sitten menetelmää on vielä kehitetty. Ma ym. (1995) siirsivät eri tupakkalinjoihin immunoglobuliini A:n neljä alayksikköä ja risteyttivät linjoja keskenään, kunnes saivat kaikki neljä alayksikköä ilmentymään yhdessä linjassa. Tätä vasta-ainetta voitaisiin esimerkiksi lisätä hammastahnaan, sillä se tuhoaa kariesta aiheuttavaa *Streptococcus mutans* -bakteeria.

Fiedler ja Conrad (1995) siirsivät erään vasta-ainegeenin yksiketjuisen fragmentin tupakkaan siemenspesifisen promoottorin kanssa. Vasta-aine kerääntyi tupakan siemeniin ja sen säilymistä siemenissä tutkittiin pitämällä niitä huoneenlämmössä. Vuoden säilytyksen jälkeen vasta-aineen määrä ja aktiivisuus olivat pysyneet muuttumattomina.

Vasta-aineiden avulla voidaan saada aikaan myös kestävyys kasvivirusia vastaan. Tavladoraki ym. (1993) kehittivät monoklonaalisen vasta-aineen AMCV:n kuoriproteiinia vastaan ja saivat tupakassa ilmentymään yhdeksi ketjuksi yhdistetyn fragmentin tästä vasta-aineesta. Kun siirtogeenisiä kasveja testattiin, ne kestivät virusinfektiota paremmin kuin verrokkikasvit.

## Rokotteet

Kasvien käyttämistä rokotteiden tuotantoon on viime aikoina tutkittu paljon. Tähän asti rokotteita on valmistettu bakteereiden avulla kalliilla käymismenetelmillä, mikä estää niiden laajan käytön muun muassa kehitysmaissa. Jos rokotteina toimivat proteiinit saataisiin ilmentymään kasveissa ja etenkin niiden syötävissä osissa, rokotteet voitaisiin saada suoraan ravinnosta. Tällöin niiden tuotanto ja jakaminen väestölle olisi huomattavasti halvempaa ja helpompaa kuin tähänastisilla menetelmillä. Kasvit pystyvät syntetisoimaan, glykosyloimaan ja kokoamaan nisäkkäistä peräisin olevia proteiineja ja niiden ilmentyminen on tehokasta. Kun proteiinit lisäksi ovat kasveissa sopivassa liukoisessa muodossa, siirtogeeniset kasvit ovat erinomainen vaihtoehto bakteeri- ja nisäkkäsoluviljelmille (Ma ym. 1997).

Mason ym. (1992) siirsivät hepatiitti B -viruksen pinta-antigeenia (HBsAg) koodittavan geenin tupakkaan ja saivat sen ilmentymään tupakan lehdissä. Antigeenipartikkelit olivat immunogeenisiä (vastustuskykyä lisääviä), mutta tässä tapauksessa geenin ilmentyminen oli niin vähäistä, ettei näitä siirtogeenisiä kasveja olisi voitu käyttää varsinaiseen rokotteiden tuotantoon. Tupakan lehdet sisältävät myös suuria määriä myrkyllisiä alkaloideja, joten niitä ei voida käyttää sellaisenaan ja kasvin tuottamat proteiinit pitäisi eristää lehdistä. Geenejä onkin siirretty muun muassa perunan mukuloihin, joita sitten on testattu eläimillä. Haq ym. (1995) siirsivät perunaan *E. coli*n enterotoksiinigeenin, ja kun siirtogeenisten kasvien mukuloita syötettiin hiirille, niissä havaittiin vasta-aineiden muodostumista. Ihmisen ravinnoksi käytettäessä peruna pitää kuitenkin keittää, jolloin siinä olevat proteiinit denaturoituvat. Viime aikoina onkin tutkittu mahdollisuuksia muun muassa banaanin käyttöön tuotettaessa syötäviä rokotteita ihmistä varten.

Ma ym. (1997) havaitsivat siirtogeenisessä tupakassa ja perunassa tuotetun sokeritaudin autoantigeenin, hiiren glutamiinihappodekarboksylaasin (GAD67), estävän sokeritaudin kehittymistä hiirissä, kun siirtogeenisiä kasveja syötettiin niille. Jos syötäviin kasveihin siirrettäisiin ihmisen vastaavaa proteiinia (GAD65), voitaisiin ehkä estää sokeritaudin kehittyminen riskiryhmään kuuluville ihmisille.

Myös kasvivirusia voidaan käyttää vektoreina, kun halutaan tuottaa kasvisolussa suuria määriä vierasta proteiinia. Turpen ym. (1995) liittivät malariainfektiossa toimivia DNA-jaksoja TMV:n kuoriproteiinigeeniin ja infektoivat tupakan tämän viruksen avulla. Virus leviää systeemisesti kasviin ja tuottaa suuria määriä

muunnettuja viruspartikkeleita. Nämä partikkelit voidaan eristää kasvista ja haluttu peptidi vastaavasti viruspartikkeleista. Dalsgaard ym. (1997) siirsivät anti-geenijakson eläimiä infektoivasta parvoviruksesta kasviviruskuksen kuoriproteiiniin ja tuottivat näitä kimeerisiä viruksia lehmänpavussa. Tätä kasvissa tuotettua virusta käytettiin rokotteenä suoraan parvoviruskuksen kohdelajilla, minkillä, jolloin voitiin todeta, että se esti taudin puhkeamisen.

### Muut lääkeaineet

Koisokasvien heimossa (*Solanaceae*) on useita lajeja, jotka tuottavat erilaisia myrkyllisiä alkaloideja. Skopolamiini on alkaloidi, jota käytetään lääkkeenä ja joka vaikuttaa keskushermostoon. Tietyt lajit tuottavat luonnostaan paljon skopolamiinia, ja näitä lajeja viljellään kaupallisissa tarkoituksissa. Skopolamiinia syntetoidaan kasveissa hyoskyamiinista hydroksylaation ja epoksidaation avulla. Molemmissa reaktioissa toimii sama entsyymi, hyoskyamiini-6-hydroksylaasi (H6H). Belladonna (*Atropa belladonna*) sisältää runsaasti hyoskyamiinia, mutta vähän skopolamiinia. Kun hullukaalista (*Hyoscyamus niger*) siirrettiin H6H-entsyymin geeni belladonnaan, kasvin sisältämä hyoskyamiini saatiin lähes kokonaan muuttumaan skopolamiiniksi (Yun ym. 1992).

### 6.7.2 (Koiras)steriliteetti

Heteroosijalostus perustuu niin sanottuun hybridielinvoimaan eli heteroosiin. Heteroosijalostuksessa ristipölytyksen varmistaminen on tärkeää. Joillakin lajeilla ristipölytys on varmistettu poistamalla hedekukinnot käsin. Esimerkiksi maissilla tätä menetelmää käytetään vieläkin, mutta se on työlästä ja kallista. Hybridisemenen valmistus voimakkaasti itsepölytteillä lajeilla on myös hankalaa. Heteroosijalostukseen koirassteriilit kasvit soveltuvatkin hyvin. Koirassteriliteetti on eräs keino estää siirtogeenien leviäminen ympäristöön siitepölyn ja siemenien kautta. Metsäpuut voidaan saada kasvamaan tehokkaammin, kun resurssien käyttäminen kukkimiseen ja siitepölyn muodostumiseen on estetty. Monien puiden siitepöly aiheuttaa allergioita ihmisillä. Tätäkin ongelmaa voitaisiin vähentää estämällä siitepölyn muodostuminen.

CMS eli sytoplasminen koirassteriliteetti on mitokondriogeenien aikaansaa- ma ominaisuus. Koska mitokondriot periytyvät maternaalisesti, voidaan CMS-emikasvin avulla saada aikaan sataprosenttisesti koirassteriilejä kasveja. Tumassa on lisäksi dominantteja palauttajageenejä (*restorer; Rf*), jotka nimensä mukaisesti voivat palauttaa lisääntymiskyvyn koirassteriileille  $F_1$ -hybridikasveille. CMS:ä on käytetty useilla kasveilla lisääntymiskontrollimenetelmänä. Joillakin lajeilla siihen liittyy kuitenkin epätoivottuja ominaisuuksia, muun muassa maissilla alttiutta sienitauksille, rapsilla steriliteetin häviämistä ja vehnällä palauttajageenien epätavallista toimintaa.

Steriliteetti voidaan saada aikaan myös muokkaamalla geenejä, jotka osallistuvat kasvien lisääntymiselimien kehitykseen. Kukkasolukko voidaan muuttaa lisääntymiskyvyttömäksi siirtämällä kasviin solumyrkkyä koodittava geeni solukospesifisen promoottorin kanssa, tai kasvin kukkasolukon luonnollinen kehittyminen voidaan estää esimerkiksi antisense-menetelmän avulla.

Mariani ym. (1990) siirsivät tupakkaan ja rapsiin **ribonukleasigeenin** tupakasta eristetyn TA29-promoottorin kanssa, joka sai aikaan geenin ilmentymisen vain ponneen lokeron seinän tapetum-solukossa siitepölyn muodostumisvaiheessa. Tapetum-solukko toimii siitepölyhiukkasten ravinnonlähteenä. Kun ribonukleasii hajottaa sen, normaaleja siitepölyhiukkasia ei muodostu ja kasvista tulee koirassteriili. Hybridikasvin pitäisi toisaalta olla lisääntymiskykyinen, varsinkin jos

satona kerätään hedelmiä tai siemeniä. Sama ryhmä onnistui palauttamaan lisääntymiskyvyn siirtämällä kasveihin **riboleaasi-inhibiittorigeenin** saman promootorin alaisuudessa ja risteyttämällä näitä kasveja ribonukleaasigeenin sisältävien koirassteriilien kasvien kanssa (Mariani ym. 1992). Ribonukleaasi-inhibiittori estää ribonukleaasin toiminnan muodostaen kompleksin tämän kanssa, jolloin lisääntymiskyky palautuu.

Thorsness ym. (1991) käyttivät samaa periaatetta siirtäessään tupakkaan **difteriatoksiini A** -geenin emi- ja siitepölyspesifisen promootorin kanssa. Toksiini estää proteiinisynteesin ja saa siten aikaan solun tuhoutumisen. Geeni saatiin ilmentymään emin solukossa, jolloin siirtogeeniset kasvit olivat naarassteriilejä. Geeni vaikutti myös siitepölyn kehitykseen, jolloin 50-75 % siitepölyhiukkasista oli steriilejä. Tällä menetelmällä ei siis saatu aikaan täydellistä koirassteriiliteettiä.

*Agrobacterium rhizogenes* -bakteerin **rolC-geeni** kasviin siirrettynä saa aikaan lyhytkasvuisuutta, apikaalidominanssin ja lehtipigmenttien häviämistä sekä koirassteriiliteettiä. Siirrettyään tämän geenin tupakkaan Schmölling ym. (1993) pyrkivät lisääntymiskyvyn palauttamiseen risteyttämällä steriilejä kasveja kasvien kanssa, joihin oli siirretty *rolC*:n antisense-RNA. Lisääntymiskyky saatiinkin palautumaan jossakin määrin, mutta siementuotantoa ei saatu palautumaan normaalksi.

Siitepölyhiukkasten muodostuessa siitepölyn emoluista niiden ympärille syntetoidaan väliaikainen seinäkerros kalloosista. Meioosin jälkeen kallaasientsyymi ( **$\beta$ -1,3-glukanaasi**) hajottaa kalloosikerroksen ja siitepölyhiukkaset vapautuvat ponnien lokeroon. Worrall ym. (1992) siirsivät tupakkaan  $\beta$ -1,3-glukanaasin ja saivat sen ilmentymään ennenaikaisesti, jolloin kalloosikerros hajosi tavallista aikaisemmin eikä normaaleja siitepölyhiukkasia päässyt muodostumaan. Koirassteriiliteetti ei kuitenkaan ollut täydellinen vaan osa siitepölystä kehittyi normaalisti.

**Antisense-menetelmän** avulla voidaan estää lisääntymiselimien kehittymisen estämällä tiettyjen entsyymien toiminta. **Kalkonisyntaasi** (CHS) on avaintsyyymi flavonoidien synteesissä. Flavonoideilla on monia tehtäviä kasveissa ja kukkien lisäksi ne osallistuvat myös siitepölyn pigmentin tuotantoon. Estämällä siitepölyn pigmentaatio CHS:n antisense-RNA:n avulla on saatu aikaan koirassteriiliteetti petuniassa (van der Meer ym. 1992). Geeninsiirrossa käytettiin promootoria, joka toimii vain tapetum-solukossa, jotta saatiin estettyä pigmenttihäiriöt muissa kukan osissa (esimerkiksi terälehdissä).

### 6.7.3 Polymeerien tuottaminen kasveissa

**Polyhydroksialkanoaatit** (PHA) ovat polyestereitä, joita useat bakteerit keräävät soluihinsa. Näitä polymeerejä on monenlaisia, kovista muoveista kumimaisiin. Kaikki ovat kuitenkin täysin biologisesti hajoavia. Näitä muoveja tuotetaan nykyään fermentoimalla bakteereita sopivan hiililähteen (esimerkiksi glukoosi) kanssa, mutta niiden tuottaminen on huomattavasti kalliimpaa kuin synteettisten muovilaatujen. Tämän vuoksi onkin etsitty kasveja, joissa näitä PHA-yhdisteitä voitaisiin tuottaa suuria määriä. Öljyjä varastoivat kasvit (rapsi, auringonkukka ja soijapapu) ovat hyviä ehdokkaita biohajoavien muovien tuotantoon.

*Alcaligenes eutrophus* -bakteerissa **polyhydroksibutyraattia** (PHB) syntetoidaan asetyylikoentsyymi A (asetyyli-CoA):sta kolmen entsyymin avulla. Yhtä näistä entsyymeistä esiintyy luonnostaan kasveillakin. Kun kaksi muuta entsyymiä siirrettiin lituruohon, PHB:ia kerääntyi tumaan, vakuoliin ja sytoplasmaan pieniksi jyväsiksi (Poirier ym. 1992). Määrät olivat kuitenkin pieniä, ja siirtogeeniset kasvit olivat kooltaan pieniä ja tuottivat normaalia vähemmän siemeniä. Syynä arveltiin olevan asetyyli-CoA:n rajallinen määrä sytoplasmassa. Koska kasvin rasvahapot syntetoidaan asetyyli-CoA:sta kloroplasteissa, ohjaamalla siirtogeeni kloroplastiin

PHB:n määrä kasvisoluissa saatiin nousemaan satakertaiseksi (Nawrath ym. 1994). Kloroplastit toimivat normaalisti tärkkelyksen varastointieliminä eikä PHB:n kerääntymiselläkään havaittu haitallista vaikutusta solujen toimintaan ja siirtogeenisten kasvien kasvuun.

John ja Keller (1996) siirsivät kaksi PHB:n synteesiä koodittavaa geeniä puuvillaan, jolloin PHB:ia kerääntyi puuvillan kuidun ("haiventen") sisään. PHB:n kerääntyminen soluun ei vaikuttanut puuvillakuidun normaaleihin ominaisuuksiin, jotka johtuvat lähinnä epidermisolujen (kuitujen) soluseiniin kertyvistä aineista. Se sai kuitenkin aikaan kuitujen lämmönjohto-ominaisuuksien muuttumisen. PHB:ia sisältävät kuidut eristivät lämpöä paremmin kuin normaalit puuvillakuidut. Näitä kuituja voitaisiinkin käyttää esimerkiksi talvivaatteissa, jos soluihin kerääntyvän PHB:n määrä saataisiin vielä kasvamaan.

#### 6.7.4 Koristekasvien ominaisuudet

Koristekasveja on pitkään jalostettu risteyttämällä ja valikoimalla haluttuja ominaisuuksia. Geeninsiirron avulla koristekasveihin voidaan siirtää helposti ja nopeasti uusia ominaisuuksia vaikuttamatta risteytysjalostuksella jo saatuihin ominaisuuksiin.

Yleisin jalostuksen kohde koristekasveilla lienee kukan väri. **Flavonoidit** ovat yleisimpiä kasvipigmenttejä, jotka saavat aikaan erilaisia punaisen sävyjä. Petunian kukat ovat yleensä väriltään sinipunaisia, koska antosyaanien synteesiin tarvittava entsyymi ei osaa käyttää hyväkseen oranssinpunaisen pelargonidiinin syntymiseen vaadittavaa välimuotoa. Kun petuniaan siirrettiin maissista *A1*-geeni, joka koodittaa vastaavaa entsyymiä, mutta ei ole yhtä spesifinen, saatiin muodostumaan pelargonidiinia ja uuden värisiä, tiilenpunaisia kukkia (Meyer ym. 1987). **Kalkonisyntaasi** on avainentsyymi flavonoidipigmenttien muodostuksessa, ja estämällä kalkonisyntaasin toiminta voidaan saada aikaan uusia värisävyjä. Elomaa ym. (1993) siirsivät sädelatvaan kalkonisyntaasin antisense-RNA:n, jolloin pigmentin määrä siirtogeenisissä kasveissa väheni ja saatiin aikaan uuden värisiä kukkia.

**Etyleeni** on kasvihormoni, joka säätelee kypsymistä ja saa aikaan esimerkiksi kukkien lakastumisen. Lituruohosta on löydetty etyleenireseptori, joka ei kykene sitomaan etyleeniä. Tällöin kasvi ei reagoi ulkoisen tai sisäisen etyleenin määrään. Tomaattiin ja petuniaan siirrettynä mutanttireseptori hidasti kukkien kuihtumista ja hedelmien kypsymistä huomattavasti (Wilkinson ym. 1997). Tämä on hyödyllinen ominaisuus varsinkin koristekasveilla ja leikkokukilla. Kun etyleenin aikaansaamat vanhenemisreaktiot saadaan estettyä, kukat säilyvät kauniina pitkään. Myös ympäristöhaitat pienenevät, kun voidaan luopua etyleenin synteesiä tai toimintaa estävien haitallisten kemikaalien käytöstä kasvihuoneissa.

Pellegrineschi ym. (1994) käyttivät hyväkseen luonnollisen *Agrobacterium rhizogenes* -infektion aikaansaamia morfologisia muutoksia tuoksupelargonialla. Tämä hyväntuoksuinen kasvi ei ole ulkonäöltään kovin viehättävä pitkien nivelväliensä ja harvalehtisyytensä takia. *Agrobacterium rhizogenes* -infektio sai aikaan nivelvälien lyhenemisen ja lehtien määrän lisääntymisen kolminkertaiseksi, jolloin kasvi kokonaisuudessaan näytti tuuheammalta. Juurten muodostuminen nopeutui, mikä helpottaa kasvien lisäämistä pistokkaiden avulla. Lehdet olivat väriltään tummemman vihreitä, eikä kontrollikasveilla havaittavaa lehtien kellastumista tapahtunut. Lisäksi hyväntuoksuisten aromaattisten öljyjen määrä lisääntyi.



### 6.7.5 Muut ominaisuudet

Vehnäjauhojen hyvät **leivontaominaisuudet** johtuvat vehnänjyvän sisältämästä sitkoaineesta, **gluteenista**. Gluteeni on vehnänjyvän varastoproteiinien, gliadiinien ja gluteniinien, muodostama verkkomainen rakenne, joka saa aikaan taikinan sitkon. Leivontaominaisuuksiin vaikuttavat etenkin tietyt molekyylipainoltaan suuret gluteniinialayksiköt (HMW-GS), joita vehnässä lajikkeesta riippumatta on kuusi erilaista. Kaikki geenit eivät kuitenkaan ilmenny kaikissa lajikkeissa, ja gluteenin laatua onkin yritetty parantaa lisäämällä vehnälaajikkeisiin ylimääräisiä kopioita näistä geeneistä. Erityisesti yhden geenin (*1Ax1*) on todettu vaikuttavan vehnän leivontaominaisuuksiin, mutta se ei ilmenny läheskään kaikissa lajikkeissa. Altpeter ym. (1996) siirsivät tämän geenin lajikkeeseen, jolta se luonnostaan puuttui. Geeni saatiin ilmentymään ja toimimaan vehnässä, ja sen todettiin lisäävän gluteenin kokonaismäärää ja siten parantavan lajikkeen leivontaominaisuuksia.

**Hedelmien laatua, koostumusta ja ulkonäköä** voidaan parantaa geeninsiirtojen avulla. Martineau ym. (1995) pyrkivät lisäämään kiinteiden aineiden määriä tomaatin hedelmässä siirtämällä siihen sytokiniinin synteesissä tarvittavan isopentenyyliitransferaasientsyymiin geenin. Fotosynteesissä syntyvien sokereiden on todettu kulkeutuvan solukoihin, joissa sytokiniinisynteesi on voimakasta. Kun isopentenyyliitransferaasigeeni saatiin ilmentymään tomaatin hedelmässä, kuiva-ainemäärä kasvoi. Tämä muun muassa vähentää kuljetuskustannuksia sekä helpottaa esimerkiksi tomaattisoseen valmistusta, koska vettä pitää haihduttaa vähemmän.

**Polyfenolioksidaasientsyymi (PPO)** saa aikaan kasvinosien **tummumista** happamalla kasvien fenoliyhdisteitä, jolloin syntyy tummia melaniinipigmenttejä. Normaalisti tämä entsyymi ei ole kosketuksissa kasvisolun fenoliyhdisteiden kanssa, mutta kasveja käsiteltäessä soluorganellit hajoavat ja fenolit pääsevät reagoimaan PPO:n kanssa. Tällaista tummumista tapahtuu muun muassa perunalla, lehtisalaatilla, sienillä, avokadolla ja viinirypäleillä, ja sitä on kontrolloitu elintarvikkeissa käyttämällä sulfiittiyhdisteitä. Bachem ym. (1994) saivat perunan mukulan tummumisen estettyä siirtämällä perunaan PPO:n antisense-RNA:n.

Niin sanotuilla klimakteerisilla kasveilla (muun muassa tomaatti, banaani ja omena) kasvihormoni **etyleenin säätelee kypsymistä**. Kypsymisen alkaessa sisäisen etyleenin määrä nousee nopeasti ja se käynnistää muita reaktioita, jotka saavat aikaan hedelmän värin, koostumuksen, maun ja tuoksun muuttumisen. Etyleenin synteesissä toimii kaksi entsyymiä, ACC-syntaasi ja ACC-oksidaasi. Etyleenin synteesi on estetty siirtämällä tomaattiin jomman kumman entsyymiin antisense-RNA, jolloin hedelmän kypsyminen estyy (Hamilton ym. 1990; Oeller ym. 1991). Ayub ym. (1996) siirsivät ACC-oksidaasin antisense-RNA:n meloniin, joka normaalisti kypsyessään pilaantuu nopeasti. Antisense-menetelmän avulla kypsyminen saatiin estettyä ja hedelmät jäivät vihreiksi ja kiinteiksi normaalien hedelmien pehmetessä ja muuttuessa keltaisiksi. Hedelmät eivät myöskään irronneet köynnöksestä. Normaalisti melonit kerätään ennen kuin ne ovat keränneet maksimimäärän sokereita hedelmäsolukkoonsa. Kun hedelmät voidaan jättää köynnökseen pitemmäksi aikaa ilman pelkoa ylikypsymisestä, ne keräävät enemmän sokereita ja ovat makeampia. Kypsyminen saatiin siirtogeenisillä kasveilla aikaan ulkoisesti lisätyn etyleenin avulla.

Kasvit varastoivat fosforia **fytaattina**, joka ei sellaisenaan kelpaa ravinnoksi eläimille. Kasvien sisältämän fytaatin on myös todettu sitovan välttämättömiä mineraaleja, kuten kalsiumia, rautaa ja sinkkiä estäen niiden käytön ravinteina. Eläinten rehuun onkin lisätty *Aspergillus niger* -sienestä eristettyä **fytaasientsyymiä**, jonka avulla rehussa oleva fytaatti hajoaa käyttökelpoiseksi fosfaatiksi ja myoinositolik-

si. Pen ym. (1993) siirsivät fytaasigeenin tupakkaan ja saivat sen ilmentymään siemenissä. Fytaasia sisältäviä siemeniä voidaan lisätä suoraan eläinten rehuun, ja siemenissä entsyymiaktiivisuus säilyy pitkiäkin aikoja.

Kasveja voidaan myös käyttää **bioreaktoreina** bakteerifermentaation sijasta tuotettaessa entsyymejä teollisiin tarkoituksiin. Tupakassa on muun muassa tuotettu tärkkelyksen hajotuksessa käytettävää  $\alpha$ -amylaasia (Pen ym. 1992) sekä paperiteollisuudessa käytettävää ksylanaasia, joka hajottaa kasvisolujen sekundaarisinässä olevaa hemiselluloosaa, ksylaania (Herbers ym. 1995).

Ihmisen **hemoglobiiniakin** on ajateltu voitavan tuottaa kasveissa, jolloin ei tarvitsisi turvautua verenluovuttajilta saatuun vereen tai bakteerien tai siirtogeenisten eläinten tuottamaan hemoglobiiniin. Dieryck ym. (1997) siirsivät tupakkaan ihmisen hemoglobiinin kahden alayksikön geenit ja saivat aikaan toimivan hemoglobiinin syntymisen. Holmberg ym. (1997) puolestaan siirsivät tupakkaan *Vitreoscilla*-bakteerin hemoglobiinin ja tutkivat sen vaikutusta kasvin kasvuun ja aineenvaihduntaan. Bakteerihemoglobiinia tuottava siirtogeeninen tupakka kasvoi verrokkikasveja nopeammin, siemenet itivät nopeammin ja kasvit kukkivat aikaisemmin. Myös sekundaarimetaboliittien, muun muassa nikotiinin, tuotanto kasvoi. Hapen määrä soluissa saattaa rajoittaa kasvien aineenvaihduntaa, koska niiltä puuttuu hemoglobiinin tapainen happea sitova yhdiste. Hemoglobiinin siirtäminen kasveihin ja hapen saannin turvaaminen voisi siten saada kasvit kasvamaan tehokkaammin.

Viljelykasvien jalostuksessa pyritään lopulta aina **sadonlisäykseen**. Kun kasveja kasvatetaan tiheänä monokulttuurina, ne varjostavat toisiaan. Kasvit kilpailevat valosta ja päästäkseen valoon ne ohjaavat ravinteita ja fotosynteesituotteita varren kasvuun, jolloin lehdet jäävät pienemmiksi. Valoreseptoreina kasveissa toimivat **fytokromit**, joita muun muassa lituruoholla on viisi erilaista. Näistä fytokromi A absorboi etenkin pitkää punaista valoa (FR; 700-800 nm), ja aktivoituaan saa aikaan varren kasvun hidastumisen ja nivelvälien lyhenemisen, mikä johtaa vastaavasti lehtipinta-alan kasvuun. Pitkää punaista valoa on paljon juuri tiheissä kasvatuksissa valon heijastuessa ympärillä olevista kasveista. Normaalisti fytokromi A toimii kuitenkin vain itämisen alkuvaiheessa ja hajoaa nopeasti valossa. Vallitsevaksi tulee fytokromi B, joka puolestaan saa aikaan varren pitenemisen varjostuksen välttämiseksi. Robson ym. (1996) siirsivät tupakkaan kauran fytokromi A:n geenin, ja sen ylituotanto sai aikaan fytokromi A:n määrän kasvun tupakan solukossa. Kasveja testattiin kenttäkokeissa ja havaittiin, että harvassa kasvaessaan siirtogeeniset kasvit eivät poikenneet normaalista, mutta tiheässä kasvustossa niiden pituuskasvu väheni ja lehtipinta-ala lisääntyi. Tällä tavalla voidaan satoindeksiä (*harvest index*; lehtien biomassa/kokonaisbiomassa) kasvattaa ja estää varren turhaa kasvua ja muun muassa lakoontumista tiheissäkin kasvustoissa.

# Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutukset Suomessa

# 7

## 7.1 Ympäristövaikutusten arvioinnin periaatteet

Tässä osassa ympäristövaikutuksista puhuttaessa keskitytään lähinnä **negatiivisiin ympäristövaikutuksiin eli ympäristöriskeihin**. Ympäristöriskillä tarkoitetaan tietystä ominaisuudesta johtuvien vaaratekijöiden haitallisten seurauksien **vakavuuden ja todennäköisyyden yhteisvaikutusta**. Jos vaaratekijän seuraus on merkityksetön (jos kasviin siirretty ominaisuus ei esimerkiksi anna sille valintaetua tai jopa heikentää sen elinkelpoisuutta), suurikaan todennäköisyys sen esiintymiseen ei tee siitä vakavaa ympäristöriskiä. Toisaalta jos vaaratekijän seuraus on ekologisesti vakava (jos uusi ominaisuus esimerkiksi lisää ennestäänkin voimakkaasti lisääntyvän kasvin leviämiskykyä), pienikin todennäköisyys edellyttää riskin tarkkaa arvioimista ja sen toteutumisen ehkäisemistä mahdollisuuksien mukaan.

### 7.1.1 Riskinarviointiin vaikuttavat tekijät

Siirtogeenisten kasvien ympäristöriskien arviointiin vaikuttavista tekijöistä tärkeimmät ovat itse kasvilaji sekä ominaisuus, joka lajiin siirretään. Myös ympäristötekijöillä on suuri vaikutus siirtogeenisen kasvin käyttäytymiseen. Pääasiallisina geeninsiirron kohteina olevat perinteiset viljelykasvilajit ja niiden ominaisuudet tunnetaan melko hyvin. Riskinarvioinnin perusteena ovatkin mahdolliset muutokset, joita lajissa geeninsiirron jälkeen tapahtuu. Kunkin lajin lisääntymis- ja leviämisbiologian perusteella voidaan ennustaa siirtogeenisten kasvien levittäytymistä ja geenien mahdollista siirtymistä luonnonpopulaatioihin tai lähisukuisiin luonnonvaraisiin lajeihin. Siirtogeenisen kasvin mahdolliset haitalliset ympäristövaikutukset riippuvat siirretystä ominaisuudesta ja siitä, miten siirtogeeninen kasvi poikkeaa alkuperäisestä. Erilaiset ympäristötekijät voivat vaikuttaa arvaamattomalla tavalla siirtogeenisen kasvin käyttäytymiseen ja ne tulee mahdollisuuksien mukaan huomioida riskinarvioinnissa.

#### Kasvilaji

Ympäristövaikutusten arvioinnin lähtökohdaksi täytyy aina ottaa kulloinkin kyseessä oleva kasvilaji ja sen asema ekosysteemissä. Lajin lisääntymis- ja leviämisbiologian perusteella voidaan arvioida siirtogeenisen kasvin mahdollista leviämistä tai geenien siirtymistä muihin lajeihin. Ympäristöriskien mahdollisuus on pienin lajeilla, jotka eivät leviä luontaisesti ja joilla ei ole sukulaisia, joiden kanssa ne voisivat risteytyä. Lajit, jotka ovat kotoperäisiä ja ominaisuuksiltaan lähellä luonnonlajeja, pystyvät leviämään ympäristöön ja mahdollisesti risteytymään luonnonvaraisten populaatioiden tai sukulaislajien kanssa, jolloin geenit pääsevät leviämään ympäristöön. Ympäristöriskit voivat olla suuria esimerkiksi metsäpuilla, jotka ovat pitkäikäisiä, voimakkaita kilpailijoita ja usein avainlajeja ekosysteemissä.

Suomalaisten lajien kohdalla arvioinnin lähtökohdaksi voidaan ottaa lajin **alkuperäinen levinneisyys** ja sen **mahdollisuus muodostaa pysyviä populaatioita** Suomen luonnossa. Useimmat viljelykasvit on alunperin tuotu Suomeen muualta

eivätkä ne muodosta luonnonpopulaatioita. Niillä ei myöskään ole täällä sukulaisia, joiden kanssa ne voisivat risteytyä. Pitkälle jalostetut tai eksoottiset lajit eivät yleensä tule toimeen ilman ihmisen hoitotoimenpiteitä eivätkä siten voi levitä ympäristöön. Tällaisia kasveja ovat esimerkiksi tomaatti, joka ei tule toimeen kasvihuoneviljelyn ulkopuolella, tai peruna, jolla lyhyt kasvukausi estää normaalin suvullisen lisääntymisen ja kylmä talvi tappaa kasvulliset lisääntymiselimet (mukulat).

Kasvin levittäytymiseen vaikuttavat **siementuotanto**, **siementen leviämistapa** ja mahdollinen **kasvullinen lisääntyminen**. Tuulilevintäiset siemenet ovat yleensä pieniä, niitä on paljon ja ne leviävät laajalle alalle. Siementen dormanssi voi saada aikaan siementen säilymisen maassa, jolloin ne voivat itää pitkienkin aikojen päästä. Useat kasvit lisääntyvät myös kasvullisesti, mikä voi vaikeuttaa niiden leviämisen valvontaa. Esimerkiksi haapa lisääntyy tehokkaasti juurivesojen avulla.

Kasvien **pölytysmuoto** vaikuttaa geenien mahdolliseen siirtymiseen luonnonpopulaatioihin tai lähisukuisiin lajeihin risteytymisen kautta. Esimerkiksi ohra on lähes täysin itsepölytteinen ja risteytyminen villien ohralajien kanssa on siten hyvin epätodennäköistä. Voimakkaasti ristipölytteiset lajit, joilla esimerkiksi itsepölytys on kokonaan estynyt, voivat puolestaan levittää geneejään nopeastikin luonnonpopulaatioihin. Tällaisia lajeja ovat muun muassa monet ristikukkaiset (*Brassicaceae*). Myös **pölytystapa** vaikuttaa geenien siirtymiseen. Tuulipölytteisillä lajeilla siitepöly leviää kauas, jolloin geenien leviämistä on mahdoton valvoa tai estää. Esimerkiksi männyllä ja kuusella siitepöly voi levitä jopa yli sadan kilometrin päähän. Hyönteispölytteisten lajien siitepöly puolestaan jää suurimmaksi osaksi pienelle alalle pölyttäjien liikkeessa pääasiassa samassa kasvustossa.

Taulukkoon 3. (s. 61) on listattu joitakin Suomessa viljeltäviä kasveja ja niiden mahdolliset risteytyvät sukulaislajit. Taulukossa on lisäksi mainittu voiko laji muodostaa populaatioita luonnossa, sekä kunkin lajin pölytystapa, joka vaikuttaa siitepölyn leviämiseen ja risteytymisen todennäköisyyteen.

## Siirretty ominaisuus

Kasviin siirretyt ominaisuudet voivat **lisätä kasvin kilpailukykyä**, jolloin kasvit voivat levitä viljelyalueen ulkopuolelle ja aiheuttaa muutoksia luonnonpopulaatioissa ja kokonaisissa ekosysteemeissä. Tällaisia ominaisuuksia voisivat olla esimerkiksi hyönteis- ja taudinkestävyys sekä erilaisten stressien sieto. Useilla kasveilla hyönteiset tai taudit rajoittavat luonnossa populaation kokoa. Kun tällaiseen populaatioon siirtyy vastustuskyvyn aikaansaava geeni, populaation kasvua rajoittavat tekijät poistuvat ja laji voi levittäytyä entistä tehokkaammin. Jos lajin kylmän- tai kuivuudensietoa parannetaan, laji voi levitä kasvupaikoille, joilla se ei ole ennen menestynyt. Toisaalta suuri osa siirretyistä ominaisuuksista ei vaikuta kasvin leviämisen- ja lisääntymiskykyyn tai saa aikaan kasvin muuttumista kilpailukykyisemmäksi. Muutokset voivat olla neutraaleja tai jopa negatiivisia. Esimer-

Koska siirtogeeninen laji poikkeaa alkuperäisestä siihen siirretyin ominaisuuden osalta, täytyy tutkia, **onko siirretyllä geenillä vaikutusta**

- siementen määrään
- siementen elinikään
- siementen dormanssiin
- siementen leviämiseen
- ympäröivien olosuhteiden sietämiseen
- kasvulliseen lisääntymiseen
- kilpailukykyyn
- ... ja siten **siirtogeenisen kasvin leviämiskykyyn** ? (Dale 1992)

Taulukko 3. Esimerkkejä Suomessa kasvatettavista hyötykasveista ja tutkimuksessa käytettävistä kasveista, niiden pölytystapa (H=hyönteispölytteinen, T=tuulipölytteinen, I=itsepölytteinen, K= lisääntyy/lisätään kasvullisesti) ja risteytyvät sukulaislajit.

laji	luonnon- popul. ?	pölytys- tapa	risteytyviä sukulaisia / risteymiä ?
<b>SUOMESSA KASVATETTAVIA HYÖTYKASVEJA</b>			
sipuli	<i>Allium cepa</i>	ei	H (T) ei
juurikas	<i>Beta vulgaris</i>	kyllä	T (H) villijuurikas ( <i>B. vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i> )
kaali	<i>Brassica oleracea</i>	ei	H ei
rypsi	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	kyllä	H peltokaali ( <i>B. rapa</i> ssp. <i>campestris</i> )
kurkku	<i>Cucumis sativus</i>	ei	H <sup>1</sup> ei
porkkana	<i>Daucus carota</i> ssp. <i>sativa</i>	kyllä	H rikkaporkkana ( <i>D. carota</i> ssp. <i>carota</i> )
lehtisalaatti	<i>Lactuca sativa</i>	ei	I (H) ei
tomaatti	<i>Lycopersicon esculentum</i>	ei	H / I <sup>2</sup> ei
herne	<i>Pisum sativum</i>	ei	I (H) ei
peruna	<i>Solanum tuberosum</i>	ei	K (H) <sup>2</sup> ei
kaura	<i>Avena sativa</i>	ei	T hukkakaura ( <i>A. fatua</i> ) <sup>§</sup> ukonkaura ( <i>A. strigosa</i> ) <sup>§</sup> rikkakaura ( <i>A. sterilis</i> ) <sup>§</sup>
ohra	<i>Hordeum vulgare</i>	ei	I (T) villiohrat (Suomessa harvinaisia)
ruis	<i>Secale cereale</i>	ei	T ei
vehnä	<i>Triticum aestivum</i>	ei	T pukinvehnä ( <i>Aegilops cylindrica</i> )*
mansikka	<i>Fragaria x ananassa</i>	ei	K (H) <sup>2</sup> ei
omena	<i>Malus x domestica</i>	ei ?	H metsäomenapuu ( <i>M. sylvestris</i> ) <sup>§</sup>
mustaherukka	<i>Ribes nigrum</i>	kyllä	H ei
mesimarja	<i>Rubus arcticus</i>	kyllä	K (H) <sup>2</sup> ei
koivu	<i>Betula</i> sp.	kyllä	T <i>Betula pendula x pubescens</i> * <i>Betula nana x pendula x pubescens</i> * <i>Betula nana x pubescens</i> *
kuusi	<i>Picea abies</i>	kyllä	T ei
mänty	<i>Pinus sylvestris</i>	kyllä	T ei
haapa	<i>Populus tremula</i>	kyllä	T hybridihaapa ( <i>Populus tremula x tremuloides</i> )
<b>SUOMESSA TUTKIMUSKÄYTÖSSÄ OLEVIA KASVEJA</b>			
lituruoho	<i>Arabidopsis thaliana</i>	kyllä	I (H, T) ei
gerbera	<i>Gerbera hybrida</i>	ei	H ei
tupakka	<i>Nicotiana tabacum</i>	ei	H (I) ei

<sup>1</sup> nykylajikkeet partenokarpisia (hedelmä kehittyä ilman siementen muodostumista)

<sup>2</sup> käytännössä ei siemenlevintää

\* Kurtto & Lahti (1987)

§ Mikkelsen & Jorgensen (1997)

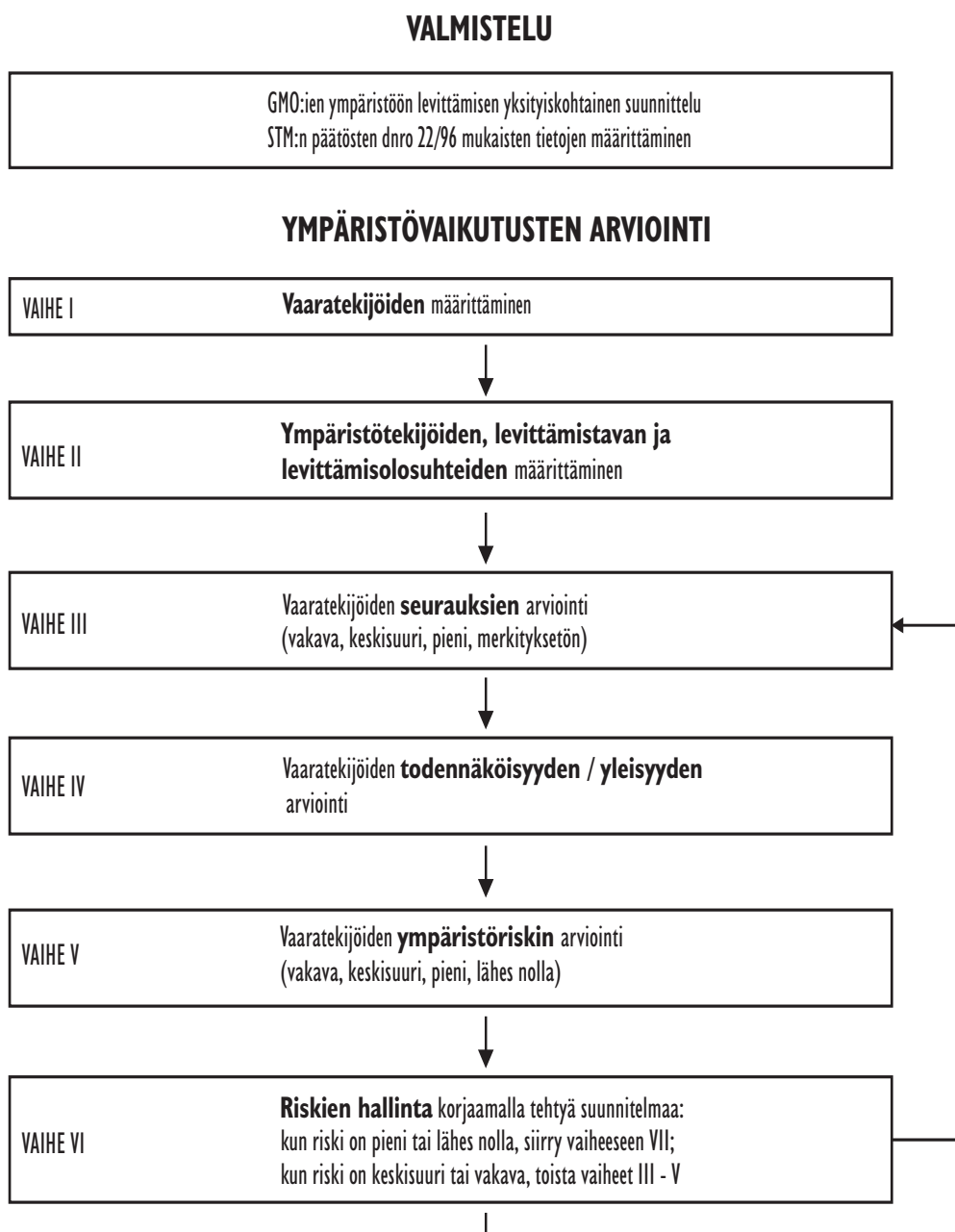
kiksi muutokset lipidi-, aminohappo- tai hiilihydraattikoostumuksessa voivat muuttaa kasvin jopa alttiimmaksi erilaisille tuholaisille, jolloin kasvista ei todennäköisesti ole uhkaa luonnollisille ekosysteemeille.

Kasveihin siirretyt ominaisuudet voivat myös vaikuttaa suoraan maaperän eliöyhteisöihin. Kasveissa tuotettavat lääkeaineet tai tekniseen käyttöön tarkoitettut kemialliset yhdisteet voivat olla myrkyllisiä niitä syöville eläimille tai maaperän mikrobeille, jolloin ne voivat vaikuttaa ravintoketjuihin ja ekosysteemien tasapainoon.

## Ympäristö

Kasvien leviämiseen ja lisääntymiseen vaikuttavat monet ympäristötekijät etenkin luonnonoloissa, joissa olosuhteiden muutoksia on vaikea ennustaa. Maatalousympäristössä olosuhteet ovat paremmin hallittavissa ja kasvien menestyminen riippuu ihmisestä. Luonnonoloissa kasvien leviämiseen vaikuttavat muun muassa kilpailu muiden kasvien kanssa, patogeenit ja herbivorit. Lisäksi vaikuttavat erilaiset abioottiset tekijät, kuten lämpötila, sademäärä, kasvukauden pituus ja valojakso (fotoperiodi) tai esimerkiksi sienijuurten ja itämiseen sopivien paikkojen saatavuus. Kasveihin siirretyt ominaisuudet saattavat myös ilmentyä eri lailla erilaisissa olosuhteissa. Ympäristö, johon siirtogeeninen kasvi tuodaan, muodostaa siis suuren epävarmuustekijän ympäristövaikutusten arvioinnissa ja ympäristötekijöiden vaikutukset tulee riskinarvioinnissa aina mahdollisuuksien mukaan huomioida.

Kuva 7. Ympäristövaikutusten arvioinnin vaiheet SYKE:n yleisohjeen mukaan.



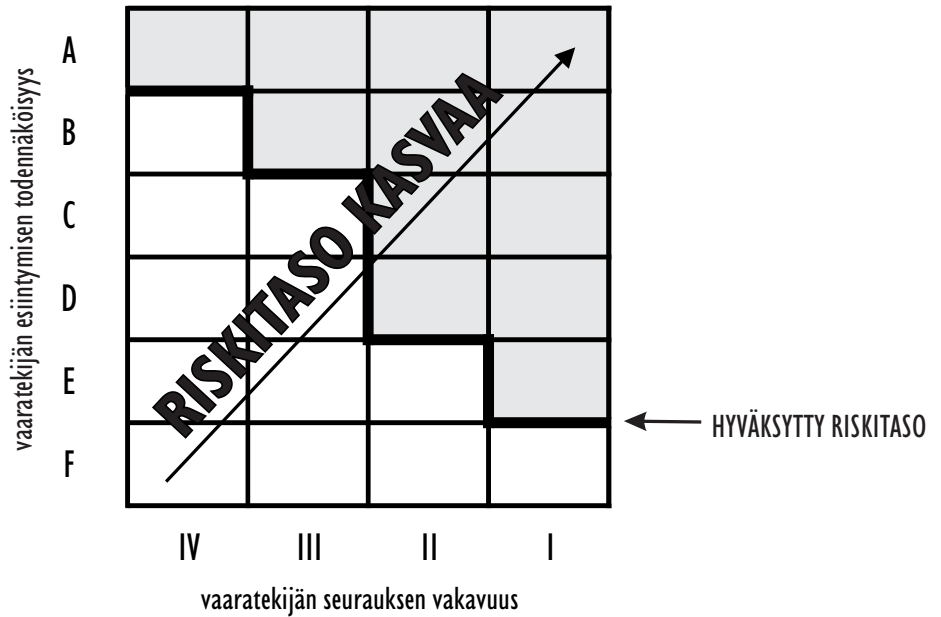
### 7.1.2 Riskinarvioinnin lähestymistapoja

Suomen ympäristökeskus (SYKE) on laatinut yleisohjeen geenitekniikalla muunnettujen organismien ympäristövaikutusten arviointia varten. Kuvassa 7 ( s. 62) on esitetty ympäristövaikutusten arvioinnin eri vaiheet kaaviona SYKE:n yleisohjeen mukaan. Ympäristöriskejä arvioitaessa määritetään ensin **vaaratekijät** ottaen huomioon ympäristötekijät ja levitämisolosuhteet. Tämän jälkeen arvioidaan vaaratekijöiden aiheuttamat **seuraukset** ja niiden toteutumisen **todennäköisyys**.

Näiden perusteella voidaan määrittellä kunkin tapauksen **riskiluokka** (ks. myös kuva 8.). Hyväksyttävän riskitason tulee olla pieni tai lähes nolla. Jos riskitason havaitaan olevan keskisuuri tai vakava, tilanne pyritään korjaamaan **riskienhallinnan** avulla muuttamalla koe- ja valvontajärjestelyjä. Seurausten **kokonaisriski** voidaan arvioida ottamalla huomioon vaaratekijöiden riskien yhteisvaikutus ja riskien mahdollinen kumuloituvuus. Lopuksi voidaan vielä tarkastella toiminnan vaihtoehtoja sekä ottaa huomioon toiminnan mahdolliset positiiviset ympäristövaikutukset, jolloin **ympäristöriskien ja -hyötyjen keskinäinen arviointi** on mahdollista.

Kuvassa 8. on esitetty riskitason määrittäminen taulukkomuodossa Jankin ym. (1997) niin sanotun Zurich Hazard Analysis -mallin (ZHA) mukaan. Riskin vakavuus kasvaa kaaviossa oikealle ja ylöspäin mentäessä. Paksun viivan alapuolella näkyvä vaalea alue esittää niin sanottua hyväksyttyä riskiluokkaa. Kaaviosta näkyy, että pienellä todennäköisyydellä esiintyvä vakava seuraus muodostaa suuremman riskin kuin suurella todennäköisyydellä esiintyvä merkityksetön seuraus. Jos määritelty riskitaso sijoittuu viivan yläpuolelle tummennetulle alueelle, riskienhallinnan avulla täytyy muuttaa olosuhteita siten, että päästään hyväksytylle riskitasolle.

Tiedje ym. (1989) esittivät yksityiskohtaisen mallikaavion (liite 2), jonka avulla siirtogeenisia organismeja ja niihin siirrettyjä ominaisuuksia tarkastelemalla pyrittiin arvioimaan niiden mahdollisia ympäristöriskejä. Tässä mallissa **siirtogeenisia kasveja verrataan alkuperäisiin kasveihin** ja keskitytään lähinnä fenotyypin muutoksiin. Geneettisten muutosten ja siirtogeenisen lajin ominaisuuksien riskinarviointi perustuu siihen, kuinka hyvin muutokset tunnetaan ja **kuinka paljon ne poikkeavat alkuperäisestä**. Mitä suurempia muutokset ovat, sitä todennäköisempää on mahdollisten haitallisten ympäristövaikutusten esiintyminen. Kaavion perusteella voitaisiin siis karkeasti arvioida, mihin riskiryhmään kukin siirtogeeninen laji kuuluu riippuen siitä, kallistuvatko ominaisuudet enemmän kaavion vasemmalle (ympäristöriskien mahdollisuus pienempi) vai oikealle (ympäristöriskien mahdollisuus suurempi) puolelle. Esitys korostaa kuitenkin liiaksi itse muutosta eikä siinä oteta huomioon varsinaisen siirretyn ominaisuuden vaikutuksia. Esimerkiksi se, että geenin ominaisuudet tunnetaan, ei tee organismista riskitöntä, jos ominaisuuksien tiedetään olevan vaarallisia (liite 2, kohta 1.). Myöskään se, että



Kuva 8. Riskitason arviointi ZHA-mallin mukaan (Jank ym. 1997). Pystysuoraan on merkitty vaaratekijän esiintymisen todennäköisyys, joka pienee alaspäin mentäessä (A=yleinen, B=kohtalaisen yleinen, C=satunnainen, D=harvinainen, E=epätodennäköinen, F=mahdoton). Vaakasuoraan on merkitty vaaratekijän seurauksen vakavuus, joka kasvaa oikealle päin mentäessä (IV=olematon, III=ei juuri merkitystä, II=vakava, I=erittäin vakava). Paksulla viivalla on merkitty hyväksytyyn riskitason raja.

siirtogeeninen organismi on paikallinen ja sen levinneisyys tunnetaan, ei välttämättä tarkoita että se olisi vaarattomampi kuin muualta siirretty organismi, jonka käyttäytymistä ei tunneta; pikemminkin päinvastoin (liite 2, kohta 2.). Tämä esitys on kuitenkin ensimmäinen geenitekniikalla muunnettuja organismeja varten kehitetty riskinarviointimalli ja sen vuoksi huomionarvoinen. Malli on rakennettu koskemaan lähinnä siirtogeenisiä mikrobeja, joten sitä ei voida suoraan soveltaa siirtogeenisiin kasveihin. Siihen on kuitenkin listattu asioita, joita on hyvä ottaa huomioon riskinarviointia tehtäessä.

Gaugitsch ja Torgersen (1995) kokosivat yhteen kolmen itävaltalaisen asiantuntijaryhmän näkemykset siirtogeenisten organismien ympäristövaikutusten arvioinnista. Liitteessä 3 on esitetty avainkysymykset, jotka koskevat nimenomaan siirtogeenisten kasvien riskinarviointia. Tässä esityksessä painotetaan **jo olemassa olevaa tietoa** vastaanottajakasvista, siirrettävästä ominaisuudesta ja ympäris-

Goy ja Duesing (1996) tarkastelivat siirtogeenisten kasvien mahdollisia ympäristövaikutuksia Euroopassa tehtyjen kenttäkokeiden pohjalta. Tutkimus ei vastaa tilannetta Suomessa, mutta on yksi esimerkki siitä, miten riskinarviointia voidaan tehdä ja miten voidaan kartoittaa lajit ja ominaisuudet ja niiden yhdistelmät, joiden kohdalla negatiiviset ympäristövaikutukset ovat mahdollisia. Aluksi tarkasteltiin itse kasveja ja niiden risteytymismahdollisuuksia, ja sen jälkeen siirrettäviä ominaisuuksia ja niiden vaikutuksia ympäristöön. Ympäristövaikutusten arviointiin käytettiin yksinkertaista yhtälöä

$$\text{geenin siirtymisen todennäköisyys} \times \text{geenin siirtymisen seuraukset} = \text{mahdolliset ympäristövaikutukset}$$

Aluksi kasvit jaoteltiin kolmeen ryhmään sen mukaan kuinka todennäköistä geenien siirtyminen lähisukulaisiin on. Ryhmään I kuuluivat kasvit, joilla ei Euroopassa ole lähisukulaisia, joiden kanssa ne voisivat risteytyä. Tällaisia kasveja olivat esimerkiksi tupakka, peruna ja maissi. Ryhmän II kasveilla on pieni mahdollisuus risteytyä lähisukuisten lajien kanssa, mutta elinkyisten jälkeläisten tuottaminen on melko epätodennäköistä. Tällaisia lajeja olivat esimerkiksi rapsi ja lehtisalaatti. Ryhmän III kasveilla on suuri todennäköisyys risteytyä lähisukulaisien kanssa ja näitä lajeja olivat muun muassa sokerijuurikas, sinimailanen ja poppeli. Aineistona käytetyistä 391 kenttäkokeesta ryhmään I kuului 54 %, ryhmään II 26 % ja ryhmään III 20 % lajeista.

Tämän jälkeen siirretyt ominaisuudet luokiteltiin sen mukaan, kuinka suuren kilpailuedun ne tuovat siirtyessään luonnonvaraiseen lajiin. Luokkaan I kuuluivat minimaalisen kilpailuedun antavat ominaisuudet. Näitä olivat selviä haittoja aiheuttavat ominaisuudet kuten koirassteriliteetti tai hidastunut kypsyminen, sekä neutraalit merkkigeenit. Luokka II, jonka ominaisuudet voivat parantaa kilpailukykyä, jaettiin kahteen alaluokkaan sen perusteella, onko ominaisuudesta hyötyä viljelyalueen ulkopuolella vai ei. Luokkaan II a kuului herbisidikestävyys, josta ei ole hyötyä luonnonoloissa, ja luokkaan II b erilaiset taudin- ja stressinkestävyydet, joista voi olla hyötyä myös luonnonoloissa. Luokkaan III kuuluivat ominaisuudet, jotka yleisesti lisäävät kasvua ja elinkykyä ja jotka siis antavat voimakkaan kilpailuedun kaikissa olosuhteissa. 388 kenttäkoetta jaettiin näihin luokkiin. Luokkaan I kuului 30 %, luokkaan II a 40 %, luokkaan II b 27 % ja luokkaan III 3 % siirretyistä ominaisuuksista.

Mahdollisia ympäristöriskejä arvioitaessa otettiin huomioon molemmat luokittelut. Tutkijat lähtivät siitä, että jos geenin siirtyminen lähisukuiseen kasviin on todennäköistä, mutta ominaisuudesta ei ole etua lajille, ympäristövaikutukset ovat minimaaliset. Samoin on silloin, kun ominaisuus antaa selvän kilpailuedun lajille, mutta geenin siirtyminen on epätodennäköistä. Kun koko aineistoa tarkasteltiin tällä periaatteella, 91 % :lla Euroopassa tehdyistä kenttäkokeista ei katsottu olevan ympäristöriskejä, 9 %:lla kokeista oli pieni riski eikä vakavan ympäristöriskin aiheuttavia kenttäkokeita tämän mallin mukaan ollut lainkaan. Tämä tulokinta on ristiriidassa aikaisemmin esitetyn riskiluokan määrittelyn kanssa, jossa siis vakava, vaikkakin epätodennäköinen, seuraus katsotaan aina selväksi ympäristöriskiksi. Ympäristöriskin vakavuuden määrittelemisen voi siis olla hyvinkin tulkinnanvarainen asia.



töstä. Yhtä tärkeää heidän mielestään on **kokeen huolellinen suunnittelu**. Näiden tekijöiden perusteella pyritään arvioimaan siirtogeenisen kasvin käyttäytymistä ja tekemään tapauskohtainen riskinarviointi.

Riskiluokan määrittäminen on hankalaa, koska vaaratekijöiden seurauksia ja todennäköisyyksiä on usein vaikea arvioida. Riskinarvioinnissa pyritäänkin aina käyttämään niin sanottua varovaisuusperiaatetta. Jotta mitättömiksi arvelut riskit eivät osoittautuisi oletettua suuremmiksi, pienetkin riskit huomioidaan ja pyritään ennalta ehkäisemään.

## 7.2 Siirrettyjen geenien leviäminen ympäristöön

Siirtogeeniset lajit voivat olla kilpailukyvyiltään ja kelpoisuudeltaan alkuperäistä viljelykasvia parempia, jolloin niiden mahdollisuudet tulla toimeen luonnonoloissa saattaisivat olla paremmat kuin perinteisillä lajikkeilla. Useat pitkälle jalostetut viljelykasvit eivät normaalisti tule toimeen ilman ihmistä eikä uuden ominaisuuden siirtäminen tällaiseen kasviin todennäköisesti muuta sitä niin paljon, että se voisi levitä luontoon. Jos kasvi kuitenkin tulee toimeen luonnonoloissa, mahdollisuus siirtogeenisen kasvin ja samalla siirrettyjen geenien leviämiselle ympäristöön on suuri. Siirtogeenit saattavat myös siirtyä siitepölyn mukana risteytymisen kautta lähisukuisiin lajeihin ja muuttaa niiden ominaisuuksia.

### 7.2.1 Kasvin leviäminen ympäristöön

Siirtogeenisestä kasvista saattaa olla haittaa, jos se villiintyy ja **leviää viljelyalueiden ulkopuolelle**. Siirtogeeninen laji muodostaa ympäristöriskin, jos se valtaa alaa muilta kasveilta ja mahdollisesti syrjäyttää niitä kokonaan tai muuttaa muuten luonnon ekosysteemien rakennetta ja toimintaa huomattavasti. Runsastuakseen muiden lajien kustannuksella siirtogeenisellä kasvulla täytyy kuitenkin yleensä olla puolellaan selvä valintaetu. Kasviin siirretyn ominaisuuden täytyy siis parantaa sen kilpailukykyä muihin kasveihin verrattuna. Esimerkiksi herbisidejä sietävä kasvi voi siirtyä alueille, joilla se ei ole aikaisemmin kasvanut, jos herbisidien käyttö tällä alueella antaa sille valintaedun ja luo lajille uuden ekologisen lokeron. Kasviin siirretty stressin- tai taudinkestävyys voi parantaa kasvin kilpailukykyä ja auttaa sitä leviämään aikaisempaa tehokkaammin.

Viljelykasvi voi **muuttua rikkakasviksi**, jos se vakiintuu ympäristössä oleville toisten lajien viljelmille. Jokin laji voi olla arvokas viljelykasvi tietyssä ympäristössä ja hankala rikkakasvi toisessa (esimerkiksi rapsi). Jos lajilla ei ennestään juuri

Pienet geneettiset erot voivat saada aikaan suuria muutoksia kasvin ulkoisissa ominaisuuksissa. Williamson (1993) mainitsee esimerkin kahdesta palsamilajista (*Impatiens* sp.) Isonsa-Britanniassa. Näistä toinen (*I. capensis*) on yleinen ja voimakkaasti leviävä laji, ja toinen (*I. noli-tangere*) puolestaan harvinainen ja levinneisyydeltään rajoittunut laji. Morfologialtaan ne ovat hyvin samanlaisia, mutta leviämisominaisuuksiltaan täysin erilaisia. Darmency (1994) esittää esimerkin kauran suvusta (*Avena* sp.). Viljellyn kauran (*A. sativa*) ja rikkakauran (*A. sterilis*) ero on yhdessä geenissä, joka vaikuttaa siementen leviämiseen. Samoin kaura ja hukkakaura (*A. fatua*) eroavat toisistaan yhden geenin kohdalla. Kuitenkin näiden kolmen lajin levinneisyys ja kasvupaikat eroavat toisistaan huomattavasti. Rikkakaura kasvaa luonnonpopulaatioina Välimeren alueella ja Keski-Idässä, kun taas hukkakauraa tavataan ainoastaan viljellyn kauran joukossa rikkakasvina. Yksi siementen leviämiseen vaikuttava geeni voi siis saada aikaan huomattavan eron kasvin leviämiskyvyssä.

ole rikkakasviominaisuuksia, yhden geenin siirtäminen ei kovin todennäköisesti muuta sitä hankalaksi rikkakasviksi. Toisaalta jopa saman lajin sisällä, lajikkeiden välillä, voi olla eroja leviämiskyvyssä ja rikkakasvimaisuudessa.

Varsinaisia rikkakasviominaisuuksia on yritetty määritellä siinä kuitenkaan varsinaisesti onnistumatta (Williamson 1993). Rikkakasviominaisuuksina voidaan yleisesti ottaen pitää **ominaisuuksia, jotka lisäävät kasvin kykyä levitä**. Viljelykasvin rikkakasviominaisuuksiin voivat kuulua esimerkiksi säilyminen maassa sadonkorjuun jälkeen lepotilassa olevien siementen avulla, tai kasvullinen lisääntyminen. Tällaisia ominaisuuksia sisältävän siirtogeenisen kasvin paikallista ja ajallista leviämistä on vaikea valvoa, koska se voi ilmaantua uudelleen samalle kasvupaikalle pitkienkin aikojen päästä ja muodostaa uusia populaatioita. Siirtogeenisen kasvin leviäminen riippuu myös ympäröivistä olosuhteista. Viljelyolosuhteissa siemenellä on suurempi todennäköisyys tulla haudatuksi maahan, itää ja taimettua verrattuna luonnonolosuhteisiin, joissa on paikalle vakiintuneita luonnonpopulaatioita ja vähemmän vapaata elintilaa (Darmency 1994).

Rejmánek ja Richardson (1996) tutkivat leviämiskykyyn vaikuttavia ominaisuuksia männällä (*Pinus* sp.). Tiedot kerättiin 24 eri mäntylajin kohdalta. Kolme leviämiskykyä parantavaa ominaisuutta erottui selkeästi kymmenen tutkitun ominaisuuden joukosta: lyhyt juveniiliperiodi eli aika ennen kukintaa, lyhyt aika suurien siemensatojen välillä sekä siemenen pieni massa. Samoja kriteerejä voidaan tekijöiden mukaan käyttää myös muilla puuvartisilla siemenkasveilla ennustettaessa niiden leviämistä. Ruohovartisilla kasveilla niiden nykyinen levinneisyys näyttäisi olevan paras mittari ennustettaessa niiden leviämistä uusille alueille.

Jotta voitaisiin arvioida, vaikuttaako tietyn ominaisuuden siirtäminen kasvilajin kilpailukykyyn ja leviämiseen, täytyy ensin selvittää, **mitkä tekijät normaalisti säätelevät populaatiokokoa ja leviämistä**. Siirretty ominaisuus voi saada aikaan populaation kasvamisen siinä tapauksessa, että se vaikuttaa juuri näihin populaatiokokoa rajoittaviin tekijöihin. Kasviin siirretty hyönteis- tai taudinkestävyys voi saada aikaan populaation kasvun, jos hyönteiset tai taudit tavallisesti rajoittavat kyseisen populaation kasvua. Samoin erilaiset stressinsieto-ominaisuudet voivat auttaa kasvia leviämään paikoille, joilla se ei ole ennen pystynyt kasvaamaan.

Siirtogeenin ilmentyminen kasvin eri kehitysvaiheissa voi vaikuttaa kasvin elinkykyyn. Monilla yksivuotisilla kasveilla siementen elinkyky ja itäminen ovat ratkaisevia tekijöitä kasvin leviämisessä. Tällöin siirtogeenillä, jotka vaikuttavat siementen elinkykyyn, on suurempi vaikutus kuin geeneillä, jotka ilmentyvät vain täysi-ikäisissä kasveissa. Esimerkiksi siementen varastoöljyjen koostumuksen muuttaminen voi altistaa siemenet patogeeneille tai siemeniä syöville eläimille ja siten vähentää elinkykyisten siementen määrää maassa. Toisaalta siemenessä ilmentyvä taudinkestävyys parantaa siementen elinkykyä ja saattaa siis parantaa yksivuotisten kasvien leviämiskykyä.

**Eksoottisten lajien** tuomista uusille kasvupaikoille käytetään usein esimerkkinä uudenlaisten kasvien mahdollisista ympäristövaikutuksista. Schmitt ja Linder (1994) mainitsevat kaksi esimerkkiä lajeista, jotka ovat uusille kasvupaikoille vakiinnuttuaan muuttaneet maaperän ominaisuuksia ja levinneet sitten muiden lajien kustannuksella. Toinen näistä on Havaijille tuotu tyypeä sitova suomyrtilaji (*Myrica faya*), joka on häirinnyt alkuperäisten lajien sukkessiokiertoa vulkaanisilla alueilla. Toisena esimerkkinä mainitaan suolaa kestävä jääruoho *Mesembryanthemum crystallinum*, joka on syrjäyttänyt muita lajeja Kaliforniassa lisätessään maan pinnan suolapitoisuutta. Eksoottisten lajien mallia ei voida suoraan soveltaa siirtogeenisiin kasveihin, sillä nämä ovat yleensä ominaisuuksiltaan hyvin lähellä

alkuperäisiä lajikkeita, joiden käyttäytymisestä ja levinneisyydestä tiedetään paljon. Eksoottisten kasvien käyttäytymistä täysin uudenlaisessa ympäristössä on vaikeampi ennustaa. Siirtogeeniset kasvit voivat kuitenkin siirtyä täysin uudenlaisille kasvupaikoille, jos esimerkiksi niiden kylmän- tai suolansieto on lisääntynyt. Voimakaskasvuisten puiden ilmaantuminen aikaisemmin ruohovartisten kasvien vallassa oleville alueille voisi muuttaa ekosysteemien rakennetta huomattavasti.

Mitä suurempi siirtogeeninen populaatio on ja mitä useampia kenttäkokeita samalla siirtogeenisellä kasvilla tehdään, sitä nopeammin kasvit ja niiden mukana geenit pääsevät leviämään ympäristöön, jos ne yleensä pystyvät leviämään. Populaation vakiintuminen kasvupaikalle saattaa vaatia tietynlaisia suotuisia sääoloja, ja voi viedä vuosia ennen kuin kriittinen populaatiokoko saavutetaan. Saattaa viedä aikaa ennen kuin sopiva elinympäristö löytyy ja populaatio pääsee lisääntymään ja vakiintumaan. Viljelyssä olosuhteet ovat erilaiset kuin luonnossa. Vaikka kenttäkokeiden perusteella siirtogeenisen kasvin leviämiskyky ei näyttäisi muuttuneen, luonnossa esimerkiksi kasvien välinen kilpailu voi monella lajilla olla leviämiskykyyn eniten vaikuttava tekijä.

Kun halutaan tietää, vaikuttaako jonkin ominaisuuden siirtäminen kasviin sen leviämiskykyyn ja lisääntymisbiologiaan, täytyy tutkia siirtogeenisen kasvin käyttäytymistä erilaisissa olosuhteissa ja verrata sitä alkuperäisen lajikkeen käyttäytymiseen. Crawley ym. (1993) vertasivat ei-siirtogeenisen ja kahden siirtogeenisen rapsilajikkeen käyttäytymistä ja ominaisuuksia erilaisissa ympäristöissä kolmen vuoden ajan. Toiseen siirtogeeniseen lajikkeeseen oli siirretty kanamysiinikestävyys ja toiseen sekä kanamysiini- että herbisidikestävyys. Koealueet olivat ilmastollisesti erilaisia (kuiva/kosteaa, aurinkoinen/varjainen) ja kokeita tehtiin kilpailevien kasvien, herbivorien, hyönteisten ja patogeenien kanssa tai ilman niitä ja lisäksi viljelemättömässä tai luonnonympäristössä - yhteensä 12 erilaisessa koeympäristössä. Tutkimuksessa havaittiin, että antibiootti- tai herbisidikestävyys eivät vaikuttaneet rapsin leviämisen tai kilpailukykyyn. Jos eroja verrokkikantaan oli, siirrettyjen ominaisuuksien vaikutukset olivat negatiivisia, eli siirtogeeniset kasvit olivat kilpailukyvyltään heikompia. Tämä koskee tietenkin vain tätä lajia ja näitä ominaisuuksia. Tämä on kuitenkin hyvä esimerkki kokeesta, jonka avulla voidaan yrittää arvioida mahdollisia ympäristövaikutuksia tietyllä laji-siirtogeeniyhdistelmällä varsinaisen pitkäaikaisen kokeuksen vielä puuttuessa. Bergelson (1994) puolestaan tutki herbisidikestävyuden vaikutusta lituruohon leviämiskykyyn tarkastelemalla kasvien siementuotantoa kilpailevien kasvien läsnäollessa. Herbisidiä kestävät kasvit muodostivat verrokkikasveja vähemmän siemeniä, mikä voi johtua herbisidikestävyuden mukanaan tuomasta valintavastuksesta. Eroa siementuotossa esiintyi etenkin tilanteessa, jossa oli paljon kilpailevia kasveja. Kun sitten tutkittiin kasvien leviämistä pelkän siemenmuodostuksen sijasta, erot lajikkeiden välillä hävisivät. Muutokset lisääntymiskykyssä eivät siis kertoneet muuttuneesta leviämiskyvystä. Tarkastellessaan Crawleyn ym. (1993) aineistoa Kareiva ym. (1996) totesivat, että kolme vuotta on ehdottomasti liian lyhyt aika, jotta todenmukaisia tuloksia kasvien leviämiskykyyn muutoksista saataisiin. Esimerkiksi rikkakasvi, joka leviää aluksi nopeasti, ei juuri eroa lopulliselta levinneisyydeltään kasvusta, jonka leviäminen on aluksi hidasta. Vuosittaiset muutokset kasvuoloissa vaikuttavat hyvin paljon kasvien leviämisen lopulliseen onnistumiseen.

Käytännön kokemusta siirtogeenisten kasvien mahdollisesta luontoon leviämisestä ja muuttuneesta invaasiokyvystä ei vielä ole. Vaikka erilaisia tutkimus- ja kehittämiskokeita siirtogeenisillä kasveilla onkin tehty vuodesta 1987 asti, niissä on tutkittu lähinnä kasvien viljelyominaisuuksia ja kasveihin siirrettyjen geenien toimintaa eivätkä ne kerro mitään siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutuksista. Vasta suuremman luokan ja pidemmän aikavälin kenttäkokeet ja viime kädessä viljely kaupallisessa mittakaavassa mahdollistavat kasvin ja ympäristön välisten vuorovaikutusten tutkimisen. Tämän vuoksi siirtogeenisten kasvien mahdolliset vaikutukset ympäristöön ovat tällä hetkellä osittain pelkkää arvailua. Lähtökoh-

tana voidaan kuitenkin käyttää lajin aikaisempaa viljelyhistoriaa sekä lähisukuisen luonnonlajien perusbiologiaa, joiden avulla siirrettyjen ominaisuuksien vaikutusta lajiin ja sen mahdolliseen leviämiseen voidaan lähteä arvioimaan.

### 7.2.2 Geenien siirtyminen lajista toiseen

Geenit voivat siirtyä risteytymisen kautta **siitepölyn mukana** saman lajin eri lajikkeeseen, luonnonpopulaatioon tai lähisukuisen lajiin. Geenien siirtymistä muulla tavoin kasvilajista toiseen ei ole raportoitu. Geenit voivat muihin lajeihin siirtyessään muuttaa näiden ominaisuuksia ja vaikuttaa ekosysteemien tasapainoon. Erittäin haitallista esimerkiksi maatalouden näkökulmasta voisi olla herbisidikestävyden siirtyminen rikkakasveihin.

Risteytyvien lajien täytyy olla tarpeeksi lähisukuisia, jotta hedelmöitys voi tapahtua. Lajien täytyy sijaita lähellä toisiaan, ja niiden pitää kukkia samaan aikaan. Siirtogeenisen kasvin siitepölyhiukkasen pitää onnistua hedelmöittämään toisen lajin kukka ja siemenen pitää itää. Siemenestä kasvaneen hybridikasvin pitää pystyä lisääntymään suvullisesti tai kasvullisesti. Risteytymisestä syntyneet jälkeläiset eli hybridit ovat usein lisääntymiskyvyttömiä eli steriilejä, koska niiden kromosomit eivät sovi yhteen eikä sukusoluja voi muodostua. Onnistuneeseen risteytymiseen siis vaikuttaa niin monta tekijää, että lajien välinen risteytyminen luonnossa on kaiken kaikkiaan melko harvinainen tapahtuma.

Risteymien (hybridien) muodostumisessa ja vakiintumisessa kasvupaikalle on kolme vaihtetta: (1) hybridisiemenen muodostuminen, (2) hybridikasvin muodostuminen ja (3) hybridikasvin leviäminen. Dale (1994) on tarkastellut ominaisuuksia, jotka vaikuttavat lajien välisten risteymien muodostumiseen ja vakiintumiseen luonnonoloissa:

- (1) Hedelmöityksen onnistumiseen ja hybridisiemenen muodostumiseen vaikuttavat kukkimisen samanaikaisuuden ja siitepölyn onnistuneen itämisen lisäksi lajien genomien yhteensopivuus ja siemenen siemenvalkuaisen (endospermin) kyky osallistua hybridialkion kehitykseen. Myös risteytymisen suunta saattaa vaikuttaa: toisella emokasvilla saattaa olla parempi kyky osallistua alkion ja siemenen kehittymiseen kuin toisella.
- (2) Hybridisiementen määrä ja elinkyky antavat lähtökohdan siementen itämiselle ja hybridikasvien muodostumiselle. Tässäkin risteytymisen suunta vaikuttaa, sillä siemenen elinkykyyn vaikuttavat usein maternaaliset (emikasvista peräisin olevat) ominaisuudet. Siemenen dormanssi voi auttaa siemenen säilymistä maassa. Myös kasvupaikan laatu vaikuttaa: viljelyoloissa itäminen on helpompaa, koska vapaata tilaa on enemmän kuin luonnonoloissa. Risteymän vakiintumiseen kasvupaikalle vaikuttavat lopulta hybridikasvin elinvoima, kilpailu muiden lajien kanssa sekä taudit ja herbivorit.
- (3) Risteymien lopulliseen vakiintumiseen ja leviämiseen kasvupaikalla vaikuttavat sen lisääntymisominaisuudet. Esimerkiksi luonnonvaraisten *Brassicaceae*-heimon lajien itsepölytyksen estävä mekanismi (itseinkompatibiliteetti) voi mahdollistaa hybridikasvien geenien nopean leviämisen luonnonpopulaatioissa (Darmency 1994). Hybridikasvien suvulliseen lisääntymiseen vaikuttavat ensinnäkin hede- ja emikasvien meioottinen stabiilisuus ja mahdollisuus kromosomien pariutumisellem. Tämän jälkeen määrävoina tekijöinä ovat siementen määrä ja elinkyky, dormanssi ja kasvupaikan laatu. Kasvullinen lisääntymis- ja leviämistapa voi edistää risteymän leviämistä ympäristöön. Etenkin pohjoisilla reuna-alueilla apomiksi eli hedelmöittymättömien siementen avulla tapahtuva kasvullinen lisääntyminen on melko yleistä muun muassa heinillä. Maatalousympäristössä leviämiseen voi vaikuttaa kasvullisten kasvosien säilyminen maassa. Luonnonoloissa kasvullinen leviäminen voi lisätä kasvin invaasiokykyä.

Tietyn ominaisuuden siirtyminen luonnonpopulaatioon ja sen vakiintuminen siellä riippuu suurelta osin siirtogeenisen kasvin tai hybridijälkeläisen **kelpoisuudesta**. Luonnonvalinta kohdistuu kasvin fenotyyppiin eli geenien ja ympäristön yhteisvaikutukseen. Kussakin ympäristössä kelpoisimmat ja elinkykyisimmät yksilöt valikoituvat. Jos siirtogeeni ei anna kasville **valintaetua**, kasvin kelpoisuus luultavasti alenee eikä se pääse helposti vakiintumaan ja runsastumaan.

Gliddonin (1994) mukaan kasvin kelpoisuudella on melko vähäinen merkitys geenien runsastumisessa. Koska siirtogeenin frekvenssi luonnonpopulaatioissa on alussa hyvin pieni, sitä voidaan verrata luonnonpopulaatioissa tapahtuvaan mutaatioon. Suuri osa mutaatiosta yleensä häviää populaatioista sattumanvaraisen geneettisen ajautumisen (*random genetic drift*) takia. Etenkin neutraalien alleelien kohtalo populaatioissa määräytyy suurelta osin geneettisen ajautumisen perusteella. Neutraali mutaatiokin vakiintuu populaatioissa ajan mittaan, mutta siihen voi mennä pitkä aika, keskimäärin 3200 sukupolvea (Malkamäki 1997). Neutraalin geenin vakiintumiseen vaikuttaa vain geenin alkuperäinen frekvenssi populaatioissa. Populaatorakenne puolestaan vaikuttaa nopeuteen, jolla geeni leviää ja yleistyy. Jos populaatio on pilkkoutunut, geeni yleistyy paikallisesti, mutta ei leviä kauas. Suuressa yhtenäisessä populaatioissa taas geeni voi levitä kauas, mutta ei saavuta paikallisesti suuria frekvenssejä. Luonnonoloissa hybridi todennäköisimmin takaisinristeytyy luonnonvaraisten yksilöiden kanssa, mikä hidastaa siirtogeenin yleistymistä luonnonpopulaatioissa.

Geenien leviäminen riippuu myös viljelykasvipopulaation koosta suhteessa luonnonpopulaatioihin, kasvien tiheydestä, kilpailijoista, lisääntymismekanismista ja pölyttäjästä. Esimerkiksi voimakkaasti ristipölytteisillä lajeilla geenien siirtyminen luonnonpopulaatioihin ja muihin lajeihin on todennäköisempää kuin itsepölytteisillä lajeilla. Tärkeä tekijä geenien siirtymisessä on niin sanottu toistuva siirtyminen (*recurrent migration*). Mitä suurempi siirtogeeninen populaatio on, sitä suurempi on mahdollisuus geenien toistuvaan siirtymiseen populaation ulkopuolelle.

Lajien välisten hybridien muodostumistodennäköisyyttä voidaan ennustaa tarkastelemalla siirtogeenisen lajin **siitepölyn leviämistä**. Aikaisemmin on oltu enemmän kiinnostuneita viljelykasvipopulaatioon kulkeutuvasta luonnonlajien siitepölystä, kun jalostetut lajikkeet on haluttu pitää mahdollisimman puhtaina. Samat lainalaisuudet pätevät siitepölyn kulkeutumiseen siirtogeenisiltä viljelmiltä muihin lajikkeisiin tai luonnonpopulaatioihin. Kareivan ym. (1994) mukaan siitepölyn kulkemien matkojen lisäksi täytyy ottaa huomioon myös todennäköisyys, jolla tietyn matkan kulkenut siitepölyhiukkanen onnistuu hedelmöittämään emin, jolle se laskeutuu. Tämä todennäköisyys on itse asiassa melko pieni, sillä emin luotille laskeutuu siitepölyä paljon muistakin lähteistä kuin juuri lähistöllä sijaitsevista siirtogeenisistä kasveista. Lisääntymiskykyisten lajien välisten hybridi-

Timmons ym. (1996) tutkivat siitepölyn kulkeutumista 3—10 hehtaarin suuruisilta rapsipelloilta kolmen vuoden ajan. Rapsi on sekä tuuli- että hyönteispölytteinen laji. 360 metrin päässä siitepölyn määrä oli 10—12 % siitä, mitä se oli pellon reunassa, ja pieniä määriä siitepölyä löydettiin vielä 1,5—2,5 kilometrin päässä pellolta. Siitepölyn kulkema matka ei myöskään näyttänyt vaikuttavan sen elinkykyyn. Schaefflerin ym. (1993; ks. Rogers ja Parkes 1995) mukaan siitepölyn määrä vähenee nopeasti välimatkan kasvaessa eikä heidän kokeissaan siitepölyä havaittu yli 47 metrin päässä koeviljelmältä. Samansuuntaisia tuloksia on saatu muun muassa puuvillalla ja tomaatilla (Rogers ja Parkes 1995). Perunan siitepöly ei juuri leviä yli 10 metrin päähän ja ristipölytys on sillä muutenkin harvinaista. Mannonen ym. (1997) ovat tutkineet siitepölyn leviämistä suomalaisella siirtogeenisellä ohralla. Alustavien tutkimusten mukaan siitepöly leviää ainakin 50 metrin päähän viljelmiltä. Varsinainen siitepölyn ja syntyvien siemenien siirtogeenisyys on vielä varmistamatta, ja jatkossa aiotaan vielä tutkia siitepölyn mahdollista leviämistä pitempienkin matkojen päähän.

dien muodostumista selvittävät kokeet kannattaa suorittaa niin luonnonmukaisissa olosuhteissa kuin mahdollista, sillä ympäröivät olosuhteet vaikuttavat sekä siitepölyn elinkykyyn että siementen muodostumiseen. Syntyneiden hybridisienten määrää täytyy tarkastella suhteessa tavallisissa olosuhteissa syntyneiden siementen määrään, jotta voidaan laskea todennäköisyys hybridisientien muodostumiselle (Kareiva ym. 1994).

**Lajien välistä risteytymistä** on tutkittu paljon öljyrapsilla. Rapsi (*Brassica napus* subsp. *oleifera*) on alunperin peltokaalin (*B. campestris* = *B. rapa* subsp. *campestris*) ja kaalin (*B. oleracea*) risteymä. Peltokaali esiintyy rikkaruohona rapsipelloilla. Öljyrapsia jalostettaessa rapsia on risteytetty peltokaalin kanssa, mutta luonnolliset lajienväliset risteymät ovat harvinaisia eikä niitä ole aina kokeellisestikaan saatu aikaan.

Jørgensen ja Andersen (1994) tutkivat rapsin ja peltokaalin risteytymistä ja havaitsivat sitä tapahtuvan runsaastikin riippuen koejärjestelystä. Kun peltokaalia istutettiin rapsin joukkoon siten että molempien siemeniä oli yhtä paljon, peltokaalin siemenistä kasvatetuista jälkeläisistä 9—22 % oli hybridejä. Toisessa kokeessa rapsipeltoon istutettiin yksittäisiä peltokaaliyksilöitä 25 metrin välein, jolloin näiden yksilöiden jälkeläisistä 93 % oli hybridejä. Lisäksi tutkittiin luonnonvaraista peltokaalipopulaatiota, jonka itäneistä jälkeläisistä 60 % oli hybridejä. Tässä kokeessa peltokaaliyksilöiltä kerättiin siemenet ja idätettiin, ja koska kaikki siemenet eivät itäneet (luonnonvaraisen populaation yksilöillä vain 25 % ja yksittäin istutetuilla yksilöillä 74 %), hybridijälkeläisten määrä tuli jonkin verran yliarvioitua. Luonnonolosuhteissa itämisprosentti on luultavasti vielä pienempi. Tämä koe kuitenkin osoittaa, että risteytymistä näiden lajien välillä voi tapahtua.

Mikkelsen ym. (1996) kasvattivat glufosinaattia kestävä öljyrapsia yhdessä peltokaalin kanssa ja tutkivat herbisidikestävyden siirtymistä lajista toiseen. Lajit risteytyivät keskenään ja syntyneet risteymät olivat lisääntymiskykyisiä ja tuottivat runsaasti siemeniä. Näistä siemenistä kasvatetut kasvit takaisinristeytettiin peltokaalin kanssa ja tuloksena oli glufosinaattia kestäviä, lisääntymiskykyisiä, ominaisuuksiltaan peltokaalia muistuttavia ja siten rikkaruohomaisia kasveja. Geenit siis voivat siirtyä rapsista peltokaaliin jo kahdessa sukupolvessa.

Lajien välinen risteytyminen luonnossa on melko harvinaista. Suomesta on tavattu 520 lajien välistä risteymää (Kurtto ja Lahti 1987), joista suurin osa kuuluu pajuihin (*Salicaceae*; 121) ja saroihin (*Cyperaceae*; 98). Myös heinäkasvien heimossa (*Poaceae*; 42) lajien välisiä risteymiä on melko paljon, mutta näistä ainoastaan kaksi koskee varsinaisia viljelykasveja (vehnä x ruis eli *Triticale* ja vehnä x pukinvehnä). Vehnän ja rukiin välistä risteytymistäkään ei tapahdu luonnossa. Savikkakasvien (*Chenopodiaceae*, mm. sokerijuurikas) ja hernekasvien (*Fabaceae*) heimosta on kummastakin löydetty yksi luonnonvarainen risteymä, joista kumpikaan ei koske hyötykasveja. Ristikukkaisten (*Brassicaceae*) heimosta on löydetty yhdeksän risteymää, mutta Suomessa *Brassica*-lajien (mm. rypsi, rapsi ja kaalit) ei ole todettu luonnossa risteytyvän keskenään. Koivukasvien (*Betulaceae*) heimossa puolestaan eri koivulajit risteytyvät keskenään, samoin tervaleppä ja harmaaleppä.

Useita kasveja viljellään kaukana niiden alkuperäisiltä esiintymisalueilta, jolloin luonnonpopulaatioita tai lähisukuisia lajeja ei välttämättä esiinny. Tällaisia ovat useimmat suomalaiset viljelykasvit. Siirtogeenisiä lajeja voidaan kuitenkin siirtää niiden alkuperäisille levinneisyysalueille, mikä täytyy muistaa arvioitaessa geenien leviämismahdollisuuksia. Viljelykasvien luonnonvaraiset kantamuodot ja lähisukulaiset ovat usein jalostajille tärkeitä geneettisen muuntelun lähteitä ja siirtogeeninen laji saattaisi muiden viljelykasveiksi (perinteisesti) jalostettujen lajikkeiden tapaan kilpailla alkuperäisten lajien kanssa, risteytyä niiden kanssa ja muuttaa niiden ominaisuuksia ja vaikuttaa alkuperäiseen populaatioon. Suomessa käytettäviä viljelykasveja tuskin tullaan siirtämään lajien leviämiskeskuksiin, sil-

lä suomalaiset kasvit on jalostettu kestävämmän nimenomaan ankaria pohjoisia olosuhteita. Geneettisen monimuotoisuuden ja yleensä biodiversiteetin säilyttäminen on kuitenkin kaikissa tapauksissa ensiarvoisen tärkeää.

Siitepölyn lisäksi geenit voivat levitä myös **siementen avulla**. Linnut tai eläimet saattavat levittää lajeja alueille, joille niiden ei pelkän siitepölyn leviämisen perusteella odoteta kulkeutuvan. Kun siirtogeeniset kasvit näin siirtyvät uusille kasvupaikoille, niiden mahdollisuudet risteytyä luonnonlajien kanssa voivat muuttua.

Siemenet voivat säilyä maassa pitkiäkin aikoja lepotilassa, dormanssissa, jolloin niiden aineenvaihdunta on hidasta ja kasvu on pysähtynyt. Dormanssi on tyyppillistä etenkin yksivuotisille lyhytikäisille kasveille, ja niiden siemenet voivat säilyä elinkykyisinä maassa jopa vuosikymmeniä. Viljelykasveilla dormanssia ei useinkaan esiinny, joskin rapsi on tästä poikkeus, sillä sen siemenet voivat säilyä maassa kymmenenkin vuotta. Jos siirtogeeniset viljelykasvit risteytyvät luonnonlajien kanssa, näiden dormanssiominaisuus voi siirtyä jälkeläisille ja siirtogeenin sisältävät siemenet voivat säilyä maassa pitkiä aikoja (Linder ja Schmitt 1994). Tämä saattaa mahdollistaa toistuvat risteytykset luonnonlajien kanssa ja siirtogeenien leviämisen luonnonpopulaatioihin. Dormanssi siirtyy jälkeläisiin etenkin silloin, kun siirtogeeninen kasvi toimii pölyttäjänä ja luonnonvarainen kasvi emoyksilönä, sillä siemenen ominaisuudet periytyvät pitkälti maternaalisesti. Siemenkuori on peräisin emikukasta ja siemenkuoren ominaisuudet vaikuttavat siemenen pysyvyyteen maaperässä. Jos tiedetään, että siirtogeeninen kasvi voi risteytyä lähisukuisen kasvin kanssa, dormanssiominaisuuksien esiintyminen jälkeläisillä kannattaa ottaa huomioon (Linder ja Schmitt 1994). Tutkimalla siirtogeenin sisältävien siemenien pysyvyyttä maaperässä voidaan arvioida geenien mahdollista leviämistä maaperän siemenvaraston eli siemenpankin kautta. Siirretty geeni voi vaikuttaa siemenien pysyvyyteen myös vaikuttamalla suoraan siemenen ominaisuuksiin. Jos kasviin on siirretty esimerkiksi taudinkestävyysgeeni ja kasvilla on taipumusta dormanssiin joko luonnostaan tai risteytymisen kautta, siirtogeenin leviäminen maaperän siemenpankin kautta voi olla huomattavaa.

Geenien leviämistä ja risteytymisen todennäköisyyttä arvioitaessa täytyy ensin **selvittää, onko siirtogeenisellä kasvilla lähisukuisia lajeja, joiden kanssa se voi risteytyä**, ja tämän jälkeen selvittää tällaisten lajien levinneisyys ja mahdollinen esiintyminen ympäristössä. Lähtökohtana voidaan käyttää tietoja perinteisten lajikkeiden risteytymisestä lähisukulaisten kanssa ja risteytymisen vaikutuksista. Siirtogeeninen laji voi myös pölyttää lähellä olevia ei-siirtogeenisiä lajikkeita. Mahdollisuuksien mukaan olisi selvitettävä siirtogeenin stabiilius ja mahdolliset ympäristöolojen vaikutukset siirtogeenin ilmentymisen pysyvyyteen. Siirtogeeni saattaa ilmentyä eri lailla erilaista geneettistä taustaa vasten, jolloin ilmentyminen saattaa muuttua, jos geeni siirtyy toiseen kasviin. Tämän jälkeen mahdollisia muodostuvia **risteymiä tarkastellaan siihen siirtyvän ominaisuuden perusteella** ja arvioidaan muutoksen vaikutuksia. Jos siirretty ominaisuus lisää kasvin kilpailukykyä, sen yleistyminen on todennäköisempää kuin jos vaikutus on neutraali. Toisaalta kun geenivirta siirtogeenisestä kasvista luonnonpopulaatioon kasvaa tarpeeksi suureksi, hybridin kelpoisuudella ei ole enää vaikutusta geenin runsastumiseen. Tämän vuoksi pienialaiset kenttäkokeet eivät välttämättä anna tarpeeksi tietoa geenien leviämisestä ympäristöön.

### **7.2.3 Geenien leviämisen estäminen**

Geenien leviäminen lajista ja lajikkeesta toiseen ristipölytyksen seurauksena pyritään usein estämään perinteisilläkin viljelykasveilla, jotta jalostetut linjat saadaan pysymään puhtaina. Samoja keinoja voidaan käyttää myös siirtogeenisillä kasveil-

la. Viljelyalueet voidaan sijoittaa kauas alueista, joilla muita lajikkeita tai lähisukuisia lajeja esiintyy. Tarvittava välimatka voidaan määrittää tutkimalla siitepölyn leviämistä kullakin lajilla. Siitepölyn leviäminen viljelyalueen ulkopuolelle riippuu siitepölyn määrästä, kulkeutumismatkasta ja siitepölyn elinkykyisyydestä. Siitepölyn leviämistä ympäristöön ja pitkienkin matkojen päähän ei voida kokonaan estää, mutta etenkin hyönteispölytteisillä lajeilla viljelmien ympärille sijoitetut suoja-alueet vähentävät tehokkaasti siitepölyn kulkeutumista. Suoja-alueelle voidaan istuttaa ei-siirtogeenistä lajiketta, joka toimii siitepölyansana ja esimerkiksi puuvillalla ja rapsilla jo suhteellisen kapeiden alueiden (3-8 m) on todettu riittävän (Kareiva ym. 1994, Morris ym. 1994). Suojakasvien olisi hyvä olla koirassteriilejä, jotta ne eivät pölytä siirtogeenisiä kasveja. Myös ympäröivät alueet, joilta kasvillisuus on kokonaan hävitetty, voivat auttaa siirtogeenisen viljelmän eristämässä (Kareiva ym. 1994). Kylvö- ja kukkimisaikoja voidaan muuttaa, jotta kukkiminen ei tapahdu samaan aikaan kuin luonnonvaraisilla lähisukulaisilla. Suomen oloissa kukkimista voidaan vain jonkin verran myöhäistää, sillä kylvöaika on lyhyen kasvukauden vuoksi rajallinen. Siitepölyn muodostuminen siirtogeenisillä kasveilla voidaan myös kokonaan estää koirassteriliteetin avulla, paitsi kasveilla, joiden hedelmiä kerätään satona. Tuulipölytteisillä ja -levintäisillä lajeilla, kuten koivulla, siitepölyn ja siementen leviämisen estäminen edellyttäisi täyssteriliteettiä eli täydellistä kukkimattomuutta.

## 7.3 Siirrettyjen ominaisuuksien mahdolliset vaikutukset

### 7.3.1 Herbisidikestävyys

Herbisidikestävyys on yksi kasveihin eniten siirretyistä ominaisuuksista. Tähän mennessä kullakin viljelykasvilla on voitu käyttää vain torjunta-aineita, joille se on luonnostaan vastustuskykyinen. Käytettävien torjunta-aineiden valikoima on siis ollut melko rajallinen. Siirtogeenisten herbisidejä kestävien kasvien viljeleminen voi mahdollistaa siirtymisen tehokkaampiin ja mahdollisesti ympäristölle vähemmän haitallisiin torjunta-aineisiin. Herbisidikestävyyttä on käytetty myös merkkigeeninä etenkin yksisirkkaisilla kasveilla.

Herbisidikestävyys voi sinänsä vaikuttaa kasvien elinkykyyn. Joissakin tapauksissa herbisidikestävyys saa aikaan herbisidin myrkyttömäksi muuttava entsyymi. Tällainen on esimerkiksi bromoksiniilikestävyys aiheuttava bakteeriperäinen nitrilaasi. Vaikka lopputuote ei ole myrkyllinen kasveille tai niitä syöville eläimille ja ihmisille, aineenvaihdunnan välituotteet voivat olla. Vierasperäiset entsyymit voivat myös reagoida kasvin omien yhdisteiden kanssa muodostaen myrkyllisiä aineenvaihduntatuotteita. Mahdollisten myrkyllisten väli- tai lopputuotteiden esiintyminen tai muutokset kasvin ravintoarvoissa on tarkkaan selvitettävä ennen kuin siirtogeeninen kasvi otetaan viljelyyn.

Suurimpana huolenaiheena siirtogeenisten kasvien kohdalla on nähty **herbisidikestävyysmahdollinen siirtyminen luonnonpopulaatioihin ja lähisukuisiin kasveihin**. Herbisidikestävyys ei anna kasville valintaetua luonnonympäristössä, jossa herbisidejä ei käytetä. Maa- ja metsätalousoympäristössä tilanne on kuitenkin toinen. Siirtogeeninen kasvi voi seuraavana vuonna ilmaantua pellolle, jolla viljellään viljelykierrossa jotakin toista lajia. Jos viljelmällä käytetään samaa torjuntaainetta kuin edellisenä vuonna, siirtogeenistä kasvia ei voida tällä torjunta-aineella hävittää eikä samaa herbisidiä voida siis käyttää. Tiettyä herbisidiä kestävä siirtogeeninen kasvi voi myös siirtyä naapuriviljelmille ja muuttua rikkakasviksi, jos viljelmillä käytetään samaa herbisidiä. Viljelijä ei välttämättä tiedä, mitä naapuri-



pellolla viljellään ja voi joutua hankalan rikkakasviongelman eteen. Herbisidikestävyysgeenit voivat myös levitä lähisukuisiin lajeihin risteytymisen kautta ja aiheuttaa samanlaisia ongelmia. Vaikka herbisidikestävyys ei luonnonpopulaatiossa antaisikaan kasville valintaetua, se saattaa neutraalina ominaisuutena säilyä siellä kerran vakiinnuttuaan ja aiheuttaa ongelmia olosuhteiden mahdollisesti muutuessa tai siirtyessään edelleen muihin lajeihin.

Herbisidejä kestäviä rikkakasvilajeja oli vuoteen 1996 mennessä havaittu 185 ympäri maailman. Triatsiineja kestävät lajit muodostavat näistä kolmasosan (Heap 1997). **Herbisidejä kestäviä rikkakasvikantoja muodostuukin valintapaineen eli herbisidien käytön vuoksi koko ajan.** Darmency (1994) esittää esimerkin kokeesta, joka tehtiin maissipellolla, jolla käytettiin jatkuvasti herbisidinä atratsiinia. Ensimmäisenä vuonna pellolle istutettiin yksi tätä herbisidiä sietävä jauhosavikkayksilö. Neljän vuoden kuluttua pellolla todettiin olevan 103 000 atratsiinia kestävää kasvia. Lisääntymisvauhti oli eksponentiaalista, mikä kuvaa kilpailuedun aikaansaavan geenin nopeaa lisääntymisvauhtia populaatiossa. Myös kestävyys sulfonyyliureoita kohtaan kehittyi valintapaineen vuoksi nopeasti, jo muutamassa vuodessa.

Glyfosaattia tai glufosinaattia luonnostaan kestäviä rikkakasvikantoja ei ole uskottu syntyvän muun muassa siksi, että nämä herbisidit inaktivoituvat maassa nopeasti, jolloin valintapaine ei ole pitkäaikainen. Glyfosaattikestävyuden aikaansaava mutaatio EPSPS-entsyymissä myös tekee entsyymin tehottomammaksi, mikä puolestaan haittaa kasvin aineenvaihduntaa ja heikentää kasvin elinkykyä. Tämän vuoksi luonnollisten mutaatioiden kautta syntynyt glyfosaattikestävyys ei ole yleistynyt luonnossa. Viime vuonna Australiasta kuitenkin löydettiin glyfosaattia kestävä raiheinäpopulaatio viljelmältä, jolla glyfosaattia oli käytetty kymmenen vuoden ajan (Sindel 1996). Vaikka harvinaista onkin, myös glyfosaattia kestäviä rikkakasvikantoja voi siis syntyä valintapaineen alaisena. Tämän lisäksi kestävyysgeenien siirtyminen siirtogeenisistä kasveista risteytymisen kautta mahdollistaisi glyfosaattia kestävien rikkakasvikantojen entistä nopeamman kehittymisen. Yksi vaihtoehto geenien siirtymisen estämiseksi voisi olla geenien siirtäminen kloroplastin genomiin. Tällöin geenit eivät pääsisi leviämään siitepölyn kautta, koska kloroplastit periytyvät useimmilla viljelykasveilla matернаalisesti (Daniell ym. 1998).

Yhdelle herbisidille vastustuskykyiset rikkakasvit voidaan torjua toisella herbisidillä. Ongelmia muodostuu, jos **rikkakasviin siirtyy useita kestävyysgeenejä**, jolloin kasvien torjuntamahdollisuudet vähenevät ja voidaan joutua käyttämään suuria määriä ja hyvinkin haitallisia herbisidejä.

Herbisidejä kestävien kasvien viljelemisen **vaikutuksia herbisidien käyttö-määriin** on vaikea ennustaa. Entistä parempien ja edullisempien torjunta-aineiden ja niitä kestävien siirtogeenisten kasvien kehittäminen voi lisätä kemikaalien määrää ympäristössä. Voidaan ajatella, että herbisidejä kestävien kasvien viljelmillä käyttömäärät kasvaisivat, jos torjunta-aineita voitaisiin käyttää ilman pelkoa viljelykasvien vahingoittumisesta. Toisaalta siirtogeeniset kasvit mahdollistavat siirtymisen tehokkaampiin ja siten pienempinä määrinä käytettäviin aineisiin. Esimerkiksi glyfosaatti on verraten vähän haitallinen torjunta-aine, jota ei ole yleensä voitu käyttää, koska se tappaa valikoimatta kaikki kasvit. Maaperän mikrobit hajottavat glyfosaattia melko hitaasti mutta maahan joutuessaan se kiinnittyy tiukasti eikä siten kulkeudu esimerkiksi pohjavesiin. Tällaisten tehokkaiden, lehtien kautta kulkeutuvien herbisidien käyttö poistaisi tarpeen levittää torjunta-aineita maahan ennen rikkakasvien taimettumista. Maanmuokkauksen tarve vähenisi, mikä estäisi viljelymaan eroosiota. Jos rikkakasvit voitaisiin hävittää vasta niiden taimetuttua, niiden muodostama väliaikainen lehtipeite vähentäisi osaltaan maan eroosiota ja estäisi uusien rikkakasvien kasvua.

Herbisidien käyttömäärien muuttuminen siirtogeenisillä kasveilla **riippuu paljon myös kasvilajista**. Soijapapu ja sokerijuurikas ovat esimerkkejä lajeista, joilla joudutaan käyttämään suuria määriä torjunta-aineita ja niiden erilaisia yhdistelmiä, sillä yksisirkkaisia ja kaksisirkkaisia rikkakasveja ei voida hävittää samoilla herbisideillä. Näillä lajeilla siirtyminen siirtogeenisten kasvien viljelyyn ja valikoimattomien herbisidien käyttöön voisi vähentää herbisidien käyttömääriä. Rapsi on puolestaan esimerkki kasvista, joka sellaisenaan kilpailee tehokkaasti rikkakasvien kanssa ja jolla herbisidien käyttömäärät eivät tällä hetkellä ole kovin suuret. Siirtyminen herbisidejä kestävien lajikkeiden viljelyyn voisi lisätä herbisidien käyttömääriä tällä lajilla (Emmerman 1995).

Madsen ym. (1996) tekivät tietokoneen avulla mallin, jossa tutkittiin glyfosaattia ja glufosinaattia (fosfotrisiini) kestäväen sokerijuurikkaan viljelyn vaikutuksia käytettävien herbisidien määrään. Mallissa tutkittiin normaalia viljelykiertoa, jossa sokerijuurikkaan jälkeen viljeltiin yhtenä vuotena ohraa ja kahtena vuotena vehnää. Sokerijuurikkaalla käytetään normaalisti paljon torjunta-aineita ja niiden eri yhdistelmiä, ja viljelmiä joudutaan ruiskuttamaan 4–5 kertaa vuodessa. Mallin mukaan glyfosaattia ja glufosinaattia kestäväen sokerijuurikkaan avulla torjunta-aineiden määrä saattaisi sokerijuurikasviljelmillä pudota lähes puoleen 20 vuodessa. Sokerijuurikas, samoin kuin esimerkiksi soijapapu, on siis kuitenkin siinä mielessä erityistapaus, että sillä käytetään poikkeuksellisen paljon herbisidejä. Muiden lajien kohdalla tarvitaan lisää tietoa, sillä vaikutus voi olla aivan toisenlainen.

### 7.3.2 Hyönteiskestävyys

Kemialliset, viljelmille ruiskutettavat hyönteismyrkyt tappavat valikoimatta kaikenlaisia hyönteisiä, muun muassa hyödyllisiä pölyttäjiä ja petohyönteisiä. Kun kasviin siirretään geenejä, jotka saavat aikaan erilaisten puolustusaineiden syntymisen, ne vaikuttavat vain kasveja ravintonaan käyttäviin hyönteisiin, siis tuholaisiin. Kasveihin siirretyt Bt-toksiinit ovat vaikutukseltaan hyvin spesifisiä. Kukin Bt-toksiini vaikuttaa aina tiettyihin hyönteislajeihin, jolloin kasvi voidaan saada tuottamaan toksiinia, joka tappaa ainoastaan kyseisen kasvin tuholaiset. Muihin hyönteislajeihin, eläimiin tai ihmisiin kasvin sisältämällä toksiineilla ei ole haitallista vaikutusta (Goldburg ja Tjaden 1990). Geenin siirtyminen viljelykasvista luonnonvaraiseen lajiin voisi kuitenkin vaarantaa kokonaisia hyönteispopulaatioita, jos ne käyttävät tätä tiettyä lajia ainoana ravinnonlähteenään. Tämä olisi riski etenkin käytettäessä Bt-toksiinien sijasta muita puolustusaineita, jotka eivät ole hyönteislajispesifisiä.

Huolimatta torjunta-aineiden käytöstä suuri osa sadoista menetetään edelleen tuhohyönteisten takia, sillä tähän mennessä yli 500 hyönteislajia on muuttunut vastustuskykyiseksi eri torjunta-aineita kohtaan. Filippiineiltä, Havaijilta ja USA:sta on löydetty kaalikoikantoja (*Plutella xylostella*), jotka kestävät ruiskutettiin käytettyjä Bt-toksiineja (Ferré ym. 1991). Samaan ongelmaan saatetaan törmätä Bt-toksiineja sisältävien siirtogeenisten kasvien kohdalla. Kun hyönteisiä altistetaan jatkuvasti näille kasvien sisältämille myrkyille, **kestäviä hyönteispopulaatioita voi valintapaineen alaisena kehittyä jo muutamassa hyönteissukupolvessa**.

Bt-toksiinien myrkkyyvaikutus perustuu niiden sitoutumiseen hyönteisen suolen seinämässä sijaitseviin reseptoreihin. Eri Bt-toksiineille on omat reseptorinsa. Kestävyyden saa aikaan muutos tässä reseptorimolekyylissä (Van Rie ym. 1990). Bt-toksiineja kestävien kaalikoikantojen reseptorimolekyylit poikkeavat siten toksiineille herkkien kantojen reseptoreista (Ferré ym. 1991). Onkin ajateltu, että jos hyönteiset valikoituvat kestäväen yhtä Bt-toksiinia, toisen toksiinigeenin käyt-

täminen kasvissa poistaisi ongelman. Gould ym. (1992) kuitenkin havaitsivat, että joillakin hyönteislajeilla **kestävyys yhtä toksiinia vastaan saa aikaan vastustuskyvyn myös muille toksiineille**. Tabashnik ym. (1997) osoittivat, että kaalikoilla yksi resessiivinen geeni saa aikaan kestävyuden neljää eri Bt-toksiinia vastaan (*CryIAa*, *CryIAb*, *CryIAc* ja *CryIF*). Esimerkiksi *Helicoverpa zea* on sekä puuvillan että maissin tuholainen. Jos populaatio valikoituu kestäväksi esimerkiksi puuvillassa tuotettua *CryIAa*-toksiinia, se voi samalla muuttua vastustuskykyiseksi maississa tuotettua *CryIAb*-toksiinia kohtaan, jolloin viljelykiertokaan ei auta taistelussa kestäviä tuhohyönteisiä vastaan.

Vastustuskykyisten hyönteispopulaatioiden muodostumisvauhti riippuu populaatiossa alunperin olevista kestävyysgeeneistä. Näitä geenejä on itse asiassa havaittu olevan populaatiossa enemmän kuin aikaisemmin on arveltu (Gould ym. 1997), sillä kestävyuden ollessa resessiivinen ominaisuus populaatiossa on aina runsaasti heterotsygootteja kestävyysgeenin kantajia. Gouldin ym. (1997) mukaan tämä frekvenssi oli  $1,5 \times 10^{-3}$  *Heliothis virescens* luonnonpopulaatioissa, joita ei ollut altistettu Bt-toksiineille. Tabashnikin ym. (1997) mukaan laboratoriossa kasvatetussa kaalikoikannassa (*Plutella xylostella*), jota ei altistettu Bt-toksiineille, heterotsygootteja yksilöitä oli 21 %, jolloin fenotyypiltään toksiineille vastustuskykyisiä hyönteisiä oli 1,6 % eli resessiivisten alleelien frekvenssi oli jopa 0,12. Hyönteisten altistuessa Bt-toksiineille kestävyysgeenin sisältämät yksilöt valikoituvat ja lisääntyvät nopeasti.

On ajateltu, että Bt-toksiinikestävyuden kehittymistä tuhohyönteisille voitaisiin estää käyttämällä useita toksiinigeenejä joko yhtä aikaa tai peräkkäin, istuttamalla siirtogeenisten kasvien joukkoon tai läheisyyteen kasveja, joissa ei ole toksiinigeenejä tai yksinkertaisesti käyttämällä tarpeeksi suuria toksiinimääriä, jotta suurin osa hyönteisistä (erityisesti heterotsygoottiset kestävyysgeenin kantajat) saadaan tapettua (McGaughey ja Whalon 1992, Alstad ja Andow 1995). Bt-toksiinigeenien siirtäminen kloroplasteihin voisi tehostaa ilmentymistä huomattavasti, ja koska kloroplastit periytyvät maternaalisesti, geenit eivät myöskään pääsisi leviämään siitepölyn mukana muihin kasveihin (McBride ym. 1995).

Jos **kasviin siirretään useampi toksiinigeeni kerrallaan**, myös hyönteiset voivat muuttua vastustuskykyisiksi useille myrkyille (Gould ym. 1992). Bt-toksiinigeenin voimakas jatkuva (konstitutiivinen) ilmentyminen kasvissa voi nopeuttaa kestävyuden kehittymistä hyönteisissä, koska tällöin valintapaine vaikuttaa niihin koko niiden elinkierron ajan ja kaikissa kasvinosissa. **Toksiinigeenin solukko- tai kehitysvaihespesifinen ilmentyminen** vähentäisi tätä valintapainetta. Kemiallisen induktion avulla toksiinigeenin ilmentyminen voidaan saada aikaan vain haluttaessa (Williams ym. 1992). **Perinteisen viljelykierron avulla** voidaan välttää hyönteisten pitkäaikainen altistuminen samalle hyönteismyrkyille. Tabashnik ym. (1994) huomasivat, että hyönteisten Bt-toksiinikestävyys oli palautuvaa. Valintapaineen poistuttua Bt-toksiineja kestävä kaalikoipopulaatio muuttui nopeasti niille herkäksi. Toisaalta kun Bt-toksiinien käyttö aloitettiin uudelleen, hyönteisten kestävyys niitä kohtaan palautui vielä nopeammin. Bt-toksiinien käytön ajallinen vaihtelu ei siis yksinään riitä estämään kestävien hyönteispopulaatioiden syntyä, mutta voi jonkin verran hidastaa sitä.

Bt-toksiinia sietävien hyönteispopulaatioiden syntymistä voidaan hidastaa **varmistamalla Bt-toksiinille herkkien hyönteiskantojen säilyminen alueilla, joilla viljellään Bt-toksiinia suojakseen tuottavia siirtogeenisiä kasveja**. Esimerkiksi Yhdysvalloissa EPA (*Environmental Protection Agency*) on määrännyt, että Bt-toksiineja tuottavien siirtogeenisten puuvillaviljelmien yhteyteen on istutettava vähin-

tään 4 % ei-siirtogeenistä puuvillaa, jota ei käsitellä lainkaan hyönteismyrkyillä tai vaihtoehtoisesti 25 % ei-siirtogeenistä puuvillaa, jota ei käsitellä niillä nimenomaisilla Bt-toksiineilla, joita siirtogeeninen lajike tuottaa. Näillä suoja-alueilla menestyvät Bt-toksiineille herkät yksilöt risteytyvät varsinaisilla viljelyalueilla valintapaineen alla kehittyvien Bt-toksiineja kestävien yksilöiden kanssa, mikä hidastaa Bt-toksiinikestävyysyden yleistymistä hyönteispopulaatiossa. Gouldin ym. (1997) mukaan tällä periaatteella kestäisi ennustetun kolmen tai neljän vuoden sijasta noin kymmenen vuotta, ennen kuin kestävät hyönteispopulaatiot muodostuisivat ongelmaksi. **Toksiinigeenien tarpeeksi voimakas ilmentyminen** on myös tärkeää. Suuri toksiinipitoisuus tappaa suurimman osan heterotsygooteista kestävyysgeenin kantajista, ja suoja-alueilta tulevat hyönteiset estävät toksiinikestävyysyden kehittymisen jäljelle jääneessä hyönteispopulaatiossa (McGaughey ja Whalon 1992). Esimerkiksi Yhdysvalloissa kaupallisessa viljelyssä oleva siirtogeeninen puuvilla ja maissi eivät ole yhtä myrkyllisiä kaikille tuhoholaisille, jolloin osa tuhoholaisista voi muuttua nopeasti vastustuskykyisiksi.

Myös proteinaasi-inhibiittoreita,  $\alpha$ -amylaaseja ja kitinaaseja on siirretty kasveihin hyönteiskestävyysyden aikaansaamiseksi. Jongsma ym. (1995) tutkivat perunan proteinaasi-inhibiittori II:n toimintaa tupakassa ja sen vaikutuksia kulkuyökkösen (*Spodoptera exigua*) toukkiin. Vaikka geeni ilmentyikin kasveissa voimakkaasti, se ei juurikaan vaikuttanut lehtiä syövien toukkien kasvuun. Toukat pystyivät syntetisoimaan uutta proteinaasia, johon kasvin sisältämä proteinaasi-inhibiittori ei vaikuttanut. Michaudin (1997) mukaan hyönteiset pystyvät proteinaasien avulla hajottamaan näitä kasveissa olevia toksisia yhdisteitä (myös Bt-toksiineja) ja siten eliminoimaan niiden vaikutuksia. Proteinaasi-inhibiittorien pitäisi olla hyvin laajavaikutteisia, jotta ne estäisivät tehokkaasti hyönteisten ruuansulatusentsyymien toiminnan. Vaihtoehtona olisi kasveihin siirrettävien toksiinien muokkaaminen siten, että hyönteisten proteinaasit eivät pysty niitä hajottamaan.

Siirtyminen siirtogeenisten Bt-toksiinia tuottavien kasvien viljelyyn voi myös vaikuttaa käytettävien hyönteismyrkkyjen määriin. Esimerkiksi USA:ssa oli vuonna 1995 ensimmäisen kesän kaupallisessa viljelyssä siirtogeeninen Bt-toksiinia tuottava puuvilla. Noin 13 %:lla puuvillapelloista viljeltiin siirtogeenistä puuvillaa. Sadonlisäys näillä pelloilla oli keskimäärin yli 7 % ja kemiallisia hyönteismyrkkyjä arvioitiin jääneen käyttämättä yli miljoona litraa (Monsanto 1997).

### 7.3.3 Viruskestävyys

Viruksen kuoriproteiinigeeni on yleisimmin käytetty viruskestävyysyden aiheuttava geeni siirtogeenisillä kasveilla. Viruskestävyys voidaan saada aikaan myös siirtämällä kasviin satelliitti-RNA:ta tai jokin viruksen rakennegeeni.

Yleensä **satelliitti-RNA** vähentää auttajaviruksensa lisääntymistä kasvisolussa ja lieventää siten taudinoreita. Jotkin satelliitti-RNA:t voivat kuitenkin pahentaa oireita tietyillä isäntälajeilla. Esimerkiksi CMV:n satelliitti-RNA suojaa useimpia kasvilajeja virustartunnalta, mutta tomaatilla ja muutamalla muulla *Lycopersicon*-lajilla se aiheuttaa kasvin kuoleamisen. Jopa yhden emäsparin muutos satelliitti-RNA:ssa voi muuttaa sen taudinaiheuttajaksi (Tepfer 1993). Luonnossa tapahtuu jatkuvasti mutaatioita johtuen RNA-virusten replikaasientsyymeiltä puuttuvasta korjauslukukyvystä, mutta nämä mutaatiot eivät useinkaan saa aikaan viruspopulaatioiden nopeata evoluutiota patogeenisempaan suuntaan (Tepfer 1993). Toisaalta tietty mutaatio voi saada aikaan taudinaiheutuskyvyn tietyssä isäntäkasvissa, ja tautia aiheuttava satelliitti-RNA saattaa valikoitua ja siirtyä virusrodusta toiseen (Palukaitis ja Roossinck 1996). Viruskestävyysyden kehittämiseksi kannattaneekin käyttää riskittömämpiä menetelmiä.

Kasviin siirretty viruksen **kuoriproteiinigeeni** saa aikaan vastustuskyvyn kyseistä virusta ja joskus myös muita viruksia vastaan. Kasvisolun tuottama kuoriproteiini luultavasti estää kasvia infektoivan viruksen kuoren avautumisen ja genomien vapautumisen. Proteiini kuori sekä suojaa viruksen perintöainesta että saa aikaan isäntäspesifisyyden. Useat virukset siirtyvät kasvista toiseen niitä levittävien hyönteisten (esimerkiksi kirvojen) avulla ja kuoriproteiini toimii joillakin lajeilla tässäkin avustajana. Koska kuoriproteiini saa aikaan isäntäkasvi- ja siirtäjähyönteisspesifisyyden, herääkin kysymys, voiko kasvin tuottama tietyn viruksen kuoriproteiini ottaa sisäänsä kasvia infektoivan toisen viruksen perintöaineksen (niin sanottu **transkapsidaatio eli heteroenkapsidaatio**) ja muuttaa siten tämän isäntävalikoimaa tai leviämismallia. Tällöin virus, joka ei normaalisti leviä kirvojen avulla, voisi muuttua kirvaleyvintäiseksi pakkauduttuaan kirvaleyvintäisen viruksen kuoreen. Samoin virus, joka ei normaalisti leviä infektiokohdasta muualle kasviin, voisi saada kuoriproteiinin systemisesti leviävältä virukselta, jolloin sen leviämistapa kasvissa muuttuisi.

Virusgenomin pakkautuminen kuoreen on melko spesifistä ja vaatii tiettyjen alueiden tunnistamisen kuoriproteiinin ja genomien välillä. Täten luonnonoloissa esimerkiksi TMV:n RNA ei normaalisti pakkaudu CMV:n kuoreen, vaikka nämä virukset infektoivat usein yhtäaikaan samaa kasvia. Laboratorio-olosuhteissa tällainen pakkautuminen on saatu aikaan, mutta luonnossa sitä ei ole havaittu tapahtuvan. Todennäköisemmin tällaista heteroenkapsidaatiota voi tapahtua saman viruksen eri roduilla tai lähisukuisilla viruksilla. Esimerkiksi kasvin tuottama TMV:n kuoriproteiini voi korvata toisen TMV-rodun toimimattoman kuoriproteiinin (Osborn ym. 1990). Farinelli ym. (1992) tutkivat perunaa, johon oli siirretty PVY<sup>n</sup>-rodun kuoriproteiini ja havaitsivat, että perunaa infektoivan PVY<sup>0</sup>-rodun virukset pakkautuivat osittain kasvin tuottamaan PVY<sup>n</sup>-kuoriproteiiniin. Täydellistä transkapsidaatiota ei kuitenkaan tapahtunut. Transkapsidaatio on lisäksi vain väliaikainen ilmiö eikä vaikuta vieraaseen kuoreen pakkautuneen viruksen perimään, sillä seuraavalla lisääntymiskierroksella kuoriproteiini syntetoidaan taas viruksen omasta genomista. Kasviin voidaan myös siirtää kuoriproteiinigeeni, joka ei koodita toimivaa geenituotetta (Smith ym. 1994). Siirtogeeni voi kuitenkin saada aikaan viruskestävyyden estämällä kasvia infektoivan viruksen vastaavan geenin toiminnan niin sanotun kosuppression avulla. Vaikka siirtogeeni ei kooditakaan toimivaa kuoriproteiinia, se on tarpeeksi homologinen viruksen geenin kanssa, jotta inaktivaatio voi tapahtua. Kun toimivaa kuoriproteiinia ei synny, ei myöskään transkapsidaation vaaraa ole.

Toisin kuin transkapsidaatio, **kahden virusgenomin rekombinaatio** johtaa pysyvään ja periytyvään muutokseen. Rekombinaatio on todennäköisesti tärkeä muuntelun lähde virusten evoluutiossa, ja sitä voi tapahtua sekä genomien välillä että niiden sisällä. Eri viruslajit voivat infektoida samaa kasvia yhtä aikaa, jolloin rekombinaatio on mahdollista. Virusgenomien on kuitenkin todettu muuttuvan yllättävän hitaasti. Tällaiset yhtäaikaiset infektiot johtavat harvoin uusien, patogeenisten virusten syntymiseen, eikä ole syytä uskoa kasvin sisältämän geenin ja virusgenomin rekombinaation olevan sen yleisempää (Falk ja Bruening 1994). Ainakin yhdessä tapauksessa kuitenkin kasvisolun DNA:sta peräisin oleva sekvenssi on saanut aikaan CMV-Y-viruksen satelliitti-DNA:n muuttumisen taudinaiheuttajaksi (Kuwata ym. 1991).

De Jong ja Ahlquist (1992) tutkivat kahden eri ryhmään kuuluvan viruksen liikeproteiinien vaikutusta viruksen leviämiseen. He korvasivat pitkäpavun kloroosiläikkäviruksen (CCMV) toimimattoman liikeproteiinin itäintianhampun mosaikkiviruksen (SHMV) liikeproteiinilla, minkä jälkeen hybridivirus saatiin leviämään SHMV:n tavoin systemisesti. Virusten infektoimissa samaa kasvia yhtä aikaa leviämistavan muuttumista eli spontaania rekombinaatiota ei kuitenkaan tapahtunut.

Kasvia infektoivan viruksen ja siirtogeenisen kasvin genomissa olevan virusgeenin välillä voi siis periaatteessa tapahtua rekombinaatiota. Usein tämä kasviin siirretty geeni on kuitenkin peräisin juuri kasvia infektoivasta viruksesta, jolloin uusien ominaisuuksien syntyminen rekombinaation takia on melko epätodennäköistä. Uusienkin ominaisuusyhdistelmien säilyminen riippuu siitä, onko rekombinanttivirus kilpailukykyisempi kuin alkuperäinen virus ja osallistuuko rekombinanttivirus viruksen monistumiseen solussa. Suurin osa muodostuneista viruksista ei osallistu viruksen lisääntymiseen seuraavalla kierroksella vaan hajoaa kasvisolun kuollessa. Rekombinaatioon vaikuttavia tekijöitä on paljon, eikä niitä tunneta tarpeeksi hyvin, jotta voitaisiin esittää valmiita malleja siirtogeenisten kasvien ja virusten genomien rekombinaatiosta ja niiden vaikutuksista. Siirtogeenien ja virusgenomien rekombinaatio ei kuitenkaan ole sen yleisempää kuin eri virusten keskinäinen rekombinaatiokaan, joten virusgeenin siirtäminen kasviin ei periaatteessa luo suurempia mahdollisuuksia uusien virustyyppien syntymiseen kuin mitä luonnossa koko ajan tapahtuu.

### **7.3.4 Taudinkestävyys (bakteerit ja sienet)**

Joillakin lajeilla taudit voivat rajoittaa populaation kokoa. Vastustuskykyinen, siirtogeeninen kasvi voi saada valintaedun luonnonoloissa, jolloin laji voi muuttua voimakkaammaksi kilpailijaksi ja vallata tilaa muilta lajeilta. Mahdollisesti lähisukuisiin luonnonlajeihin siirtyessään taudinkestävyys voi samoin lisätä näiden lajien kelpoisuutta. Valintapaineen ollessa suuri bakteerit voivat myös hyönteisten tavoin nopeasti muuttua vastustuskykyisiksi kasvien sisältämille puolustusaineille. Geenit, jotka saavat aikaan kestävyuden sienipatogeenia vastaan (esimerkiksi kasvin juuressa tai mukulassa ilmestyvä kitinaasi), saattavat haitata sienijuurisymbioosin syntyä tai muuten vaikuttaa haitallisesti maaperän mikrobistoon.

### **7.3.5 Stressinkestävyys**

Kasvien kilpailukykyyn lisääntyminen on riski erityisesti siirrettäessä kasveihin stressinkestävyysgeenejä. Kun kasviin siirretään kylmän-, kuivan-, suolan- tai raskasmetallien sietogeeni, se voi siirtyä kasvupaikoille, joilla se ei ole ennen menestynyt. Esimerkiksi kasvukauden piteneminen parantuneen kylmänsiedon ansiosta tai levinneisyysalueen laajeneminen parantuneen suolansiedon vuoksi voivat antaa lajille etulyöntiaseman muihin lajeihin nähden. Jos laji muuttuu uudella kasvupaikalla dominoivaksi, se voi vaikuttaa koko ekosysteemiin. Vuorovaikutukset luonnossa ovat kuitenkin hyvin monimutkaisia eikä niistä tiedetä paljon, joten siirtogeenisten kasvien mahdollisesti mukanaan tuomien muutoksien vaikutuksiakaan ei voida ennustaa etukäteen.

### **7.3.6 Antibioottikestävyys**

Antibioottikestävyuden käyttö merkkigeeninä geeninsiirroissa on herättänyt kysymyksen, voiko kestävyysgeeni siirtyä siirtogeenisestä kasvista kasvipatogeeniin tai maaperän tai ihmisen suoliston bakteereihin. Niin sanottu **horisontaalinen geeninsiirto** eli geenien siirtyminen luonnossa lajista toiseen muuten kuin risteytymisen kautta on hyvin epätodennäköistä (Prins ja Zadoks 1994) — toisaalta eri bakteerilajien välillä geenien siirtymisen on todettu olevan yleisempää kuin aiemmin on ajateltu. Tutkimalla yksittäisiä geenisekvenssejä ja niiden homologiaa eri lajeilla on yritetty muun muassa rakentaa eliöiden sukupuita. Täysin samanlais-

Schlüterin ym. (1995) mukaan on tehty joitakin kokeita, joissa on tutkittu horisontaalista geeninsiirtoa siirtogeenisillä kasveilla tehtyjen kenttäkokeiden aikana ja niiden jälkeen. Vaikka kasveista peräisin oleva DNA säilyi ehjänä maaperässä vuodenkin ajan, siirtogeenisiä mikrobeja ei havaittu. Hoffmann ym. (1994) tutkivat antibiootikestävyyden siirtymistä siirtogeenisestä *Brassica*-lajista *Aspergillus niger*-sieneen. Antibiootikestävyys siirtyi osaan sienistä, kun niitä kasvatettiin siirtogeenisen kasvin kanssa, mutta hävisi niistä jatkokasvatuksen aikana. Geeniä ei myöskään saatu eristettyä sienestä, joten ei voitu olla varmoja, johtuiko sen antibiootikestävyys nimenomaan kasvista siirtyneestä geenistä. Schlüter ym. (1995) tutkivat antibiootikestävyyden siirtymistä siirtogeenisestä perunasta *Erwinia chrysantemi*-bakteeriin. Koeolosuhteet vaihtelivat täysin keinotekoisesta mahdollisimman luonnonmukaiseen. Vaikka olosuhteet valittiin niin, että geenien siirtyminen perunasta bakteeriin olisi mahdollisimman tehokasta, ampisilliinikestävyyden siirtymisfrekvenssi oli vain  $5.8 \times 10^{-15}$ – $2.0 \times 10^{-17}$ . Tämä on huomattavasti pienempi kuin esimerkiksi bakteerien luonnollinen mutaatiofrekvenssi, joka on  $10^{-8}$ – $10^{-10}$ .

ten geenien esiintyminen toisilleen kaukaista sukua olevilla eliöillä saattaisi olla merkinä geenien siirtymisestä lajien välillä jossain evoluution vaiheessa (Smith ym. 1992, Syvanen 1994). Esimerkiksi Furner ym. (1986) löysivät muutamasta tupakkalajista (*Nicotiana* sp.) DNA-sekvenssin, joka on homologinen *Agrobacterium rhizogenes*in  $T_L$ -DNA:n kanssa. He arvelivat, että tämä DNA-sekvenssi olisi *Nicotiana*-suvun evoluution aikaisessa vaiheessa siirtynyt agrobakteerista kasviin.

Kanamysiinikestävyyden aikaansaava neomysiinifosfotransferaasigeeni (*npt II*) on yksi eniten käytetyistä merkkigeeneistä kasvien geeninsiirroissa. Sekä kasvilla oleva geeni että geenituote ajoavat nopeasti ja tehokkaasti ruoansulatuselimistössä. Geenin koodittama NPTII-entsyymi vaatii toimiakseen ATP:ta, jota on ruoansulatuskanavassa hyvin vähän, eikä se toimi alhaisessa pH:ssa. Suolistossa esiintyvät kana- tai neomysiiniä kestävät bakteerit eivät olisi lääketieteellinen haitta, sillä näitä antibiootteja ei juurikaan käytetä lääkteinä ihmisillä ja eläimillä. Kanamysiiniä kestäviä bakteereita on maaperässä niin runsaasti, että laajatkään siirtogeenisten kasvien viljelmät eivät käytännössä lisää tätä määrää, vaikka geenit siirtyisivät kasveista bakteereihin. Ihmiset myös syövät kanamysiiniä kestäviä mikro-organismeja jatkuvasti ruoassaan, etenkin raakojen vihannesten mukana. Vaikka geenien siirtyminen olisi mahdollista, merkkigeenin sisältävien kasvien syöminen ei kasvattaisi ihmisen suolistossa jo olevien, kanamysiiniä kestävien bakteerien määrää havaittavasti (Flavell ym. 1992, Fuchs ym. 1993). Koska geenien siirtyminen on hyvin epätodennäköistä, antibiootikestävyyden käyttäminen kasveissa sinänsä ei todennäköisesti heikennä antibioottien tehokkuutta lääkteinä eikä lisää riskiä antibiootteja kestävien mikrobikantojen syntyyn. Huomio pitäisi sen sijaan kiinnittää ylenpalttiseen antibioottien käyttöön ihmisten ja eläinten lääkinnässä, sillä se luo valintapaineen ja saa aikaan kestävien bakteerien yleistyksen (esimerkiksi Perreten ym. 1997). Riskien minimoimiseksi siirtogeenisten kasvien tuotannossa olisi pyrittävä käyttämään vaihtoehtoisia merkkigeenejä tai käyttämään valikoinnissa vain niitä antibiootteja, joita ei käytetä ihmisten ja eläinten lääkintään.

### 7.3.7 Muut ominaisuudet

Jotkin kasveihin siirretyistä geneista voivat koodittaa proteiineja, jotka ovat allergeeneja. Esimerkiksi soijapavun ravintoarvoa on yritetty nostaa siirtämällä siihen parapähkinästä (*Bertholletia excelsa*) metioniinipitoisen 2S-albumiinin geeni. Tämä proteiini on kuitenkin vahva allergeeni niille ihmisille, jotka ovat pähkinöille allergisia (Nordlee ym. 1996). Allergiaa aiheuttavia proteiineja ei pitäisikään missään nimessä siirtää yleisesti ravintona käytettäviin kasveihin. Allergiat eivät kuulu varsinaisiin ympäristövaikutuksiin, joten niitä ei käsitellä tässä tarkemmin.

Mainittakoon kuitenkin, että allergeenien tunnistaminen on melko helppoa, sillä niiden on todettu olevan proteiineja, joita ruoansulatuselimistö ei pysty pilkkomaan (Astwood 1996), jolloin useat tällaiset proteiinit pystytään etukäteen löytämään.

Myrkyllisiä tai muita mahdollisesti haitallisia aineita tuottavien kasvien siitepöly saattaa siirtyä viljelmille, joilla kasveja kasvatetaan ravinnoksi, ja se voi aiheuttaa muutoksia näiden kasvien ravintoainekoostumuksissa. Esimerkkinä voitaisiin mainita rapsi, jonka lauriinihappopitoisuutta on nostettu detergenttien tuotantoa varten. Jos tämä ominaisuus siirtyy viereisellä pellolla ruokaöljytuotantoa varten kasvatettavaan rapsiin, tämän sadon laatu kärsii.

### **7.3.8 Siirrettyjen ominaisuuksien vaikutukset maaperän eliöihin**

Kasvien kanssa on vuorovaikutuksessa monia lajeja, joista jotkin ovat haitallisia (tuhohyönteiset ja patogeeneit) ja jotkin hyödyllisiä (esimerkiksi sienijuuret, tympensitojabakteerit ja pölyttäjähönteiset). Osa on vaikutukseltaan neutraaleja. Kasvinjalostuksella pyritään vaikuttamaan haitallisiin lajeihin, mutta joskus vaikutukset voivat kohdistua muihinkin kuin kohdeorganismeihin.

Maaperän eliöt ovat vuorovaikutuksissa toistensa kanssa ja muutokset yhden lajin populaatiossa voivat vaikuttaa monien muiden lajien populaatioihin ja siten koko ekosysteemiin. Siirtogeenisten kasvien geenituotteet voivat maahan joutuessaan vaikuttaa suoraan maaperän eliöihin. Geenituotteita voi joutua maaperään kasvijätteen mukana ja juurten erittämänä. Suuri osa geenituotteista on proteiineja ja entsyymejä, jotka eivät maahan joutuessaan ole enää aktiivisia. Maaperän mikrobit hajottavat, inaktivoivat ja muuttavat näitä geenituotteita ja jotkin välituotteet saattavat olla myrkyllisiä. Myös maaperän olosuhteet (rakenne, koostumus, pH) vaikuttavat siihen, mitä geenituotteille tapahtuu. Mahdollisten akuuttien myrkkyyvaikutuksien lisäksi pitäisi tutkia geenituotteiden pitkäaikaisvaikutuksia ja esimerkiksi muutoksia eliöiden ravinnonhankinnassa ja lisääntymiskyvyssä (Morra 1994).

Torjunta-aineiden ympäristövaikutuksia tutkittaessa käytetään usein erityisiä indikaattorilajeja. Tällaisia indikaattorilajeja voitaisiin käyttää myös tutkittaessa siirtogeenisten kasvien geenituotteiden vaikutuksia maaperän eliöstöön. Esimerkiksi kastematoja on käytetty torjunta-aineiden vaikutuksia tutkittaessa (Tomlin 1994). *Nitrosomonas*-suvun bakteerit osallistuvat nitrifikaatioon ja ne reagoivat herkästi muuttuneisiin olosuhteisiin (Angle 1994).

Kasvien tuottamat myrkylliset aineet voivat vahingoittaa maaperän mikrobeja ja siten vaikuttaa ravinteiden kiertoön maaperässä. Haitallisia geenituotteita voisivat olla esimerkiksi kasveissa tuotettavat lääkeaineet tai teollista käyttöä varten tuotetut entsyymit, jotka voivat suurina määrinä maahan joutuessaan olla myrkyllisiä maaperän eliöille. Proteiinit, joita tuotetaan patogeenikestävyuden aikaansaamiseksi, voivat patogeenien lisäksi tuhota myös hyödyllisiä sieniä ja mikrobeja. Bakteereista peräisin olevat entsyymit voivat kasveihin siirrettyinä reagoida kasveissa olevien yhdisteiden kanssa, jolloin voi muodostua myrkyllisiä aineenvaihduntatuotteita.

Maahan joutuvien geenituotteiden vaikutuksia maaperän eliöihin ja niiden populaatiokokoihin voidaan tutkia erilaisin menetelmin. Esimerkiksi vertaamalla tietyn eliölajin runsautta kaikkien maaperän eliöiden määrään voidaan määrittää ekosysteemin monimuotoisuusindeksi (Angle 1994). On kuitenkin vaikea sanoa millaisia vaikutuksia monimuotoisuuden (biodiversiteetin) ja maaperän eliösuhteiden muuttumisella on ekosysteemiin ja kuinka paljon monimuotoisuuden pitää vähentyä, jotta on aihetta huoleen.



Tietoa tai kokemusta siirtogeenisten kasvien vaikutuksista esimerkiksi bio-geokemiallisiin sykleihin ei ole. Toisaalta siirtogeenisellä kasvilla ei luultavasti ole sellaisia vaikutuksia, joita perinteisillä viljelykasveilla ei olisi. Siirtogeeniseen kasviin siirretty uusi geeni koodittaa yleensä yhtä uutta proteiinia tai entsyymiä, jonka vaikutus maaperässä on luultavasti hyvin pieni. Geenien siirtymistä kasveista ja kasvijätteistä maaperän eliöihin ei todennäköisesti tapahdu. Koska siirtogeenisten kasvien tuotannolla tähdätään suurempaan satoisuuteen, ne saattaisivat vaikuttaa maaperän ravinnepitoisuuksiin kun ravinteita tarvitaan enemmän. Tarvitaanko siis lisää lannoitteita ja miten se vaikuttaa maaperään? Tyypeä yhteyttävien kasvien tuottaminen on noussut esiin silloin tällöin, ja tällaiset kasvit saattaisivat muuttaa ekosysteemin typpimetabolialla. Tällaisia kasveja ei ole toistaiseksi kuitenkaan pystytty kehittämään.

Trevors ym. (1994) ottivat esiin ominaisuuksia, jotka kasveihin siirrettyinä voisivat teoriassa vaikuttaa maaperän eliöihin ja ravinnepitoisuuteen:

- kasvit, jotka on muunnettu siten, että pystyvät tehokkaammin käyttämään ravinteita
- kasvit, joiden typpimetabolialla tai fotosynteesitehoa on muunnettu
- kasvit, jotka ovat myrkyllisiä tai eivät hajoa normaalisti maaperässä
- kasvit, joiden siirtogeenit koodittavat entsyymejä, jotka käyttävät hivenaineita kofaktoreina

### 7.3.9 Geenien inaktivaation ympäristövaikutukset

Siirtogeenien inaktivaatio ei useinkaan ole varsinainen riski ympäristölle. Kun siirtogeeni inaktivoituu, kasvi palaa takaisin alkuperäiseen ilmiasuunsa, eli tilanne on periaatteessa sama kuin kasviin ei koskaan olisi geeniä siirrettykään. Tällä voi kuitenkin olla merkitystä silloin, kun siirtogeeni saa aikaan jonkin kasvin sisältämän haitallisen aineen määrän vähenemisen. Silloin kun inaktivaatio johtuu kosuppressiosta, siirtogeeni inaktivoi samalla myös kasvin alkuperäisen geenin, jolloin kyseistä geenituotetta ei synny lainkaan tai vain hyvin pieniä määriä. Jos kyseessä on tärkeä entsyymi, geenin inaktivoituminen voi vaikuttaa koko kasvin aineenvaihduntaan. Lisäksi inaktivoitunut geeni säilyy kasvin perimässä ja se voi siirtyä huomatta muihin kasveihin tai esimerkiksi ympäristöolojen muuttuessa ilmentyä uudelleen myöhemmissä sukupolvissa.

## 7.4 Riskinarviointia esimerkkikasvien avulla

Esimerkkikasveiksi on otettu neljä erilaista Suomessa kasvavaa tai viljeltävää lajia. Näiden esimerkkien avulla tarkastellaan riskinarviointia lyhyesti. Sädelatva eli gerbera edustaa lajia, jota kasvatetaan ainoastaan kasvihuoneissa koristekasviksi, ja joka ei Suomessa tule toimeen kasvihuoneen ulkopuolella. Tupakkaa käytetään paljon koekasvina erilaisissa tutkimuksissa ja vaikka sitäkin pääosin kasvatetaan kasvihuoneissa ja laboratorioden yhteydessä, sitä saatetaan tavata jonkin verran viljelykarkulaisena luonnossa, vaikka se ei olekaan alunperin suomalainen laji. Lituruoho on Suomen luonnossa yleinen ja joka puolelle levinnyt laji ja myös sitä käytetään paljon koekasvina etenkin molekyylibiologisessa tutkimuksessa. Koivu edustaa suomalaisille taloudellisesti tärkeää lajia joka on kotoperäinen, monivuotinen ja lisäksi ekosysteemissä hallitseva laji eli niin sanottu avainlaji. Näitä neljää lajia tarkastellaan lyhyesti, ja niiden perusbiologian avulla selvitetään millaisia ympäristövaikutuksia niihin siirretyillä ominaisuuksilla voisi olla.

### 7.4.1 Sädelatva (*Gerbera hybrida*)

Sädelatva kuuluu mykerökukkaisten heimoon (*Asteraceae*). Se on alunperin kotoisin Etelä-Afrikasta eikä sitä tavata luonnonvaraisena tai villiintyneenä Suomesta. Sädelatva ei tule Suomessa toimeen kasvihuoneen ulkopuolella eikä sillä ole risteytyviä sukulaislajeja täällä. Sädelatvaa kasvatetaan koristekasviksi kasvihuoneissa. Koristekasviominaisuuksiin liittyvät myös tälle lajille tehtävät geeninsiirrot.

Koska sädelatva ei pysty leviämään Suomen luontoon, sillä ei siirtogeenisenäkään olisi negatiivisia ympäristövaikutuksia. Lisäksi siihen siirretyt ominaisuudet ovat koristekasviominaisuuksia, jotka vaikuttavat esimerkiksi kukan väriin, ja nämä ominaisuudet eivät luultavasti paranna kasvin kilpailukykyä missään olosuhteissa.

### 7.4.2 Tupakka (*Nicotiana tabacum*; *virginiantupakka*)

Tupakka kuuluu koisokasvien heimoon (*Solanaceae*) ja on kotoisin Keski-Amerikasta ja Etelä-Amerikan pohjoisosista. Tupakkaa ei viljellä Suomessa kaupalliseen käyttöön vaan sitä käytetään lähinnä koekasvina laboratorioissa. Poltettavaksi aiottavaa virginiantupakkaa viljellään eniten Pohjois-Amerikassa, Intiassa, Kiinassa, Turkissa ja Balkanin maissa. Suomessakin on aikaisemmin viljelty jonkin verran virginiantupakkaa ja etenkin sen sukulaislajia palturintupakkaa (*N. rustica*). Tupakkaa tavataan joskus viljelykarkulaisena puutarhojen lähistöllä. Varsinaisia luonnonpopulaatioita se ei kuitenkaan muodosta. Tupakka on hyönteispölytteinen kasvi ja ristipölytyksen lisäksi se pystyy itse pölyttämään itsensä. Virginian- ja palturintupakka eivät risteidy keskenään eikä niillä ole Suomessa muitakaan risteytyviä sukulaisia.

Tupakkaa käytetään koekasvina geeninsiirroissa, koska geeninsiirto ja siirtogeenisten kasvien kasvattaminen on sillä helppoa. Tupakkaan onkin siirretty valtava määrä erilaisia uusia ominaisuuksia. Koska tupakkaa ei Suomessa viljellä suuressa mittakaavassa kaupallisiin tarkoituksiin eivätkä laboratorioissa kasvatetut siirtogeeniset kasvit ole vaarassa levitä luontoon, niillä ei todennäköisesti ole negatiivisia ympäristövaikutuksia riippumatta kasviin siirretyistä ominaisuuksista.

### 7.4.3 Lituruoho (*Arabidopsis thaliana*)

Lituruoho kuuluu ristikukkaisiin (*Brassicaceae*). Sitä esiintyy luonnonvaraisena koko Suomessa, yleisimmin Etelä-Suomessa. Se kasvaa paahteisilla paikoilla, kuivilla kallioilla ja rinteillä, kuivilla kedoilla, ulkosaariston luodoilla ja usein asutuksen piirissä. Lituruoho on yksivuotinen kasvi ja se kukkii keväällä tai alkukesällä. Siemenet itävät syksyllä. Se on ristipölytteinen kasvi, mutta voi myös itse pölyttää itsensä. Lituruoholla ei ole risteytyviä sukulaislajeja Suomessa.

Lituruohoa käytetään paljon koekasvina molekyylibiologisessa tutkimuksessa pienen genominsa ja nopean elinkiertonsa vuoksi. Lituruohon siemenet ovat hyvin pieniä (0,5 mm) ja niitä on paljon. Tämän vuoksi siementen leviämistä on mahdollon valvoa. Vaikka siirtogeenistä lituruohoa kasvatettaisiinkin valvotuissa olosuhteissa, geenien leviämistä kasvatustilojen ulkopuolelle ei voida välttää. Lituruohon onkin siirretty ja tullaan tulevaisuudessa varmasti siirtämään suuri joukko erilaisia ominaisuuksia, joista jotkin voivat lisätä sen kilpailukykyä luonnonoloissa tai viljelyolosuhteissa. Lituruohon avulla tutkitaan kuitenkin lähinnä kas-

vigeenien toimintaa ja niiden ilmentymistä, eikä sitä viljellä suuressa mittakaavassa, jolloin geenien leviämistä ympäristöön ei luultavasti suuressa määrin tapahdu. Ympäristöriskien mahdollisuus tällä lajilla on todennäköisesti hyvin pieni.

#### **7.4.4 Rauduskoivu (*Betula pendula*)**

Rauduskoivua esiintyy laajalti koko Euroopassa ja Suomessakin se on levinnyt Inarin Lappiin saakka. Pohjois-Suomessa hieskoivu (*B. pubescens*) on kuitenkin yleisempi ja Lapissa esiintyvä tunturikoivu onkin hieskoivun alalaji. Rauduskoivu on yksi nopeakasvuisimmista boreaalisten metsien puulajeista ja se on voimakas kilpailija etenkin hyvillä kasvupaikoilla. Se vaatii kuitenkin runsaasti valoa ja kuusen tunkeutuessa kasvupaikalle se häviää vähitellen. Koivu on kasvupaikan suhteen melko vaatimaton ja kasvaa karuilla ja kuivillakin paikoilla. Se voi elää yli sata-vuotiaaksi.

Koivu on tuulipölytteinen kasvi ja sen siitepöly voi levitä laajoille alueille. Rauduskoivu kukkii toukokuussa. Hedelmät kypsyvät loppukesällä ja leviävät tuulen avulla syksyn ja talven aikana. Rauduskoivu voi myös risteytyä muiden suomalaisten koivulajien, etenkin vaivaiskoivun (*B. nana*), kanssa.

Koivu on avainlaji suomalaisissa ekosysteemeissä ja useat eliöryhmät (muun muassa sienijuuret, käävät, hyönteiset ja linnut) ovat siitä riippuvaisia. Rauduskoivu on nopeakasvuinen pioneerilaji ja sen siitepöly ja siemenet leviävät tuulen avulla laajoille alueille, joten geenien siirtymistä siirtogeenisestä koivusta luonnonpopulaatioihin ja sukulaislajeihin ei voida estää. Koivu on myös pitkäikäinen kasvi, jolloin uusien ominaisuuksien vaikutukset tulevat näkyviin vasta pitkien aikojen päästä. Tämän vuoksi koivun, kuten muidenkin metsäpuiden, kohdalla täytyy harkita hyvin tarkkaan, mitä ominaisuuksia siihen siirretään. Sienitauti- tai hyönteiskestävyyden siirtäminen koivuun voisi saada aikaan sen entistä tehokkaamman levittäytymisen. Koivusta onkin kehitteillä kukkimattomia muotoja, joiden avulla geenien leviäminen voitaisiin estää (Lemmetyinen ym. 1995).

# 8

## Yhteenveto ja pohdintaa

Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutuksista puhuttaessa täytyy erottaa toisistaan varsinaiset ympäristövaikutukset eli vaikutukset luonnon ekosysteemeihin, ja toisaalta vaikutukset maa- ja metsätalouteen, jolloin puhutaan enemmänkin taloudellisista näkökohdista. Esimerkiksi herbisidejä kestävät rikkakasvit ovat ensisijaisesti maatalouden ongelma. Toisaalta vaikutukset kohdistuvat laajemmaltiinkin ympäristöön herbisidien käyttömäärien ja -tapojen muuttuessa. Samoin kestävien hyönteiskantojen synty alentaa ensi sijassa satoja, mutta siirtogeenisten kasvien viljeleminen voi myös vaikuttaa käytettävien hyönteismyrkköjen laatuun ja määrään.

Herbisdikestävyys, hyönteiskestävyys, taudinkestävyys tai stressinsieto eivät ole uusia ominaisuuksia kasveissa. Näitä ominaisuuksia on aina ollut joissakin kasveissa, ja valinta- ja risteytysjalostuksen avulla niitä on pyritty viljelykasveissa parantamaan kautta kasvinjalostuksen historian. Siirtogeeniset kasvit eivät siis aina välttämättä tuo varsinaisia uusia ominaisuuksia kasvinviljelyyn. Geeninsiirtotekniikan avulla kasvinjalostus on helpottunut, kun uusia lajikkeita pystytään tuottamaan nopeasti verrattuna perinteiseen risteytysjalostukseen. Risteytysjalostuksessa ongelmana on geenien siirtymisen sattumanvaraisuus ja geenien kytkäytyminen, jolloin halutun ominaisuuden mukana siirtyy myös epätoivottuja ominaisuuksia, joista risteytyksen avulla on vaikea päästä eroon. Myös geeninsiirtotekniikkaa käytettäessä geeni sijoittuu kasvisolun genomiin sattumanvaraisesti ja voi kiinnittymispaikastaan riippuen haitata kasvisolun alkuperäisten geenien toimintaa. Tällaiset muutokset kasvin viljelyominaisuuksissa voidaan kuitenkin helposti havaita ja huonolaatuiset yksilöt karsitaan pois heti valikoinnin alkuvaiheessa. Geenin siirtyminen ja sen läsnäolo kasvissa on helppo todeta molekyylibiologisin menetelmin. Tämän jälkeen valitaan toivotunlaiset yksilöt, joista perustetaan klooniviljelmät. Populaatio on geneettiseltä koostumukseltaan yhtenäinen, eikä geeninsiirrosta menetetä kasvissa jo olevia haluttuja ominaisuuksia. Maa- ja metsätaloudessa täytyy kuitenkin aina huolehtia siitä, että lajin genettinen biodiversiteetti ei pääse kaventumaan. Tähän päästään esimerkiksi käyttämällä viljelyssä riittävä määrä eri populaatioita.

Tärkein ero risteytysjalostuksen ja geeninsiirtotekniikan välillä on geenivalikoiman laajeneminen, kun genejä ja ominaisuuksia voidaan siirtää hyvinkin erilaisten lajien välillä. Esimerkiksi herbisidejä kestäviä kasveja on perinteisen jalostuksen avulla ollut hankala saada aikaan, koska kestävyuden aikaansaavat mutaatiot entsyymeissä, joihin torjunta-aineet vaikuttavat, haittaavat usein kasvien aineenvaihduntaa ja heikentävät niiden elinkykyä. Maaperän mikrobit pystyvät hajottamaan herbisidejä ja niistä eristetyt geenit ovatkin tärkeä ja lähes rajaton herbisdikestävyuden lähde. Koska kasviin siirretty geeni ja sen tuottama entsyymi ovat kasvisolussa "ylimääräisinä", kasvin kelpoisuus ei herbisdikestävyuden vuoksi alene.

Kasvien leviäminen viljelmien ulkopuolelle, lajien välinen risteytyminen tai geenien siirtyminen eivät nekään ole geeniteknologian mukanaan tuomia ilmiöitä. Geenit eivät leviä siirtogeenisistä kasveista sen helpommin kuin perinteisistä lajikkeistakaan, sillä kasvien risteytyminen muiden lajien kanssa on niiden biologinen ominaisuus. Geenit ovat siirtyneet viljelykasveista muihin lajeihin tähänkin

asti, jos ne pystyvät risteytymään näiden lajien kanssa. Esimerkiksi kukin viljelykasvi kestää luonnostaan sitä herbisidiä, jota juuri sen kasvin viljelmällä on tähän päivään asti käytetty ja näillä kestävyysgeeneillä on ollut mahdollisuus siirtyä rikkakasveihin samalla tavoin kuin siirtogeenisistä kasveistakin. On kuitenkin todettu, että usein rikkakasvien herbisidikestävyys johtuu eri mekanismista kuin viljelykasvin (Dyer ym. 1993), mikä osoittaa, että rikkakasvi ei tällöin ole saanut ominaisuuttaan viljelykasvilta. Perinteisissä viljelykasveissa olevaan kestävyteen vaikuttavat yleensä luultavasti useat geenit, joiden siirtyminen yhtä aikaa on epätodennäköistä. Geenitekniikalla muunnetuissa kasveissa taas on kyse yhdestä ainoasta geenistä, jonka siirtyminen risteytymisen kautta on huomattavasti helpompaa ja nopeampaa.

Luonnossa tapahtuu spontaaneja mutaatioita koko ajan, ja valintapaineen alla tietyt mutaatiot pääsevät yleistymään. Herbisidejä kestävät rikkakasvipopulaatiot muodostuvatkin yleensä näiden spontaanien mutaatioiden kautta silloin, kun tiettyjä herbisidejä käytetään samoilla paikoilla pitkiä aikoja. Herbisidejä kestäviä rikkakasvilajeja on viimeisen parinkymmenen vuoden aikana raportoitu ympäri maailman jo satoja, vaikka siirtogeenisiä herbisidejä kestäviä kasveja ei vielä juurikaan ole ollut kaupallisessa viljelyssä. Koska herbisidikestävyys voi saada aikaan yhden aminohapon muutos yhdessä kasvin proteiinissa, kestäviä kasvipopulaatioita muodostuu valintapaineen alla nopeasti. Herbisidejä kestävät rikkakasvit eivät siis ole pelkästään siirtogeenisten kasvien mukanaan tuoma ongelma vaan niitä syntyy koko ajan nimenomaan herbisidien käytön vuoksi. Toisaalta yksittäisten herbisidikestävyysgeenien siirtyminen risteytymisen kautta on ajallisesti nopeampaa kuin kestävyysgeenin aiheuttavien mutaatioiden yleistyminen luonnonvalinnan kautta.

Herbisidejä kestävien kasvien tuottaminen voi aiheuttaa ongelmia maa- ja metsätaloudessa, jos kestävyysgeenit siirtyvät rikkakasveihin tai muuttavat siirtogeenisen kasvin rikkakasviksi. Tämä on selvä riski kasveilla, jotka jo nyt esiintyvät rikkakasveina muilla viljelyksillä tai joilla tiedetään olevan risteytymiskykyisiä lähisukuisia lajeja (Suomessa lähinnä rypsi ja mahdollisesti sokerijuurikas). Yhtä herbisidiä kestävät rikkakasvit voidaan tuhota toisella herbisidillä, mutta erityisen hankalaksi ongelman tekisi useiden kestävyysgeenien siirtyminen samaan kasviin. Herbisidejä kestävien rikkakasvien siirtyminen läheisille viljelmille on erityinen ongelma viljelijöille, jotka eivät käytä siirtogeenisiä lajikkeita, ja jotka eivät mahdollisesti tiedä tällaisten lajikkeiden olevan viljelyssä. Tällainen tilanne voi johtaa väärin torjunta-aineiden valintaan ja hankalaan rikkakasviongelmaan. Tällaisten ongelmien ennaltaehkäisy on tärkeää.

Herbisidejä käytetään nykyään määrällisesti enemmän kuin mitään muita torjunta-aineita eikä viljelypinta-ala, jolla herbisidejä käytetään, todennäköisesti tule kasvamaan siirtogeenisten kasvien viljelynoton myötä. Usein ajatellaan, että siirtogeenisten kasvien viljelmällä herbisidejä tullaan käyttämään huolettomammin ja suurempina määrinä, kun ei ole pelkoa viljelykasvien vahingoittumisesta. Herbisidien käyttöönkin vaikuttavat kuitenkin taloudelliset näkökohdat ja viljelijät tuskin haluavat käyttää torjunta-aineita enemmän kuin on pakko. Herbisidikestävyysgeenin siirtäminen kasveihin voi myös mahdollistaa tehokkaampien ja siten pienempinä määrinä käytettävien ja ympäristölle vähemmän haitallisten herbisidien käytön. Herbisidejä kestävien rikkakasvien kehittyminen kuitenkin mitätöisi tämän kehityksen ja herbisidejä voitaisiin joutua käyttämään entistä enemmän, kun kestäviä rikkakasveja pitäisi torjua muilla aineilla. Siirtogeenisten kasvien vaikutusta herbisidien käyttömääriin ei kuitenkaan tiedetä, koska käytännön kokemusta ei vielä ole. Lisää tietoa tarvitaan. Myöskään vaihtoehtoja herbisidien käytölle ei pidä unohtaa — paras vaihtoehto ympäristölle olisi herbisidien käytön

lopettaminen kokonaan. Esimerkiksi luomuviljelyssä herbisidejä ei käytetä ja perinteisen viljelykierron avulla rikkakasviongelmaa voidaan jonkin verran pienentää.

Hyönteiskestävyiden aikaansaava Bt-toksiinien tuottaminen kasveissa on tuonut vaihtoehdon perinteisille tuhohyönteisten torjunta-aineille, jotka hävittävät valikoimatta niin hyödylliset kuin haitallisetkin hyönteiset. Bt-toksiinit ovat tehokkaita ja hyönteislajispesifisiä eivätkä ne vaikuta kasveja syöviin eläimiin tai ihmisiin. Ne hajoavat lisäksi maassa nopeasti. Bt-toksiineja on käytetty tuhohyönteisten torjuntaan sellaisenaan jo vuosikymmeniä, mutta niiden ilmentyminen kasveissa vähentäisi niiden määrää ympäristössä entisestään. Kestävien hyönteiskantojen kehittyminen on kuitenkin muodostunut ongelmaksi jo Bt-toksiinien perinteisessäkin käytössä ja tilanne voi pahentua, kun toksiineja sisältäviä kasveja otetaan laajempaan viljelyyn. Tämä on hankala tilanne etenkin luomuviljelijöille, joille Bt-toksiinivalmisteet ovat tähän mennessä olleet tehokkaimpia käytettävissä olevia luonnonmukaisia hyönteismyrkkyjä. Kestävien hyönteispopulaatioiden kehittymistä on tärkeä seurata ja niiden syntyminen tulee mahdollisuuksien mukaan estää. Siirtogeenisten kasvien tapauksessa tiettyä kasvia ravintonaan käyttävät hyönteiset altistuvat jatkuvasti tietyille toksiinille ja kestävien yksilöiden valikoituessa kestäviä hyönteispopulaatioita syntyy nopeasti. Lisäksi on todettu, että hyönteisten Bt-toksiinireseptorit eivät ole aivan niin spesifisiä kuin on luultu, minkä vuoksi kestävyys yhtä toksiinia vastaan voi saada aikaan kestävyuden myös muita toksiineja vastaan. Bt-toksiinia tuottavien kasvien joukkoon pitäisikin istuttaa tietty määrä ei-siirtogeenisiä kasveja, jotka toimisivat Bt-toksiineille alttiiden hyönteisyksilöiden varastona, jotka toisivat populaatioon toksiineille altistavia geenejä. Tällöin kestävyysgeenit eivät pääse lisääntymään hyönteispopulaatiossa niin nopeasti.

Viruskestävyyden aikaansaamiseksi kasviin siirretään yleensä sitä infektoivan viruksen kuoriproteiini- tai rakenneproteiinigeeni. Jos kasvi tuottaa toimivaa kuoriproteiinia, jonkin toisen kasvia infektoivan viruksen perintöaines saattaa pakkautua tähän kuoreen. Koska kuoriproteiini saa osaltaan aikaan viruksen isäntäspesifisyyden, tämä pakkautuminen, niin sanottu transkapsidaatio, voi saada aikaan viruksen isäntäspesifisyyden tai leviämistavan muuttumisen. Transkapsidaatiota ei kuitenkaan ole luonnossa havaittu tapahtuvan ja se on toteutuessaankin väliaikainen ilmiö, sillä seuraavalla lisääntymiskierroksella viruksen kuori syntetoidaan sen omasta genomista. Kasvia infektoivan viruksen perintöaines voi myös rekombinoitua siirtogeenisen kasvin genomissa olevan virusmateriaalin kanssa. Tällainen muutos on periytyvä ja voi teoriassa saada aikaan uuden virus-tyyppin muodostumisen. Samalla tavalla on kahden kasvia yhtä aikaa infektoivan viruksen rekombinaatiokin mahdollista, eivätkä kasveissa ilmentyvät virusgeenit juurikaan kasvata tällaisen rekombinaation mahdollisuutta. Lisäksi kasveihin yleensä siirretään juuri kasvia infektoivien virusten geenejä, jolloin ne eivät aiheuta muutoksia virusten perimään. Viruskestävyyden riskejä arvioitaessa täytyy muistaa, että viruksia vastaan ei ole olemassa torjunta-aineita — tehokkain virus-torjuntakeino on siis viruksia kestävien lajikkeiden kehittäminen.

Sieni- ja bakteeritauteja kestävien lajikkeiden kehittäminen ja viljeleminen voisi vähentää torjunta-aineiden käyttömääriä ja niiden jäämiä maaperässä ja sadoissa. Myös taudinaiheuttajien, esimerkiksi homesienten tuottamat myrkylliset aineet sadoissa voisivat vähentyä, jolloin ravinnon laatu paranisi. Taudit saattavat joillakin lajeilla olla populaation kasvua rajoittavia tekijöitä, minkä vuoksi kasviin siirretty taudinkestävyys voi saada aikaan kasvin kilpailukyvyyn kasvamisen ja lajin leviämisen uusille alueille ja jopa lisääntymisen muiden lajien kustannuksella. Suuri osa viljelykasveista on niin pitkälle jalostettuja, että ne eivät tauteja kestävinäkään leviäisi luontoon, mutta siirtäessään geenejä sukulaislajeihin ne voisivat saada aikaan muutoksia näissä lajeissa. Taudinkestävyiden siirtäminen metsäpuihin on huomattavasti riskialttiimpaa. Näillä lajeilla taudit voivat normaaliolois-

sa rajoittaa populaatioiden kasvua, jolloin taudinkestävyys saisi aikaan huomattavan kilpailukyvyn kasvamisen. Koska puut ovat avainlajeja metsäekosysteemisä, ne voisivat uusille kasvupaikoille levitessään vaikuttaa huomattavastikin lajien väliseen tasapainoon. Taudinkestävyys saadaan usein aikaan erilaisilla kasvilla ilmentyvillä sienten ja bakteerien rakennetta hajottavilla entsyymeillä, ja tällaiset aineet voivat vaikuttaa haitallisesti myös muihin kuin tauteja aiheuttaviin bakteereihin tai sieniin, esimerkiksi sienijuuriin tai maaperän typensitotjabakteereihin.

Erilaiset stressinsieto-ominaisuudet ovat tärkeitä etenkin Suomen pohjoisissa oloissa. Hyvä talvenkestävyys on välttämätön ominaisuus monivuotisilla kasveilla. Talvesta selvitäkseen kasveilla täytyy myös olla kyky torjua talvituhoisien hyökkäykset lumen alla. Erilaisten stressien parantunut sieto voi myös saada aikaan kasvin kilpailukyvyn parantumisen. Kuten taudinkestävyden kohdallakin mainittiin, pitkälle jalostetut viljelykasvit eivät luultavasti pysty leviämään luontoon, vaikka niiden stressinsietoa parannettaisiin. Muihin lajeihin siirtyessään esimerkiksi parantunut pakkaskestävyys tai suolansieto voisivat auttaa lajeja leviämään uusille alueille, mikä voisi vaikuttaa kasvupaikalla jo olevien ekosysteemien rakenteeseen.

Merkkigeeninä käytetyn antibioottikestävyuden pelätään siirtyvän siirtogeenisistä kasveista maaperän bakteereihin tai kasveja syövien nisäkkäiden suolistobakteereihin. Periaatteessa kestävyysgeenien siirtyminen kasvijätteistä maaperän bakteereihin ja niiden ilmentyminen siellä on mahdollista. Nämä geenit on kuitenkin alunperin eristetty maaperäbakteereista, joten niiden siirtyminen ei juurikaan lisää kestävyysgeenien määrää näissä bakteereissa. Kestävyysgeenien siirtyminen kasveja syövien nisäkkäiden suolistobakteereihin on epätodennäköistä, sillä ruoansulatusentsyymit pilkkovat DNA:ta tehokkaasti. Siirtogeenisissä kasveissa ei myöskään yleensä käytetä ihmisten ja eläinten hoidossa käytettäville antibiooteille vastustuskyvyn antavia geenejä, joten kestävyysgeenien mahdollinen siirtyminen ja ilmentyminen suolistobakteereissa ei tee antibioottihoitoa tehottomaksi.

Antibioottikestävyuden käytöstä merkkigeeninä voidaan vähitellen luopua, kun vaihtoehtoisia menetelmiä saadaan kehitettyä. Tällaisia menetelmiä ei kuitenkaan vielä ole riittävästi käytettävissä. Merkkigeeni voidaan myös haluttaessa poistaa valikoinnin jälkeen, jolloin geenin ilmentymisen tai siirtymisen vaaraa ei täysikasvuisilla siirtogeenisillä kasveilla ole.

## Siirtogeenisten kasvien ympäristöriskit Suomessa

Suomi on pohjoisen sijaintinsa ja ilmastonsa ansiosta melko edullisessa asemassa siirtogeenisten kasvien ympäristöriskien kannalta, sillä useimmat tärkeät viljelykasvit eivät metsäpuita lukuunottamatta pysty täällä leviämään ja muodostamaan luonnonpopulaatioita. Koska useimmat viljelykasvit ovat alunperin kotoisin muualta, niillä ei myöskään ole täällä sukulaisia, joiden kanssa ne voisivat risteytyä. Tämän vuoksi geenien leviäminen siirtogeenisistä kasveista on, todennäköisesti jälleen metsäpuita lukuunottamatta, Suomen luonnonoloissa melko vähäistä. Kookonaisten ekosysteemien toimintaa ei kuitenkaan tunneta kunnolla ja uudenlaisien kasvien ja niiden sisältämien ominaisuuksien tai kemiallisten yhdisteiden vaikutuksia luonnon ekosysteemeihin ei myöskään tunneta eikä pystytä ennustamaan. Tämän vuoksi täytyy mahdollisimman tarkkaan hankkia tietoa muun muassa geenien kulkeutumisesta, geenien säilymisestä maaperässä sekä siirtogeenin toimintaan ja säätelyyn vaikuttavista tekijöistä. Siirtogeenisten kasvien kohdalla kyseessä ovat yleensä yhdestä tai muutamasta yksilöstä alkunsa saaneet klooni-viljelmät ja kunkin lajin riittävästä geneettisen monimuotoisuuden säilyttämisestä on huolehdittava. Siirtogeenisten kasvien viljelmät ovat samanlaisia kuin mitkä

tahansa monokulttuurit ja ne voivat olla erityisen riskialttiita tuholais- tai tautiepidemioille. Tämä koskee etenkin hidaskasvuisia ja pitkäikäisiä lajeja kuten metsäpuita, joilla geneettisen monimuotoisuuden säilyttäminen on erityisen tärkeää.

Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutukset täytyy aina selvittää tapauskohtaisesti. Koska siirtogeeninen kasvi poikkeaa alkuperäisestä lajikkeesta pääsääntöisesti vain siihen siirretyn ominaisuuden osalta, nimenomaan siirretyn ominaisuuden vaikutuksiin tulisikin riskinarvioinnissa keskittyä. Siirretyn geenin mahdolliset pleiotrooppiset vaikutukset tulee kuitenkin myös huomioida. Ympäristövaikutuksia tutkittaessa lähdetään jo olemassa olevista tiedoista ja arvioidaan sitten siirretyn ominaisuuden vaikutuksia kyseessä olevaan kasvilajiin. Ympäristöriskien lisäksi tulisi huomioida myös mahdolliset positiiviset ympäristövaikutukset, jolloin haittojen ja hyötyjen keskinäinen arviointi on mahdollista. Koska kokemusta siirtogeenisten kasvien laajamittaisesta viljelystä ei vielä ole, sen vaikutuksia ympäristöön ja etenkin luonnonympäristöön voidaan vain arvioida. Ympäristövaikutukset saattavat tulla näkyviin vasta pitkienkin aikojen kuluessa. Tämän vuoksi geenien leviäminen tulisi mahdollisuuksien mukaan estää. Jos jollakin lajilla geenien leviämistä ei kuitenkaan voida estää, täytyy tarkoin harkita, mitä ominaisuuksia siihen siirretään, jotta ympäristöriskit voidaan minimoida.

Geenejä löydetään jatkuvasti lisää ja siirtogeenisten kasvien määrä tulee varmasti kasvamaan. Tulevaisuudessa siirrettävien ominaisuuksien painopiste siirtynee kestävyysgeeneistä enemmän laatuominaisuuksiin. Riskinarviointi on aina tehtävä tapauskohtaisesti, mutta kaikkien viljelyssä olevien siirtogeenisten kasvien kohdalla on huolehdittava siitä, että lajin geneettinen monimuotoisuus ei pääse kapenemaan.



# Kirjallisuus

- Abdullah, R., Cocking, E. C. & Thompson, J. A. 1986: Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technology* 4:1087-1090.
- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. & Beachy, R. N. 1986: Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Allen, G. C., Hall Jr, G. E., Childs, L. C., Weissinger, A. K., Spiker, S. & Thompson, W. F. 1993: Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *The Plant Cell* 5:603-613.
- Alstad, D. N. & Andow, D. A. 1995: Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268:1894-1896.
- Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V. & Vasil, I. K. 1996: Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nature Biotechnology* 14:1155-1159.
- Alwen, A., Eller, N., Kastler, M., Moreno, R. M. B. & Heberle-Bors, E. 1990: Potential of in vitro pollen maturation for gene transfer. *Physiol. Plant.* 79:194-196.
- Anderson, J. M., Palukaitis, P. & Zaitlin, M. 1992: A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8759-8763.
- Angle, J. S. 1994: Release of transgenic plants: biodiversity and population-level considerations. *Mol. Ecol.* 3:45-50.
- Anzai, H., Yoneyama, K. & Yamaguchi, I. 1989: Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Mol. Gen. Genet.* 219:492-494.
- Astwood, J. D., Leach, J. N. & Fuchs, R. L. 1996: Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology* 14:1269-1273.
- Ayub, R., Guis, M., Amor, M. B., Gillot, L., Roustan, J.-P., Latché, A., Bouzayen, M. & Pech, J.-C. 1996: Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology* 14:862-866.
- Bachem, C. W. B., Speckmann, G.-J., van der Linde, P. C. G., Verheggen, F. T. M., Hunt, M. D., Steffens, J. C. & Zabeau, M. 1994: Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Bio/Technology* 12:1101-1105.
- Baertlein, D. A., Lindow, S. E., Panopoulos, N. J., Lee, S. P., Mindrinos, M. N. & Chen, T. H. H. 1992: Expression of a bacterial ice nucleation gene. *Plant Physiol.* 100:1730-1736.
- Bagga, S., Adams, H., Kemp, J. D. & Sengupta-Gopalan, C. 1995: Accumulation of 15-kilodalton zein in novel protein bodies in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 107:13-23.
- Barton, K. A. & Miller, M. J. 1993: Production of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in plants. Teoksessa Kung, S.-D. & Wu, R. (toim.): *Transgenic plants*. Academic Press, Inc., Orlando, FL. S. 297-315.
- Baulcombe, D. C. 1996: Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* 8:1833-1844.
- Beck, D. L., Van Dolleweerd, C. J., Lough, T. J., Balmori, E., Voot, D. M., Andersen, M. T., O'Brien, I. E. W. & Forster, R. L. S. 1994: Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10310-10314.
- Beffa, R., Szell, M., Meuwly, P., Pay, A., Vögeli-Lange, R., Métraux, J.-P., Neuhaus, G., Meins Jr, F. & Nagy, F. 1995: Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J.* 14:5753-5761.
- Benfey, P. N. & Chua, N.-H. 1990: The cauliflower mosaic virus 35S promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250:959-966.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. & Staskawicz, B. J. 1994: *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856-1860.

- Bergelson, J. 1994: Changes in fecundity do not predict invasiveness: a model study of transgenic plants. *Ecology* 75:249-252.
- Bevan, M. W., Flavell, R. B. & Chilton, M.-D. 1983: A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304:184-187.
- Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P. & Abbondandolo, A. 1997: Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* 45:1957-1962.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M. & Inzé, D. 1991: Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10:1723-1732.
- Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. & Sanford, J. C. 1988: Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240:1534-1538.
- Brandle, J. E., McHugh, S. G., James, L., Labbé, H. & Miki, B. L. 1995: Instability of transgene expression on field grown tobacco carrying the *csr1-1* gene for sulfonylurea herbicide resistance. *Bio/Technology* 13:994-998.
- Breyne, P., Van Montagu, M., Depicker, A. & Gheysen, G. 1992: Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *The Plant Cell* 4:463-471.
- Brogliè, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. & Brogliè, R. 1991: Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254:1194-1197.
- Caboche, M. 1990: Liposome-mediated transfer of nucleic acids in plant protoplasts. *Physiol. Plant.* 79:173-176.
- Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H.-J., Sandal, N. N., Marcker, K. A., Klein-Lankhorst, R. M., Salentijn, E. M., Lange, W., Stiekema, W. J., Wyss, U., Grundle, F. M. W. & Jung, C. 1997: Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275:832-834.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. 1994: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Christou, P., McCabe, D. E. & Swain, W. F. 1988: Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* 87:671-674.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J. A., Dodds, J. A. & Beachy, R. N. 1995: A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* 206:307-313.
- Crawley, M. J., Hails, R. S., Rees, M., Kohn, D. & Buxton, J. 1993: Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363:620-623.
- Cuozzo, M., O'Connell, K. M., Kaniewski, W., Fang, R.-X., Chua, N.-H. & Tumer, N. E. 1988: Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6:549-557.
- Dale, E. C. & Ow, D. W. 1990: Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91:79-85.
- Dale, P. J. 1994: The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: general considerations. *Mol. Ecol.* 3:31-36.
- Dalsgaard, K., Uttenthal, Å., Jones, T. D., Xu, F., Merryweather, A., Hamilton, W. D. O., Langeveld, J. P. M., Boshuizen, R. S., Kamstrup, S., Lomonosoff, G. P., Porta, C., Vela, C., Casal, J. I., Meloen, R. H. & Rodgers, P. B. 1997: Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnology* 15:248-252.
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. & Lee, S.-H. 1998: Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology* 16:345-348.
- Darmency, H. 1994: The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: introgression and weediness. *Mol. Ecol.* 3:37-40.
- De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gosselé, V., Movva, N. R., Thompson, C., Van Montagu, M. & Leemans, J. 1987: Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6:2513-2518.

- De Jong, W. & Ahlquist, P. 1992: A hybrid plant RNA virus made by transferring the noncapsid movement protein from a rod-shaped to an icosahedral virus is competent for systemic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6808-6812.
- Dekeyser, R. A., Claes, B., De Rycke, R. M. U., Habets, M. E., Van Montagu, M. C. & Caplan, A. B. 1990: Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *The Plant Cell* 2:591-602.
- De la Fuente, J. M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J. L. & Herrera-Estrella, L. 1997: Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568.
- De la Fuente-Martínez, J. M., Mosqueda-Cano, G., Alvarez-Morales, A. & Herrera-Estrella, L. 1992: Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bio/Technology* 10:905-909.
- De la Peña, A., Lörz, H. & Schell, J. 1987: Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature* 325:274-276.
- Dieryck, W., Pagnier, J., Poyart, C., Marden, M. C., Gruber, V., Bournat, P., Baudino, S. & Mérot, B. 1997: Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature* 386:29-30.
- Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-El-Saad, M., Xu, D. & Wu, R. 1996: Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology* 14:494-498.
- Dyer, W. E., Hess, F. D., Holt, J. S. & Duke, S. O. 1993: Potential benefits and risks of herbicide-resistant crops produced by biotechnology. *Horticultural Reviews* 15:367-408.
- Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. & Yamakado, M. 1997: Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2117-2121.
- Ebskamp, M. J. M., van der Meer, I. M., Spronk, B. A., Weisbeek, P. J. & Smeekens, S. C. M. 1994: Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *Bio/Technology* 12:272-275.
- Ellis, D. D., McCabe, D. E., McInnis, S., Ramachandran, R., Russell, D. R., Wallace, K. M., Martinell, B. J., Roberts, D. R., Raffa, K. F. & McCown, B. H. 1993: Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology* 11:84-89.
- Elomaa, P., Honkanen, J., Puska, R., Seppänen, P., Helariutta, Y., Mehto, M., Kotilainen, M., Nevalainen, L. & Teeri, T. H. 1993: *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Bio/Technology* 11:508-511.
- Emmerman, A. 1995: Genetisk modifierade växter och herbicidtolerans. Rapporttiluonno 6.10.1995. Jordbruksverket, Ruotsi. 7 s.
- Falk, B. W. & Bruening, G. 1994: Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? *Science* 263:1395-1396.
- Farinelli, L., Malnoë, P. & Collet, G. F. 1992: Heterologous encapsidation of potato virus Y strain O (PVY<sup>O</sup>) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVY<sup>N</sup>) in *Solanum tuberosum* cv. Bintje. *Bio/Technology* 10:1020-1025.
- Feldmann, K. A. & Marks, M. D. 1987: *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 208:1-9.
- Ferré, J., Real, M. D., Van Rie, J., Jansens, S. & Peferoen, M. 1991: Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5119-5123.
- Fiedler, U. & Conrad, U. 1995: High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/Technology* 13:1090-1093.
- Fillatti, J. J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. & Comai, L. 1987: *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* 206:192-199.
- Finnegan, J. & McElroy, D. 1994: Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio/Technology* 12:883-888.
- Fischhoff, D. A., Bowdish, K. S., Perlak, F. J., Marrone, P. G., McCormick, S. M., Niedermeyer, J. G., Dean, D. A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E. J., Rochester, D. E., Rogers, S. G. & Fraley, R. T. 1987: Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology* 5:807-813.
- Flavell, R. B., Dart, E., Fuchs, R. L. & Fraley, R. T. 1992: Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology* 10:141-144.

- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L. & Woo, S. C. 1983: Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-4807.
- Fromm, M. E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J. & Klein, T. M. 1990: Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8:833-839
- Fromm, M. E., Taylor, L. P. & Walbot, V. 1986: Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319:791-793.
- Fuchs, R. L., Ream, J. E., Hammond, B. G., Naylor, M. W., Leimgruber, R. M. & Berberich, S. A. 1993: Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio/Technology* 11:1543-1547.
- Furner, I. J., Huffman, G. A., Amasino, R. M., Garfinkel, D. J., Gordon, M. P. & Nester, E. W. 1986: An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature* 319:422-427.
- Gaillard, A., Matthys-Rochon, E. & Dumas, C. 1992: Selection of microspore derived embryogenic structures in maize related to transformation potential by microinjection. *Bot. Acta* 105:313-318.
- Gaugitsch, H. & Torgersen, H. 1995: Streamlining regulations, keeping high safety standards: revised criteria for the assessment of releases of genetically modified organisms (GMOs) into the environment. *Ambio* 24:47-50.
- Gliddon, C. 1994: The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: biological models and theoretical perspectives. *Mol. Ecol.* 3:41-44.
- Goldburg, R. J. & Tjaden, G. 1990: Are B.t.k. plants really safe to eat? *Bio/Technology* 8:1011-1015.
- Goldman, M. H. S., Goldberg, R. B. & Mariani, C. 1994: Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J.* 13:2976-2984.
- Golds, T., Maliga, P. & Koop, H.-U. 1993: Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technology* 11:95-97.
- Goldsbrough, A. P., Lastrella, C. N. & Yoder, J. I. 1993: Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/Technology* 11:1286-1292.
- Golemboski, D. B., Lomonosoff, G. P. & Zaitlin, M. 1990: Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6311-6315.
- Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T. D., Wernsman, E. A. & Dougherty, W. G. 1996: Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *The Plant Cell* 8:95-105.
- Gordon-Kamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., O'Brien, J. V., Chambers, S. A., Adams Jr, W. R., Willetts, N. G., Rice, T. B., Mackey, C. J., Krueger, R. W., Kausch, A. P. & Lemaux, P. G. 1990: Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell* 2:603-618.
- Gould, F., Anderson, A., Jones, A., Sumerford, D., Heckel, D. G., Lopez, J., Micinski, S., Leonard, R. & Laster, M. 1997: Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3519-3523.
- Gould, F., Martínez-Ramírez, A., Anderson, A., Ferré, J., Silva, F. J. & Moar, W. J. 1992: Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7986-7990.
- Goy, P. A. & Duesing, J. H. 1996: Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Bio/Technology* 14:39-40.
- Grayburn, W. S., Collins, G. B. & Hildebrand, D. F. 1992: Fatty acid alteration by a  $\Delta 9$  desaturase in transgenic tobacco tissue. *Bio/Technology* 10:675-678.
- Gupta, P. K., Pullman, G., Timmis, R., Kreitinger, M., Carlson, W. C., Grob, J. & Welty, E. 1993: Forestry in the 21st century: The biotechnology of somatic embryogenesis. *Bio/Technology* 11:454-459.
- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P. H., Stöcker, R. H. & Stenzel, K. 1993: Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361:153-156.

- Hamilton, A. J., Lycett, G. W. & Grierson, D. 1990: Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284-287.
- Hanson, A. D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M. O. & Gage, D. A. 1994: Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:306-310.
- Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D. & Arntzen, C. J. 1995: Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.
- Harrison, B. D., Mayo, M. A. & Baulcombe, D. C. 1987: Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328:799-802.
- Hart, C. M., Fischer, B., Neuhaus, J.-M. & Meins Jr, F. 1992: Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defense-related tobacco chitinase gene. *Mol. Gen. Genet.* 235:179-188.
- Heap, I. M. 1997. The Occurrence of Herbicide-Resistant Weeds Worldwide. *Pesticide Science* (painossa). Saatavilla myös [www.muodossa](http://www.muodossa): <URL: <http://www.pioneer.net/~heapian/>>.
- Herbers, K., Wilke, I. & Sonnewald, U. 1995: A thermostable xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco has no detrimental effects and is easily purified. *Bio/Technology* 13:63-66.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. & Schell, J. 1983: Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303:209-213.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. & Bowdish, K. 1989: Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76-78.
- Hinchee, M. A. W., Connor-Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R. E., Sato, S. J., Gasser, C. S., Fischhoff, D. A., Re, D. B., Fraley, R. T. & Horsch, R. B. 1988: Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6:915-922.
- Hinchee, M. A. W., Padgett, S. R., Kishore, G. M., Delannay, X. & Fraley, R. T. 1993: Herbicide-tolerant crops. Teoksessa Kung, S.-D. & Wu, R. (toim.): *Transgenic plants*. Academic Press, Inc. Orlando, FL. S. 243-263.
- Hoffmann, T., Golz, C. & Schieder, O. 1994: Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Current Genet.* 27:70-76.
- Holmberg, N., Lilius, G., Bailey, J. E. & Bülow, L. 1997: Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nature Biotechnology* 15:244-247.
- Hu, C.-Y., Chee, P. P., Chesney, R. H., Zhou, J. H., Miller, P. D. & O'Brien, W. T. 1990: Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep.* 9:1-5.
- Häggman, H. M., Aronen, T. S. & Nikkanen, T. O. 1997: Gene transfer by particle bombardment to Norway spruce and Scots pine pollen. *Can. J. For. Res.* 27:928-935.
- Ishizaki-Nishizawa, O., Fujii, T., Azuma, M., Sekiguchi, K., Murata, N., Ohtani, T. & Toguri, T. 1996: Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotechnology* 14:1003-1006.
- James, C. & Krattiger, A. F. 1996: Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants, 1986 to 1995: The first decade of crop biotechnology. ISAAA, Ithaca, NY. 31 s.
- Jank, B., Haymerle, H. & Doblhoff-Dier, O. 1997: Zurich hazard analysis in biotechnology. *Nature Biotechnology* 14:894-896.
- Jefferson, R. A. 1989: The GUS reporter gene system. *Nature* 342: 837-838.
- John, M. E. & Keller, G. 1996: Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12768-12773.
- Johnston, S. A., Anziano, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C. & Butow, R. A. 1988: Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* 240:1538-1541.
- Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Peters, J., Bosch, D. & Stiekema, W. J. 1995: Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8041-8045.
- Jørgensen, R. B. & Andersen, B. 1994: Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (Brassicaceae): a risk of growing genetically modified oilseed rape. *Amer. J. Bot.* 81:1620-1626.

- Kaeppeler, H. F., Gu, W., Somers, D. A., Rines, H. W. & Cockburn, A. F. 1990: Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Rep.* 9:415-418.
- Kareiva, P., Morris, W. & Jacobi, C. M. 1994: Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Mol. Ecol.* 3:15-21.
- Kareiva, P., Parker, I. M. & Pascual, M. 1996: Can we use experiments and models in predicting the invasiveness of genetically engineered organisms? *Ecology* 77:1670-1675.
- Kawchuck, L. M., Martin, R. R. & McPherson, J. 1991: Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Mol. Plant-Microbe Int.* 4: 247-253.
- Kenward, K. D., Altschuler, M., Hildebrand, D. & Davies, P. L. 1993: Accumulation of type I fish antifreeze protein in transgenic tobacco is cold-specific. *Plant Mol. Biol.* 23:377-385.
- Kishor, P. B. K., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A. A. & Verma, D. P. S. 1995: Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108:1387-1394.
- Kivi, E. 1983: Pölyä pinsetin kärjissä. Kasvinjalostuksen kartoitusta. Keskusosuusliike Hankkija. 191 s.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. & Sanford, J. C. 1987: High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- Knutzon, D. S., Thompson, G. A., Radke, S. E., Johnson, W. B., Knauf, V. C. & Kridl, J. C. 1992: Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2624-2628.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M. & Iba, K. 1994: Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 105:601-605.
- Koncz, C., Olsson, O., Langridge, W. H. R., Schell, J. & Szalay, A. A. 1987: Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:131-135.
- Kurtto, A. & Lahti, T. 1997: Suomen putkilokasvien luettelo (Checklist of the vascular plants in Finland). Pamphl. Bot. Mus. Univ. Helsinki II: I.-VI + 1 - 163. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa): <URL: <http://www.helsinki.fi/kmus>>
- Kuwata, S., Masuta, C. & Takanami, Y. 1991: Reciprocal phenotype alterations between two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 72: 2385-2389.
- Kyozuka, J., Fujimoto, H., Izawa, T. & Shimamoto, K. 1991: Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Mol. Gen. Genet.* 228:40-48.
- Kyozuka, J., McElroy, D., Hayakawa, T., Xie, Y., Wu, R. & Shimamoto, K. 1993: Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiol.* 102:991-1000.
- Lam, E. & Chua, N.-H. 1990: GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science* 248:471-473.
- Lampel, J. S., Canter, G. L., Dimock, M. B., Kelly, J. L., Anderson, J. J., Uratani, B. B., Foulke Jr, J. S. & Turner, J. T. 1994: Integrative cloning, expression and stability of the *cryIa(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:501-508.
- Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W. J. & Beachy, R. N. 1993: A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J.* 4:959-970.
- Lebel, E. G., Masson, J., Bogucki, A. & Paszkowski, J. 1995: Transposable elements as plant transformation vectors for long stretches of foreign DNA. *Theor. Appl. Genet.*
- Leemans, J. 1993: Ti to tomato, tomato to market. *Bio/Technology* 11:S22-S26.
- Lefebvre, D. D., Miki, B. L. & Laliberté, J.-F. 1987: Mammalian metallothionein functions in plants. *Bio/Technology* 5:1053-1056.
- Lemmetyinen, J., Elo, A. & Sopanen, T. 1995: Kukkimattomien koivujen kehittäminen kukintospesifisten geenien avulla. Teoksessa Oksa, E. (toim.): Metsäntutkimus uusissa puissa: monistusta ja molekyylijä. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574. Metsäntutkimuslaitos, Punkaharjun tutkimusasema. S. 93-102.
- Linder, C. R. & Schmitt, J. 1994: Assessing the risks of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. *Mol. Ecol.* 3:23-30.
- Lindsey, K. & Jones, M. G. K. 1990: Electroporation of cells. *Physiol. Plant.* 79:168-172.

- Liu, D., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. 1994: Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1888-1892.
- Lodge, J. K., Kaniewski, W. K. & Tumer, N. E. 1993: Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7089-7093.
- Logemann, J., Jach, G., Tommerup, H., Mundy, J. & Schell, J. 1992: Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology* 10:305-308.
- Lucas, W. J., Lansing, A., de Wet, J. R. & Walbot, V. 1990: Introduction of foreign DNA into walled plant cells via liposomes injected into the vacuole: a preliminary study. *Physiol. Plant.* 79:184-189.
- Ludwig, S. R., Bowen, B., Beach, L. & Wessler, S. R. 1990: A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science* 247:449-450.
- Luo, Z.-X. & Wu, R. 1989: A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7:69-77.
- Ma, J. K.-C., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N. D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. & Lehner, T. 1995: Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268:716-719.
- Ma, S.-W., Zhao, D.-L., Yin, Z.-Q., Mukherjee, R., Singh, B., Qin, H.-Y., Stiller, C. R. & Jevnikar, A. M. 1997: Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nature Med.* 3:793-796.
- Madsen, K. H., Blacklow, W. M. & Jensen, J. E. 1996: Simulation of herbicide-use in a crop rotation with transgenic herbicide resistant sugarbeet. Second International Weed Control Congress, Copenhagen 1996:1387-1391.
- Maiti, I. B., Wagner, G. J., Yeargan, R. & Hunt, A. G. 1989: Inheritance and expression of the mouse metallothionein gene in tobacco. *Plant Physiol.* 91:1020-1024.
- Malkamäki, U. 1997: Tekijät, jotka vaikuttavat geenifrekvenssien muuttumiseen populaatioissa. Raportti. Suomen ympäristökeskus, kemikaaliyksikkö. 12 s.
- Mannonen, L., Ritala, A., Nuutila, A. M., Kurtén, U., Aspegren, K., Teeri, T. H., Aikasalo, R., Tammissola, J. & Kauppinen, V. 1997: Thermotolerant fungal glucanase in malting barley. *Proc. 26th Congr. Eur. Brew. Conv. Maastricht 1997* (painossa).
- Marcellino, L. H., Neshich, G., Grossi de Sá, M. F., Krebbers, E. & Gander, E. S. 1996: Modified 2S albumins with improved tryptophan content are correctly expressed in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters* 385:154-158.
- Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J. & Goldberg, R. B. 1990: Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.
- Mariani, C., Gossele, V., De Beuckeleer, M., De Block, M., Goldberg, R. B., De Greef, W. & Leemans, J. 1992: A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357:384-387.
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D. & Tanksley, S. D. 1993: Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436.
- Martineau, B., Summerfelt, K. R., Adams, D. F. & DeVerna, J. W. 1995: Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. *Bio/Technology* 13:250-254.
- Mason, H. S., Lam, D. M.-K. & Arntzen, C. J. 1992: Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11745-11749.
- Masuta, C., Tanaka, H., Uehara, K., Kuwata, S., Koiwai, A. & Noma, M. 1995: Broad resistance to plant viruses in transgenic plants conferred by antisense inhibition of a host gene essential in S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6117-6121.
- Matzke, M. A. & Matzke, A. J. M. 1995: Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? *TIG* 11:1-3.
- Matzke, M. A., Primig, M., Trnovsky, J. & Matzke, A. J. M. 1989: Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* 8:643-649.

- McBride, K. E., Svab, Z., Schaaf, D. J., Hogan, P. S., Stalker, D. M. & Maliga, P. 1995: Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology* 13:362-365.
- McCabe, D. E., Swain, W. E., Martinell, B. J. & Christou, P. 1988: Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- McGaughey, W. H. & Whalon, M. E. 1992: Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258:1451-1455.
- McKersie, B. D., Bowley, S. R., Harjanto, E. & Leprince, O. 1996: Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 111:1177-1181.
- Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G. & Saedler, H. 1987: A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330:677-678.
- Meyer, P., Linn, F., Heidmann, I., Meyer z.A., H., Niedenhof, I. & Saedler, H. 1992: Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 231:345-352.
- Michaud, D. 1997: Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *TIBTECH* 15:4-6.
- Mikkelsen, T. R., Andersen, B. & Jørgensen, R. B. 1996: The risk of crop transgene spread. *Nature* 380:31.
- Mitra, A., Higgins, D. W., Langenberg, W. G., Nie, H., Sengupta, D. N. & Silverman, R. H. 1996: A mammalian 2-5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6780-6785.
- Mlynárová, L., Keizer, L. C. P., Stiekema, W. J. & Nap, J.-P. 1996: Approaching the lower limits of transgene variability. *The Plant Cell* 8:1589-1599.
- Monsanto 1997: Bollgard® Cotton Update [online]. Monsanto in the News, maaliskuu 1997 [viitattu 10.10.1997]. Saatavilla [www.muodossa.com/MonPub/InTheNews/Articles/97-03-20BollgardUpdate.html](http://www.muodossa.com/MonPub/InTheNews/Articles/97-03-20BollgardUpdate.html).
- Morra, M. J. 1994: Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. *Mol. Ecol.* 3:53-55.
- Morris, W. F., Kareiva, P. M. & Raymer, P. L. 1994: Do barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops? *Ecological Applications* 4:157-165.
- Mukula, J. & Salonen, J. 1990: Rikkakasvien kemiallinen torjunta. Herbisidit ja niiden käyttö. Kasvinsuojeluseuran julkaisuja N:o 81. Vammalan kirjapaino OY, Vammala. 79 s.
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. & Willmitzer, L. 1992: Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11:1229-1238.
- Narváez-Vásquez, J., Franceschi, V. R. & Ryan, C. A. 1993: Proteinase-inhibitor synthesis in tomato plants: Evidence for extracellular deposition in roots through the secretory pathway. *Planta* 189:257-266.
- Nawrath, C., Poirier, Y. & Somerville, C. 1994: Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12760-12764.
- Neuhaus, G. & Spangenberg, G. 1990: Plant transformation by microinjection techniques. *Physiol. Plant.* 79:213-217.
- Neuhaus, G., Spangenberg, G., Scheid, O. M. & Schweiger, H.-G. 1987: Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor. Appl. Genet.* 75:30-36.
- Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomas, L. A. & Bush, R. K. 1996: Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N. Engl. J. Med.* 334:688-692.
- Oakes, J. V., Shewmaker, C. K. & Stalker, D. M. 1991: Production of cyclodextrins, a novel carbohydrate, in the tubers of transgenic potato plants. *Bio/Technology* 9:982-986.
- Oeller, P. W., Min-Wong, L., Taylor, L. P., Pike, D. A. & Theologis, A. 1991: Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437-439.
- Oliver, M. J., Ferguson, D. L. & Burke, J. J. 1995: Interspecific gene transfer: Implications for broadening temperature characteristics of plant metabolic processes. *Plant Physiol.* 107:429-434.



- Osbourn, J. K., Sarkar, S. & Wilson, T. M. A. 1990: Complementation of coat protein-defective TMV mutants in transgenic tobacco plants expressing TMV coat protein. *Virology* 179: 921-925.
- Ott, K.-H., Kwagh, J.-G., Stockton, G. W., Sidorov, V. & Kakefuda, G. 1996: Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase. *J. Mol. Biol.* 263:359-368.
- Ow, D. W., Wood, K. V., DeLuca, M., de Wet, J. R., Helinski, D. R. & Howell, S. H. 1986: Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234:856-859.
- Palukaitis, P. & Roossinck, M. J. 1996: Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology* 14:1264-1268.
- Pellegrineschi, A., Damon, J.-P., Valtorta, N., Paillard, N. & Tepfer, D. 1994: Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Bio/Technology* 12:64-68.
- Pen, J., Molendijk, L., Quax, W. J., Sijmons, P. C., van Ooyen, A. J. J., van den Elzen, P. J. M., Rietveld, K. & Hoekema, A. 1992: Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. *Bio/Technology* 10:292-296.
- Pen, J., Verwoerd, T. C., van Paridon, P. A., Beudeker, R. F., van den Elzen, P. J. M., Geerse, K., van der Klis, J. D., Versteegh, H. A. J., van Ooyen, A. J. J. & Hoekema, A. 1993: Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology* 11:811-814.
- Peñarrubia, L., Kim, R., Giovannoni, J., Kim, S.-H. & Fischer, R. L. 1992: Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Bio/Technology* 10:561-564.
- Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T. & Fischhoff, D. A. 1990: Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8:939-943.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. & Teuber, M. 1997: Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389:801-802.
- Pilon-Smits, E. A. H., Ebskamp, M. J. M., Paul, M. J., Jeuken, M. J. W., Weisbeek, P. J. & Smeekens, S. C. M. 1995: Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107:125-130.
- Poirier, Y., Dennis, D. E., Klomparens, K. & Somerville, C. 1992: Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* 256:520-523.
- Potrykus, I. 1990: Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8:535-542.
- Prasher, D. C. 1995: Using GFP to see the light. *TIG* 11:320-323.
- Prins, T. W. & Zadoks, J. C. 1994: Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a literature review. *Euphytica* 76: 133-138.
- Reddy, A. S. & Thomas, T. L. 1996: Expression of a cyanobacterial  $\Delta^6$ -desaturase gene results in  $\gamma$ -linolenic acid production in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 14:639-642.
- Rejmánek, M. & Richardson, D. M. 1996: What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* 77:1655-1661.
- Robinson, N. J., Tommey, A. M., Kuske, C. & Jackson, P. J. 1993: Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295:1-10.
- Robson, P. R. H., McCormac, A. C., Irvine, A. S. & Smith, H. 1996: Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. *Nature Biotechnology* 14:995-998.
- Rogers, H. J. & Parkes, H. C. 1995: Transgenic plants and the environment. *J. Exp. Bot.* 46:467-488.
- Rugh, C. L., Wilde, H. D., Stack, N. M., Thompson, D. M., Summers, A. O. & Meagher, R. B. 1996: Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3182-3187.
- Russell, S. H., Hoopes, J. L. & Odell, J. T. 1992: Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol. Gen. Genet.* 234:49-59.
- Saalbach, I., Pickardt, T., Waddell, D. R., Hillmer, S., Schieder, O. & Müntz, K. (1995): The sulphur-rich Brazil nut 2S albumin is specifically formed in transgenic seeds of the grain legume *Vicia narbonensis*. *Euphytica* 85: 181 - 192.
- Santa Cruz, S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A. M. & Oparka, K. J. 1996: Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6286-6290.

- Schlüter, K., Fütterer, J. & Potrykus, I. 1995: "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysantemi*) occurs - if at all - at an extremely low frequency. *Bio/Technology* 13:1094-1098.
- Schmitt, J. & Linder, C. R. 1994: Will escaped transgenes lead to ecological release? *Mol. Ecol.* 3:71-74.
- Schmülling, T., Röhrig, H., Pilz, S., Walden, R. & Schell, J. 1993: Restoration of fertility by antisense RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 237:385-394.
- Schroeder, H. E., Gollasch, S., Moore, A., Tabe, L. M., Craig, S., Hardie, D. C., Chrispeels, M. J., Spencer, D. & Higgins, T. J. V. 1995: Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 107:1233-1239.
- Sen Gupta, A., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burke, J. J. & Allen, R. D. 1993: Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1629-1633.
- Shah, D. P., Horsch, R. B., Klee, H. J., Kishore, G. M., Winter, J. A., Tumer, N. E., Hironaka, C. M., Sanders, P. R., Gasser, C. S., Aykent, S., Siegel, N. R., Rogers, S. G. & Fraley, R. T. 1986: Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233:478-481.
- Shaul, O. & Galili, G. 1992: Threonine overproduction on transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* 100:1157-1163.
- Sheehy, R. E., Kramer, M. & Hiatt, W. R. 1988: Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8805-8809.
- Sindel, B. 1996: Glyphosate Resistance Discovered in Annual Ryegrass. *Resistant Pest Management Newsletter* [online] vol. 8 , nro 2 [viitattu 27.8.1997]. Saatavilla [www-muodossa: <URL: http://www.msstate.edu/Entomology/v8n2/news.html#ryegrass>](http://www.msstate.edu/Entomology/v8n2/news.html#ryegrass)
- Smith, H. A., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A. & Dougherty, W. G. 1994: Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *The Plant Cell* 6:1441-1453.
- Smith, M. W., Feng, D.-F. & Doolittle, R. F. 1992: Evolution by aquisition: the case for horizontal gene transfers. *TIBS* 17:489-493.
- Somers, D. A., Rines, H. W., Gu, W., Kaeppler, H. F. & Bushnell, W. R. 1992: Fertile, transgenic oat plants. *Bio/Technology* 10:1589-1594.
- Stalker, D. M., McBride, K. E. & Malyj, L. D. 1988: Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242:419-423.
- Stark, D. M., Timmermann, K. P., Barry, G. F., Preiss, J. & Kishore, G. M. 1992: Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science* 258:287-292.
- Stewart Jr., C. N. 1996: Monitoring transgenic plants using in vivo markers. *Nature Biotechnology* 14:682.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C. & Botterman, J. 1995: Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Bio/Technology* 13:1085-1089.
- Strizhov, N., Keller, M., Mathur, J., Koncz-Kálmán, Z., Bosch, D., Prudovsky, E., Schell, J., Sneh, B., Koncz, C. & Zilberstein, A. 1996: A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15012-15017.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. & Maliga, P. 1990: Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530.
- Syvanen, M. 1994: Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annu. Rev. Genet.* 28:237-261.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Luo, K. & Adang, M. J. 1994: Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4120-4124.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y.-B., Finson, N., Masson, L. & Heckel, D. G. 1997: One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1640-1644.
- Tarczynski, M. C., Jensen, R. G. & Bohnert, H. J. 1993: Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259:508-510.

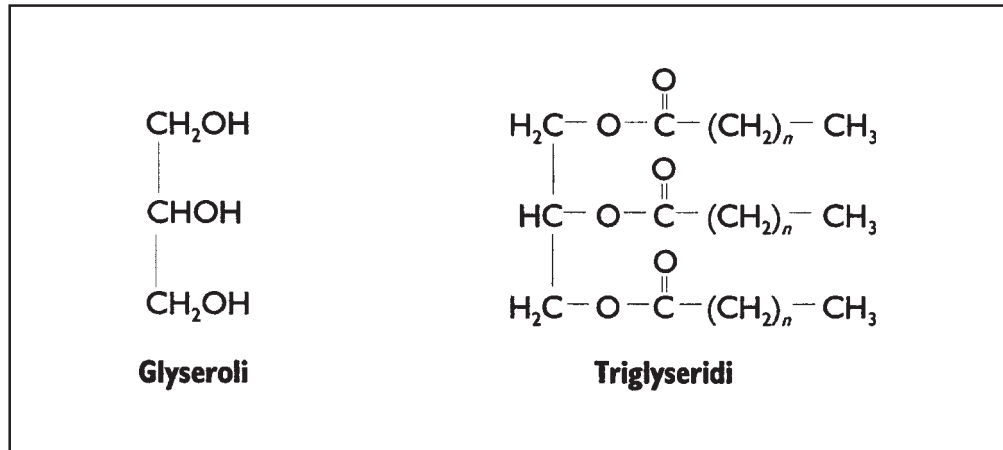
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. & Galeffi, P. 1993: Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366:469-472.
- Teeri, T. H., Lehväsliho, H., Franck, M., Uotila, J., Heino, P., Palva, E. T., Van Montagu, M. & Herrera-Estrella, L. 1989: Gene fusions to *lacZ* reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J.* 8:343-350.
- Tepfer, M. 1993: Viral genes and transgenic plants. *Bio/Technology* 11:1125-1130.
- Terada, R. & Shimamoto, K. 1990: Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220:389-392.
- Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. & Broekaert, W. F. 1995: Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell* 7:573-588.
- Thorsness, M. K., Kandasamy, M. K., Nasrallah, M. E. & Nasrallah, J. B. 1991: A *Brassica* S-locus gene promoter targets toxic gene expression and cell death to the pistil and pollen of transgenic *Nicotiana*. *Devel. Biol.* 143:173-184.
- Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y. L., Hodson, R. E., Lenski, R. E., Mack, R. N. & Regal, P. J. 1989: The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70:298-315.
- Timmons, A. M., Charters, Y. M., Crawford, J. W., Burn, D., Scott, S. E., Dubbels, S. J., Wilson, N. J., Robertson, A., O'Brien, E. T., Squire, G. R. & Wilkinson, M. J. 1996: Risks from transgenic crops. *Nature* 380:487.
- Tomlin, A. D. 1994: Transgenic plant release: comments on the comparative effects of agriculture and forestry practices on soil fauna. *Mol. Ecol.* 3:51-52.
- Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H. & Hinata, K. 1988: Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology* 6:1072-1074.
- Trevors, J. T., Kuikman, P. & Watson, B. 1994: Transgenic plants and biogeochemical cycles. *Mol. Ecol.* 3:57-64.
- Truve, E., Aaspõllu, A., Honkanen, J., Puska, R., Mehto, M., Hassi, A., Teeri, T. H., Kelve, M., Seppänen, P. & Saarma, M. 1993: Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. *Bio/Technology* 11:1048-1052.
- Turpen, T. H., Reinl, S. J., Charoenvit, Y., Hoffman, S. L., Fallarme, V. & Grill, L. K. 1995: Malarial epitopes on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 13:53-57.
- Töpfer, R., Gronenborn, B., Schell, J. & Steinbiss, H.-H. 1989: Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. *The Plant Cell* 1:133-139.
- Uchimiya, H., Iwata, M., Nojiri, C., Samarajeewa, P. K., Takamatsu, S., Ooba, S., Anzai, H., Christensen, A. H., Quail, P. H. & Toki, S. 1993: Bialaphos treatment of transgenic rice plants expressing a *bar* gene prevents infection by the sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani*). *Bio/Technology* 11:835-836.
- Ueda, T., Anai, T., Tsukaya, H., Hirata, A. & Uchimiya, H. 1996: Characterization and subcellular localization of a small GTP-binding protein (*Ara-4*) from *Arabidopsis*: conditional expression under control of the promoter of the gene for heat-shock protein HSP81-1. *Mol. Gen. Genet.* 250:533-539.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K. & Swain, W. 1987: Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology* 5:263-266.
- USDA—APHIS 1997: Graphs: Field Releases/Deregulation of Transgenic Plants [viitattu 10.7.1997]. Saatavilla [www.muodossa.com](http://www.muodossa.com): <URL:<http://www.aphis.usda.gov:80/bbep/bp/graphs.html>>
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. & Leemans, J. 1987: Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 327:33-37.
- Valkonen, J., Bremer, K. & Tapio, E. 1996: Kasvi sairastaa - oppi kasvitaudeista. Yliopistopaino, Helsinki. 179 s.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Reupold-Popp, P., Sandermann Jr, H. & Langebartels, C. 1994: Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Technology* 12:165-168.

- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. & Rocha-Sosa, M. 1990: Construction of an intron-containing marker-gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250.
- Van der Meer, I. M., Stam, M. E., van Tunen, A. J., Mol, J. N. M. & Stuitje, A. R. 1992: Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *The Plant Cell* 4:253-262.
- Van der Salm, T., Bosch, D., Honée, G., Feng, L., Munsterman, E., Bakker, P., Stiekema, W. J. & Visser, B. 1994: Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* and *cryIC* genes: a resistance management strategy. *Plant Mol. Biol.* 26:51-59.
- Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D. & Van Mellaert, H. 1990: Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247:72-74.
- Van Rooijen, G. J. H. & Moloney, M. M. 1995: Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Bio/Technology* 13:72-77.
- Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E. & Vasil, I. K. 1992: Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10:667-674.
- Visser, R. G. F., Somhorst, I., Kuipers, G. J., Ruys, N. J., Feenstra, W. J. & Jacobsen, E. 1991: Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet.* 225:289-296.
- Voelker, T. A., Worrell, A. C., Anderson, L., Bleibaum, J., Fan, C., Hawkins, D. J., Radke, S. E. & Davies, H. M. 1992: Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science* 257:72-74.
- 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 Rep.* 14:69-74.
- Wan, Y. & Lemaux, P. G. 1994: Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 104:37-48.
- Weber, G., Monajembashi, S., Wolfrum, J. & Greulich, K.-O. 1990: Genetic changes induced in higher plant cells by a laser microbeam. *Physiol. Plant.* 79:190-193.
- Weeks, J. T., Anderson, O. D. & Blechl, A. E. 1993: Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 102:1077-1084.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J. & Schulz, A. 1996: The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14:1274-1278.
- Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Clark, D. G., Bleecker, A. B., Chang, C., Meyerowitz, E. M. & Klee, H. J. 1997: A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nature Biotechnology* 15:444-447.
- Williams, S., Friedrich, L., Dincher, S., Carozzi, N., Kessmann, H., Ward, E. & Ryals, J. 1992: Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology* 10:540-543.
- Williamson, M. 1993: Invaders, weeds and the risk from genetically manipulated organisms. *Experientia* 49:219-224.
- Witty, M. 1990: Thaumatin II - a palatability protein. *TIBTECH* 8:113-116.
- Wood, K. V., Lam, Y. A., Seliger, H. H. & McElroy, W. D. 1989: Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. *Science* 244:700-702.
- Worrall, D., Hird, D. L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J. & Scott, R. 1992: Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *The Plant Cell* 4:759-771.
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C. & Shah, D. M. 1995: Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase on transgenic potato plants. *The Plant Cell* 7:1357-1368.
- Yang, X., Yie, Y., Zhu, F., Liu, Y., Kang, L., Wang, X. & Tien, P. 1997: Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4861-4865.

- Yoder, J. I. & Goldsbrough, A. P. 1994: Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/Technology* 12:263-267.
- Yuan, L., Voelker, T. A. & Hawkins, D. J. 1995: Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10639-10643.
- Yun, D.-J., Hashimoto, T. & Yamada, Y. 1992: Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11799-11803.
- Zhang, W., McElroy, D. & Wu, R. 1991: Analysis of rice *Act1* 5' region activity in transgenic rice plants. *The Plant Cell* 3:1155-1165.
- Zhu, Q., Maher, E. A., Masoud, S., Dixon, R. A. & Lamb, C. J. 1994: Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology* 12:807-812.
- Özcan, S., Firek, S. & Draper, J. 1993: Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation. *Bio/Technology* 11:218-221.

## Liite I. Rasvojen rakenne ja tavallisimmat rasvahapot kasveissa

Rasvat ja öljyt ovat hiilihydraattien lisäksi tärkeitä energianlähteitä kasveissa. Ne varastoidaan yleensä triglyserideinä niin sanotuissa sferosomeissa. Triglyseridimolekyylissä erilaisia rasvahappoja on esteröitynyt glyserolirungon hydroksyyli-ryhmiin. Kasvien rasvahapot ovat yleensä suoraketjuisia hydroksyylihappoja, joissa on 12-20 hiiliatomia. Öljyt ovat huoneenlämmössä juoksevia johtuen rasvahapoissa olevista kasoissidoksista (tydyttymättömistä sidoksista). Rasvat ovat puolestaan kiinteitä, sillä ne sisältävät enemmän tydyttyneitä rasvahappoja, siis enemmän yksiloissidoksia.



### Tavallisimpia rasvahappoja kasveissa

#### tydyttyneet rasvahapot

lauriinihappo	(12:0)*	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$
myristiinihappo	(14:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$
palmitiinihappo	(16:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$
steariinihappo	(18:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$

#### tydyttymättömät rasvahapot

oleiinihappo	(18:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
linolihappo	(18:2)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
linoleeni-happo	(18:3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
arakidonihappo	(20:4)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_4(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$

\*lyhennyksen ensimmäinen numero tarkoittaa rasvahapon hiiliatomien lukumäärää ja kaksoispisteen jälkeen tuleva numero rasvahapossa olevien kaksoissidosten lukumäärää

## Liite 2. Tiedjen ym. (1989) esitys geenitekniikalla muunnettujen organismien riskinarvioinniksi.

(Kaavio on otettu suoraan alkuperäisestä julkaisusta. Kursiivilla merkityt osat koskevat vain geenitekniikalla muunnettuja mikro-organismeja. Lopussa tekijöiden huomautuksia Tiedjen esitykseen.)

### YMPÄRISTÖRISKIEN MAHDOLLISUUS:

PIENEMPI << ----- >> SUUREMPI

#### I. GENEETTINEN MUUTOS

* geenin ominaisuudet	tunnetaan täysin <sup>(1)</sup>		tunnetaan huonosti tai ei ollenkaan
* geneettinen stabiilisuus	stabiili <sup>(1)</sup>		epävarma
* muutoksen laatu	alkuperäisen geenin deletio <sup>(2)</sup>	yksi geeni lisätty	useita geenejä lisätty
* ominaisuus	ei ekspressoidu eikä toimi säätelyssä	säätää alkuperäisen geenin toimintaa	uuden geenituotteen synteesi
* geenin lähde	sama laji	läheinen laji	kaukainen laji
(* vektori	<i>ei vektoria</i>	<i>ei siirry itseksään</i>	<i>siirtyy itseksään</i>
* vektorin lähde	<i>sama laji, ei patog.</i>	<i>läheinen laji, ei patog. patogeeninen laji <sup>(3)</sup></i>	<i>kaukainen tai</i>
* vektori-RNA:ta tai -DNA:ta kohdesolussa	<i>ei</i>	<i>on, mutta ei toimi</i>	<i>toimivaa )</i>

#### 2. KOHDEORGANISMI

* domestikaation aste	ei tule toimeen luonnossa	luonnonpopulaatioita esiintyy	luonnonvarainen; leviämiskykyinen
* voidaanko leviämistä kontrolloida	voidaan	ei voida	
* alkuperäinen levinneisyys		paikallinen <sup>(4)</sup>	eksoottinen
(* kasvutapa	<i>vapaana elävä <sup>(5)</sup></i>		<i>patogeeninen, parasitiivinen tai symbioottinen )</i>
* rikkakasvimaisuus	lähisukulaiset eivät rikkakasveja	lähisukulaiset rikkakasveja	itse rikkakasvi
* eloonjäämiskyky ja säilyvyys maassa	lyhytikäinen		pitkäikäinen (esim. siementen dormanssi) <sup>(6)</sup>
* levinneisyys; kasvu-ympäristö	kapea		laaja tai tuntematon
* geenien siirtyminen luonnonpopulaatioissa	ei		usein

**YMPÄRISTÖRISKIEN MAHDOLLISUUS:**

PIENEMPI << ----- >> SUUREMPI

**3. SIIRTOGEEENISEN LAJIN OMINAISUUDET VERRATTUNA ALKUPERÄISEEN LAJIIN**

* <b>kelpoisuus (fitness)</b>	vähentynyt	palautuvasti vähentynyt	kasvanut
* <b>toksisuus (virulenssi, patogeenisuus)</b>	vähentynyt	palautuvasti vähentynyt	kasvanut
(* <b>isäntävalikoima</b>	<i>muuttumaton</i>		<i>laajentunut</i> )
* <b>substraatin tai resurssien käyttö</b>	muuttumaton	muuttunut	laajentunut
* <b>kasvuympäristö</b>	muuttumaton		kasvuympäristö laajentunut tai muuttunut
* <b>taudin- tai herbivorian-kestävyys</b>	vähentynyt	muuttumaton	lisääntynyt
* <b>kontrolloitavuus (antibiootit, herbisidit)</b>	lisääntynyt	muuttumaton	vähentynyt
* <b>geenin ilmentyminen</b>	ympäristöstä riippumaton		riippuu ympäristöstä <sup>(7)</sup>
* <b>samankaltaisuus aikaisempien fenotyyppien kanssa</b>	täysin samanlainen	samanlainen	erilainen

**4. YMPÄRISTÖTEKIJÄT**

* <b>valintapaine (posit.)</b>	ei		on
* <b>lähisukulaisia, joiden kanssa voi risteytyä</b>	ei		on
* <b>pölyttäjät ja siementen levittäjät (hyönteiset, linnut...)</b>	ei tai voidaan kontrolloida		on, ei voida kontrolloida
* <b>onko avainlaji ekosysteemissä</b>	ei		on
* <b>voiko kasvaa monenlaisilla kasvupaikoilla</b>	ei		kyllä
* <b>voidaanko testiolosuhteita simuloida</b>	kyllä		ei
* <b>voidaanko testialue eristää</b>	kyllä		ei
* <b>voidaanko vaikutuksia valvoa</b>	kyllä		ei



*Joitakin tekijöiden kommentteja Tiedjen (1989) esitykseen:*

- (1) jos geeni on vaarallinen, riskiä ei pienennä se, että geenin ominaisuudet tunnetaan tai että tiedetään sen olevan stabiili
- (2) riippuu poistetusta geenistä ja siitä, mitä ominaisuutta se on koodittanut kasvilla (jos geeni on esimerkiksi rajoittanut kasvin lisääntymistä, sen inaktivoiminen voi saada kasvin levittäytymään tehokkaammin)
- (3) riippuu siitä, ovatko patogeenisuusgeenit mukana vektorissa vai eivät
- (4) jos organismi on paikallinen, todennäköisyys että se pystyy levittäytymään ympäristöön tai että sillä on läheisiä sukulaislajeja, on suurempi kuin jos se on tuotu muualta; toisaalta eksoottisten lajien käyttäytymistä uudessa ympäristössä on vaikeampi ennustaa
- (5) vapaana elävät mikro-organismit ovat autonomisia kun taas patogeenien, symbionttien ja parasiittien kasvua rajoittaa isännän levinneisyys; vapaana elävien organismien levittäytyminen ympäristöön olisi siis todennäköisempää
- (6) tässä kohdassa ei mainita mitään leviämistehokkuudesta (siementuotannosta tai pölytysmuodosta)
- (7) joissakin tapauksissa tämä voi toimia myös kontrollikeinona ja pienentää riskiä

## Liite 3. Riskinarvioinnin kriteerejä Gaugitschin ja Torgersenin (1995) mukaan.

---

### Yleiset kysymykset:

- kokeen tarkoitus ja kuvaus
- kuvaus aikaisemmin tehdyistä vastaavista kokeista ja niiden tuloksista

---

### Kasvilajin ja siirrettävän geenin kuvaus:

- kuvaus kasvilajin ominaisuuksista ja ekologiasta
- kuvaus siirrettävän geenin ja vektorin ominaisuuksista
- kuvaus koalueesta
- tietoja aikaisemmin tehdyistä kokeista kyseisellä kasvilajilla/geenillä/vektorilla

---

### Siirtogeenisen kasvin kuvaus:

- siirtogeenisen kasvin odotettavissa olevat ominaisuudet
- siirtyykö genomiin tuntematonta/ylimääräistä DNA:ta?

---

### Koalueen kuvaus:

- ekosysteemin kuvaus
- miten ekosysteemi on aiemmin reagoinut (ei-siirtogeenisiin) samoja ominaisuuksia sisältäviin kasveihin
- lähellä olevien biotooppien kuvaus

---

### Ekologinen riskinarviointi:

- kasvin leviämisbiologia ja siihen liittyvät riskit (rikkakasviominaisuudet, kilpailukyky, leviämiskyky)
- siirrettävän ominaisuuden vaikutukset kasvin rikkakasviominaisuuksiin, leviämiseen tai risteytymiseen lähisukuisten lajien kanssa
- kokemukset ei-siirtogeenisen, ominaisuuksiltaan samanlaisen lajikkeen kanssa
- kokemukset muiden lajien kanssa, joihin on siirretty sama ominaisuus
- kokemukset aikaisemmista t&k-kokeista, joissa siirtogeenistä kasvia on tutkittu erilaisissa ympäristöoloissa
- mitä riskejä on geenin siirtymisestä lajista toiseen

---

### Koejärjestely:

- kokeen ajoitus (kasvin kasvukausi ja kukkiminen)
  - kokeessa esille tulevat uudet ominaisuudet ja niiden mahdolliset vaikutukset ympäristöön
  - valvonta kokeen aikana ja sen jälkeen
-

## Liite 4. Geenitekniikan ja (molekyyli)biologian käsitteitä.

(Sanaston laatimisessa on käytetty apuna kirjaa Tirri, Lehtonen, Lemmetyinen, Pihakaski ja Portin (1993): Biologian sanakirja. Kustannusosakeyhtiö Otava, Keuruu. 607 s.)

---

alleeli	geenin vaihtoehtoinen muoto; yhdestä geenistä voi olla useita alleeleja, joista kaksi sijaitsee vastinkromosomeissa
antigeeni	aine, joka spesifisesti sitoutuu vasta-aineeseen ja saa elimistössä yleensä aikaan vasta-aineen tuoton
antisense-RNA	ribonukleiinihappomolekyylä, joka pariumalla lähetti-RNA:n kanssa estää sen toiminnan proteiinisynteesissä
desaturaasi	entsyymi, joka muuttaa tyydyttyneitä rasvahappoja tyydyttymättömiksi lisäämällä niihin kaksoissidoksia
DNA	deoksiribonukleiinihappo; DNA muodostaa kaikkien solujen ja myös useimpien virusten geneettisen informaation
dormanssi	kasvien silmujen ja siementen lepovaihe, jossa aineenvaihdunta on erittäin hidasta ja kasvu on pysähtynyt
eksoni	proteiinin aminohappojärjestystä koodittava DNA-jakso (vrt. introni)
ekspressio	ilmentyminen; geenin kopioituminen RNA:ksi ja tämän geneettinen translaatio eli luenta edelleen proteiiniksi
embryo	alkio (proembryo=alkion esiaste)
embryogeeninen	alkiosta peräisin oleva
epitoooppi	kohta antigeenissä, johon vasta-aine sitoutuu
eukaryootti	aitotumainen; eliöitä, joiden soluissa on tuma ja sen sisällä kromosomit; kaikki muut eliöt paitsi bakteerit ja syanobakteerit
herbisidi	rikkakasvihäviö
heterokromatiini	kromosomin geneettisesti inaktiivinen osa (vastakohta eukromatiini)
heterotsygoottinen	eriperintäinen; eliö, jolla on eri alleelit vastinkromosomiensa geenipaikoissa eli lokuksissa (vastakohta homotsygoottinen)
homologinen	yhdenmukainen, yhtäpitävä, vastaava; esim. homologiset kromosomit, joista toinen on peritty emolta ja toinen isältä
homotsygoottinen	samaperintäinen; eliö, jolla on samat alleelit vastinkromosomiensa geenipaikoissa (vastakohta heterotsygoottinen)

hybridi	risteytymisestä syntyvä jälkeläinen; risteymä
indusoituva	jokin tekijä saa aikaan esim. entsyymituotannon alkamisen eli entsyymi-induktion
introni	geenissä oleva jakso, joka ei koodita mitään ja joka poistetaan lähetti-RNA:n valmistuttua (vastakohta eksoni)
<i>in vitro</i>	“koeputkessa”; solujen ja solukoiden kasvattaminen ja tutkiminen irrotettuna normaalista biologisesta yhteydestään (vastakohta <i>in vivo</i> )
itseinkompatibiliteetti	itsepölytyksen estäminen yksikotisissa kasveissa (siitepölyhiukkanen ei voi hedelmöittää munasolua, jossa on samoja itsesiitosta sääteleviä genejä kuin siinä itsessään)
kloonaus	menetelmä, jolla DNA-palasia rikastetaan jonkin vektorin, kuten plasmidin, avulla bakteerisolussa; haluttu geeni rikastetaan viljelemällä sitä kantavaa bakteerikantaa
komplementaarinen	täydentävä
konstitutiivinen	jatkuvatoiminen; entsyymi tai muu proteiini, jota solu tuottaa jatkuvasti tasaisella vauhdilla kaikissa olosuhteissa riippumatta proteiinin tarpeesta
kosuppressio	kasviin siirrettävä toisen lajin geeni saa aikaan sekä siirrettävän geenin että kasvin alkuperäisen vastaavan geenin inaktivaation (ilmentymisen estymisen)
kytkeytyminen, kytkentä	tiettyjen geenien ja niiden säätelemien fenotyyppisten ominaisuuksien periytyminen yhdessä; johtuu siitä, että kyseiset geenit sijaitsevat samassa kromosomissa hyvin lähellä toisiaan
lipofiilinen	rasvahakuinen, -liukoinen
maternaalinen	emikasvista peräisin oleva; äidinpuoleinen
monoklonaalinen vasta-aine	yhdelle antigeenille spesifinen vasta-aine, jonka on tuottanut yhdestä solusta peräisin oleva solukanta eli kloon
pleiotrooppinen	yksi geeni säätelee useiden, toisistaan näennäisesti riippumattomien ominaisuuksien syntyä
prokaryootti	esitumainen; soluton tai yksisolainen eliö, jolla ei ole varsinaista tumaa vaan geneettinen materiaali on paljaana soluliman keskellä; bakteerit ja syanobakteerit
protoplasti	kasvisolu, jonka soluseinä on entsyymaattisesti poistettu
rekombinaatio	geneettisten tekijöiden (geenien) yhdistyminen uudella tavalla, esim. solunjakautumisessa
resistenssi	kestävyys; vastustuskyky
restriktioentsyymi	rajaava endonukleaasi; entsyymi, joka katkaisee DNA:n omasta spesifisestä kohdastaan

RNA	ribonukleiinihappo; lähetti-RNA on komplementaarinen geenin DNA-juosteen kanssa ja kääntyy polypeptidin aminohappojärjestykseksi proteiinisynteesissä; joidenkin virusten (mm. retrovirusten) geneettisenä materiaalina on RNA
rubisco	ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksylaasi-oksigenaasi; fotosynteesin Calvinin kiertoon osallistuva entsyymi
somaattinen	kasvullisia eli vegetatiivisia soluja (muuta kuin sukupuolisoluja tai niiden esiasteita) tarkoittava
somaklonaalinen variaatio	kasvatusolosuhteista johtuva kasvisolujen välinen muuntelu <i>in vitro</i> -kasvatuksissa
transformaatio	geeniinsiirto; eliöiden keinotekoinen muuttaminen geneettisesti toisenlaisiksi siirtämällä niihin vierasta DNA:ta
transkriptio	lähetti-RNA:n entsyymaattinen synteesi DNA-mallin mukaan
translaatio	lähetti-RNA:n nukleotidijärjestyksen "kääntäminen" proteiinin aminohappojärjestykseksi
transposoni	DNA-jakso, joka pystyy siirtymään kromosomistossa paikasta toiseen
tsygootti(nen)	hedelmöitynyt munasolu (hedelmöityneestä munasolusta peräisin oleva)
vektori	kuljettaja, välittäjä; esimerkiksi plasmidi, jonka avulla DNA:ta siirretään solusta toiseen

## Liite 5. Raportissa esiintyvät geenit ja niiden lopputuotteet.

<i>geeni</i>	<i>lähdeorganismi</i>	<i>geenin koodittama lopputuote (käyttötarkoitus)</i>
<i>αal</i>	tarhapapu	α-amylaasi-inhibiittori (hyönteisresistenssi)
<i>Al</i>	maissi	dihydrokersetiini-4-reduktaasi (antosyaniinien synteesi)
<i>Ac/Ds</i>	maissi	transposaasi (aktivaattori)/dissosiaatioelementti (mm. merkkigeenien poisto)
<i>ActI</i>	riisi	aktiini (konstitutiivinen promoottori)
<i>Adhl</i>	maissi	alkoholidehydrogenaasi (konstitutiivinen promoottori)
<i>als</i>	bakteerit, hiiva, kasvit	asetolaktaattisyntaasi (herbisidiresistenssi)
<i>aroA</i>	kasvit, bakteerit	5-enolipyruvaattishikimaatti-3-fosfaattisyntaasi (aromaattisten aminohappojen synteesi; glysofaattiresistenssi)
<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	fosfinotrisiiniasetyyli transferaasi (herbisidiresistenssi)
<i>bxn</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	nitrilaasi (bromoksiniiliresistenssi)
<i>cat</i>	<i>E. coli</i>	kloramfenikoliasetyyli transferaasi (CAT) (reportterigeeni)
<i>cry</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bt-toksiinit (hyönteisresistenssi)
<i>csrl-I</i>	lituruoho	asetolaktaattisyntaasi (sulfonyyliurea- ja imidatsolinoniresistenssi)
<i>gfp</i>	<i>Aequorea victoria</i>	vihreä fluoresoiva proteiini (GFP) (reportterigeeni)
<i>HSP81-I</i>	lituruoho	heat shock protein (indusoituvaa promoottori)
<i>inaZ</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	jääkideaktiivisuus (kylmänkestävyys)
<i>ipt</i>	<i>A. tumefaciens</i>	isopentenyylitransferaasi (sytokiniinien synteesi; selektiomarkkeri)
<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	β-galaktosidaasi (reportterigeeni)
<i>luc</i>	<i>Photinus pyralis</i>	lusiferaasi (reportterigeeni)
<i>luxAB</i>	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> <i>Vibrio harveyi</i> , <i>V. fischeri</i>	lusiferaasi (reportterigeeni)
<i>merA</i>	bakteerit	elohopeaionireduktasi (raskasmetallitoleranssi)
<i>nos</i>	<i>Agrobacterium</i> sp.	nopaliinisyntetaasi (promoottori)
<i>npt II</i>	<i>E. coli</i>	neomysiinitransferaasi (antibioottiresistenssi)
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	fosfinotrisiiniasetyyli transferaasi (herbisidiresistenssi)
<i>pin2</i>	peruna	proteiinaasi-inhibiittori II (hyönteisresistenssi)
<i>PR-I</i>	kasvit	pathogenesis-related protein (indusoituvaa promoottori)
<i>psbA</i>	kasvit	D1-proteiini (triatsiiniresistenssi)
<i>rbcS</i>	kasvit	Rubiscon pieni alayksikkö (indusoituvaa promoottori)
<i>tfdA</i>	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	2,4-D-monoksygenaasi (2,4-D-resistenssi)
<i>Ubil</i>	maissi	ubikitiini (konstitutiivinen promoottori)
<i>uidA</i>	<i>E. coli</i>	β-glukuronidaasi (GUS) (reportterigeeni)
<i>vir</i>	<i>Agrobacterium</i> sp.	virulenssitekijät (auttavat T-DNA:n siirtymisessä kasvisoluun)

## Liite 6. Raportissa esiintyvät virukset ja nimien lyhenteet Valkosen (1993) mukaan.

lyhenne	suomenkielinen nimi	englanninkielinen nimi
CaMV	kukkakaalin mosaiikkivirus	<i>cauliflower mosaic caulimovirus</i>
CCMV	pitkävavun kloroosiläikkävirus	<i>cowpea chlorotic mottle bromovirus</i>
CMV	kurkun mosaiikkivirus	<i>cucumber mosaic cucumovirus</i>
PLRV	perunan kierrelehtivirus	<i>potato leafroll luteovirus</i>
PRSV	papaijan rengaslaikkuvirus	<i>papaya ringspot potyvirus</i>
PSTVd	perunan sukkulamukulaviroidi	<i>potato spindle tuber viroid</i>
PVX	perunan X-virus	<i>potato X potexvirus</i>
PVY	perunan Y-virus	<i>potato Y potyvirus</i>
SHMV	itäntianhampun mosaiikkivirus	<i>sunnhemp mosaic tobamovirus</i>
TMV	tupakan mosaiikkivirus	<i>tobacco mosaic tobamovirus</i>
WCIMV	valkoapilan mosaiikkivirus	<i>white clover mosaic potexvirus</i>

# Kuvailulehti

Julkaisija	Pohjois-Savon ympäristökeskus	Julkaisu-aika	tammikuu 1999
Tekijä(t)	Elina Häikiö ja Jaakko Kangasjärvi		
Julkaisun nimi	Biotekniikan riskit: Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutukset Suomessa		
Julkaisun osat/ muut saman projektin tuottamat julkaisut			
Tiivistelmä	<p>Geenitekniikalla muunnetut kasvit ja niistä valmistettavat tuotteet ovat tulleet kaupalliseen käyttöön USA:ssa ja Euroopassa, ja tällaiset kasvit tulevat olemaan ensimmäisiä Suomessa luonnonympäristössä käytettäviä geenitekniikalla muunnettuja organismeja. Eri siirtogeenisillä kasvilajeilla on vuodesta 1986 lähtien tehty yli 3500 kenttäkoetta, mutta kokemusta siirtogeenisten kasvien pitkäaikaisista ympäristövaikutuksista ei vielä ole.</p> <p>Ympäristövaikutusten arviointi tehdään aina tapauskohtaisesti. Koska siirtogeeninen kasvi poikkeaa alkuperäisestä lajikkeesta siihen siirretyn ominaisuuden osalta, tulee riskinarvioinnissa keskittyä nimenomaan siirretyn ominaisuuden vaikutuksiin ja siihen, miten lajin perusbiologia ja ekologia vaikuttavat riskiin. Ympäristötekijöillä on myös suuri vaikutus ja ne tulee mahdollisuuksien mukaan huomioida. Ympäristöriskien lisäksi tulisi ottaa huomioon myös mahdolliset positiiviset ympäristövaikutukset, jolloin haittojen ja hyötyjen keskinäinen arviointi on mahdollista.</p> <p>Lajin lisääntymis- ja leviämisen biologian avulla voidaan arvioida todennäköisyyksiä siirtogeenisen lajikkeen leviämiseksi ympäristöön tai risteytymiseksi lähisukuisten lajien kanssa. Jos kasviin siirretty ominaisuus antaa sille valintaedun, se voi levittäytyä tehokkaammin ja runsastua ympäristössä muiden lajien kustannuksella. Suurin osa suomalaisista viljelykasveista on peräisin muualta, jolloin ne eivät pysty muodostamaan luonnonpopulaatioita eikä niillä myöskään ole risteytyviä sukulaisia Suomessa. Taloudellisesti tärkeimpiä lajeja Suomessa ovat kuitenkin metsäpuut. Niiden kohdalla vaaran todennäköisyys on suurempi, sillä ne ovat paikallisia lajeja ja avainlajeja ekosysteemissä, ja niiden leviäminen uusille kasvupaikoille parantuneen kilpailukyvyn ansiosta voisi muuttaa ekosysteemien rakennetta huomattavasti. Siirtogeenisten lajien kohdalla kyseessä ovat lisäksi yleensä yhdestä tai muutamasta yksilöstä alkunsa saaneet klooniviljelmät, jolloin kunkin lajin riittävästä geneettisen monimuotoisuuden säilyttämisestä on huolehdittava.</p> <p>Koska kokemusta siirtogeenisten kasvien laajamittaisesta viljelystä ei vielä ole, niiden vaikutuksia ympäristöön, ja etenkin luonnonympäristöön, on vaikea ennustaa. Ympäristövaikutukset voivat tulla näkyviin vasta pitkien aikojen kuluttua. Ympäristöriskien minimoimiseksi täytyy tarkoin harkita mitä ominaisuuksia sellaiseen lajiin siirretään, jolla geenien leviämistä ei voida estää.</p>		
Asiasanat	Geenitekniikka, siirtogeeniset kasvit, ympäristövaikutukset, riskit, Suomi		
Julkaisusarjan nimi ja numero	Suomen ympäristö 185		
Julkaisun teema	Ympäristönsuojelu		
Projektihankkeen nimi ja projektinumero			
Rahoittaja/ toimeksiantaja	Ympäristöministeriö, Pohjois-Savon ympäristökeskus		
Projektiryhmään kuuluvat organisaatiot	Pohjois-Savon ympäristökeskus, Ympäristöministeriö, Metsäntutkimuslaitos, Maatalouden tutkimuskeskus, Suomen ympäristökeskus		
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0243-8	
	Sivuja 119	Kieli Suomi	
	Luottamuksellisuus Julkinen	Hinta 77 mk	
Julkaisun myynti/ jakaja	Pohjois-Savon ympäristökeskus kirjasto, puh. (017) 164 647 faksi (017) 262 5464	Oy Edita Ab julkaisumyynti, puh. (09) 566 0266 faksi (09) 566 0380	
Julkaisun kustantaja	Pohjois-Savon ympäristökeskus, Suomen ympäristökeskus		
Painopaikka ja -aika	Kuopio 1999		



# Documentation page

Publisher	North Savo Regional Environment Centre	Date January 1999
Author(s)	Elina Häikiö and Jaakko Kangasjärvi	
Title of publication	The risks of biotechnology: The environmental effects of genetically modified plants in Finland	
Parts of publication/ other project publications		
Abstract	<p>Genetically modified plants have already been commercialized in the USA and in Europe. Transgenic plants are likely to be the first genetically modified organisms to be released in Finland, too. More than 3500 field trials have been conducted all around the world since 1986, but still there is no experience on the long-term environmental effects of transgenic plants.</p> <p>Risk assessment is always performed on a case-by-case basis. Genetically modified plants should be evaluated according to the engineered trait and its influence on the recipient plants. The interactions of a transgenic plant with its environment must be taken into account, as must different biotic and abiotic factors, whenever possible. The positive environmental effects should be weighed against the negative effects so that a risk-benefit analysis can be made.</p> <p>On the basis of the reproductive characteristics of the recipient plants one can estimate the likelihood that the plants invade natural ecosystems, or that gene transfer to sexually competitive relative species will occur. If the added genes give the plants selective advantage, the plants could become more invasive and outcompete other species in natural ecosystems. Very few crop plants in Finland are native to the country. They are unable to establish themselves in the wild and they do not have related species in the wild. On the other hand, our most economically important plants are forest trees, which are native to the country, and highly competitive and which furthermore constitute keystone species within their ecosystems. The probability of environmental risks occurring is high if added genes were to further improve the competitive ability of forest trees. The genetic diversity of a species must also be cared for and maintained, since transgenic plant populations are usually the result of gene transfer to a single cell or a few cells.</p> <p>Because transgenic plants have not yet been cultivated in a large scale, their effects on the environment are not known and are not easy to foresee. It could be a long time before adverse effects become noticeable. If the spread of genes from a species to natural populations or related species cannot be prevented, one must carefully consider which genes, if any, can be safely transferred to this species.</p>	
Keywords	gene technology, genetic engineering, genetically modified plants, environmental effects, risks, Finland	
Publication series and number	The Finnish Environment 185	
Theme of publication	Environmental protection	
Project name and number, if any		
Financier/ commissioner	Ministry of the Environment, North Savo Regional Environment Centre	
Project organization	North Savo Regional Environment Centre, Ministry of the Environment, Finnish Forest Research Institute, Agricultural Research Centre of Finland, Finnish Environment Institute	
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0243-8
	No. of pages 119	Language Finnish
	Restrictions Public	Price 77 Fmk
For sale at/ distributor	North Savo Regional Environment Centre tel. +358 17 164 647 telefax +358 17 262 5464	Edita Ltd tel. +358 9 566 022 telefax +358 9 566 0380
Financier of publication	North Savo Regional Environment Centre, Finnish Environment Agency	
Printing place and year	Kuopio 1999	