

Liisa Vihervuori, Hanna-Leena Pasonen ja Päivi Lyytikäinen-Saarenmaa

Siirtogeenisten puiden vuorovaikutukset kasvinsyöjien kanssa

Metsäbiotekniikan tila

Biotekniikan käyttö puulajien jalostuksessa on yksi tämänhetkisistä metsäteollisuuden ja metsäpolitiikan polttavista kysymyksistä. Siirtogeeniset (muuntogeeniset, geenimuunnellut, GM-) puut ovat puita, joiden genomiin on siirretty yleensä muista eliölajeista peräisin olevia DNA-jaksoja.

GM-kasveja on jo parin vuosikymmenen ajan kehitetty maatalouden kannalta merkittävien satokasvien tauti- tai tuholaiskestävyyden parantamiseksi. Metsätaloudessa biotekniikkaan on suhtauduttu varovaisemmin, mutta tästä huolimatta tutkittuja siirtogeenisiä puita on jo kymmeniä. Erityistä mielenkiintoa on kohdistettu menetelmiin, joilla on mahdollista parantaa puuaineksen laatua erityisesti paperiteollisuuden tarpeita ajatellen. Tutkimustyön taustalla on myös halu ymmärtää puiden geenien toimintaa perustutkimuksen kannalta. Euroopassa siirtogeenisiin kasveihin suhtautuminen on varauksellisempaa kuin esimerkiksi Pohjois-Amerikassa. Ensimmäinen kaupallinen siirtogeeninen puu, johon on lisätty (Bt-toksiinia tuottava) hyönteiskestävyysgeeni, on jo tuotettu Kiinassa.

Ensimmäinen siirtogeenisten puiden kenttätutkimus Suomessa

Suomessakin on tehty jo useita laboratoriotutkimuksia siirtogeenisellä puumateriaalilla. Ensimmäinen

kenttätutkimus saatiin päätökseen vuonna 2003 (kuva 1). Tässä tutkimusryhmämme kenttätutkimuksessa selvitettiin erityisesti siirtogeenistä sokerijuurikkaan kitinaasia tuottavien rauduskoivujen (*Betula pendula* Roth) taudinkestävyyttä sekä vuorovaikutuksia muiden organismien kuten kasvinsyöjien, mykorritsasienten ja maaperäeläinten kanssa.

Kitinaasit ovat entsyymejä, jotka kykenevät pilkkomaan kitiiniä, joka on varsinaisten sienien soluseinän keskeinen ainesosa. Kitiini on myös hyönteisten ulkoisen tukirangan pääainesosa. Kitinaaseja onkin tutkittu paljon, kun on pyritty etsimään keinoja kasvien sienitautikestävyuden kohottamiseksi. Samoin tämän ryhmän entsyymejä on tutkittu tavoitteena kohottaa kasvien hyönteiskestävyyttä. Tulokset ovat olleet vaihtelevia eikä kitinaasin suhteen siirtogeenisiä kasveja ole ainakaan vielä kaupallisessa käytössä.

Viikissä tehdyissä kenttätutkimuksissa selvisi, että joidenkin siirtogeenistä kitinaasia tuottavien koivulinjojen kestävyys koivunruoste-sientä vastaan oli kohonnut. Sen sijaan kestävyys toista tutkittua sienitautia, lehtilaikkusientä, vastaan oli alentunut verrattuna ei-siirtogeenisiin kontrollipuihin. Kenttäkoe tarjosi hyvän mahdollisuuden tarkastella myös muita biologisia vuorovaikutuksia mahdollisimman luonnollisessa ympäristössä. Tämä kirjoitus keskittyy sokerijuurikkaan kitinaasia tuottavien koivujen vuorovaikutuksiin kasvinsyöjien kanssa. Lisäksi esittelemme tutkimuksen, jossa selvitettiin männyn pinosylviinisyntaasientsyymiä tuottavan geenin vaikutuksia siirtogeenisten haapojen ja haapoja



Kuva 1. Viikin koekentän siirtogeeniset kitinaasia tuottavat koivut ja kontrollikoivut.

ravintonaan käyttävien nisäkkäiden, metsäjäniksen ja metsäkauriin, ravinnonvalinnalle. Tutkimusten mukaan pinosylyviineillä on vaikutusta paitsi puiden sienitautikestävyyteen myös niiden kestävyyteen nisäkkäiden kasvinsyöntiä vastaan. Tässä artikkelissa esitetyt tutkimukset kuuluvat pääosin Liisa Vihervuoren väitöskirjaan.

Ennakoimattomia vaikutuksia GM-puille ja niiden kanssa vuorovaikutuksessa oleville eliöille

Siirtogeenisen kasvimateriaalin pelätään aiheuttavan erilaisia ympäristö- ja terveysvaikutuksia. Metsäpuiden osalta suurimmat riskit liittyvät muunnellun geeniaineksen leviämiseen ympäröivään luontoon sekä muuntelun aiheuttamiin mahdollisiin haittoihin eliöstölle, jota ei ollut ensisijaisesti tarkoitettu torjua. Siirtogeeni saattaa siten vaikuttaa haitallisesti koko puun kanssa vuorovaikutuksessa olevaan eliöstöön. Riskien yhteydessä puhutaan usein siirtogeenin pleiotrooppisista vaikutuksista, jolloin yksi geeni voi vaikuttaa useampaan kuin yhteen fenotyyppin ominaisuuteen sekä muista ennalta arvaamattomista vaikutuksista. Geenimuuntelulla pyritään muokkaamaan yhtä ominaisuutta, esimerkiksi parantamaan

kasvin kestävyyttä sienitautia tai tuohyönteistä vastaan. Samalla voi kuitenkin aiheutua haittaa hyödyllisille eliöille kuten mykorrhizasienille sekä kasvinsyöjille ja näiden luontaisille vihollisille.

Ennakoimattomia vaikutuksia on tutkittu viime vuosina mm. Ruotsissa siirtogeenisillä haavoilla. Tutkimuksissa on selvinnyt, että siirtogeeni voi vaikuttaa kasvin puolustusainetasoon, vaikka vaikutuksen oli ennakoitu kohdistuvan perusaineenvaihduntaan. Tutkimuksissa ilmeni myös, että nämä muutokset vaikuttivat haavan kelpaavuuteen sitä syöväälle kovakuoriaiselle. Sen sijaan puiden kelpaavuus myyrille ei muuttunut. Ennakoimattomista ympäristövaikutuksista on saatu esimakua Kiinan kenttäkokeissa, missä siirtogeenit ovat vaikuttaneet mustapoppelin hyönteislajistoon haitallisesti.

Siirtogeenisten metsäpuiden aiheuttamia vaikutuksia monimutkaisessa metsäekosysteemissä kasvaviin pitkäikäisiin puihin ja niitä ravintonaan käyttäviin eläimiin on vaikea ennakoida. Siksi jo lainsäädäntö edellyttää tarkkaan eritellyn riskinarvioinnin tekemistä siirtogeenisen kasvimateriaalin tutkimuksessa ja käytössä. Kaikissa tutkimusvaiheissa onkin huolehdittava siitä, ettei siirtogeenistä ainesta pääse ympäristöön. Ennakoimattomia vaikutuksia tutkitaan monin tavoin laboratorio- sekä kenttäkokeissa. Selvitettäessä vaikutuksia hyönteisiin käytetään usein

syöttökokeita, joilla tutkitaan siirtogeenisyyden vaikutusta esimerkiksi hyönteisten ravinnonkäyttöön ja kasvuun. Uutta ja monipuolista tutkimusta tarvitaan edelleen paljon, sillä jo yhdellä puulajilla on vuorovaikutussuhteita helposti satojen eliölajien kanssa.

Siirtogeeniset puut voivat aiheuttaa ennakoimattomia vaikutuksia puita ravintonaan käyttäville eläimille. Tutkittujen siirtogeenien tuottamat aineet saattavat tahattomasti vaikuttaa puiden kasvi-kasvinsyöjävuorovaikutukseen kuten kasvinsyöjäkestävyyteen tai muuhun kasvin ominaisuuteen, joka epäsuorasti vaikuttaa kasvinsyöjän menestymiseen. Esimerkiksi kitinaasit voivat vaikuttaa puiden kestävyteen sekä sieniä että hyönteisiä vastaan. Kitinaasit hajottavat kitiniä, joka on paitsi sienten soluseinän myös hyönteisten ulkoisen tukirangan keskeinen rakenneosana. Pinosylviini taas on puun puolustusaine mm. sieniä ja nisäkkäitä vastaan. Yksi tutkimuksemme keskeinen tavoite olikin saada uutta tietoa tahattomista vuorovaikutuksista GM-puiden ja kasvinsyöjien välillä.

Tutkimuksemme tavoitteena olivat tarkemmin siirtogeenisten puiden:

- 1) kasvu- ja laatuksymykset (pituuskasvu, silmujen puhkeaminen, koivun ruskotäpläkärpäsen esiintyminen) ja stressioireet (puiden kasvu, lehtien väri ja symmetria),
- 2) vuorovaikutus hyönteis- ja nisäkkäskasvinsyöjien (ja niiden luontaisten vihollisten) kanssa kenttäoloissa ja syöttökokeissa, ja
- 3) tahattomat vaikutukset puiden kasvullisiin ja laadullisiin ominaisuuksiin, vaikutukset kanssaeläviin eliöihin.

Tutkimuksia kenttäkokeella ja laboratoriossa

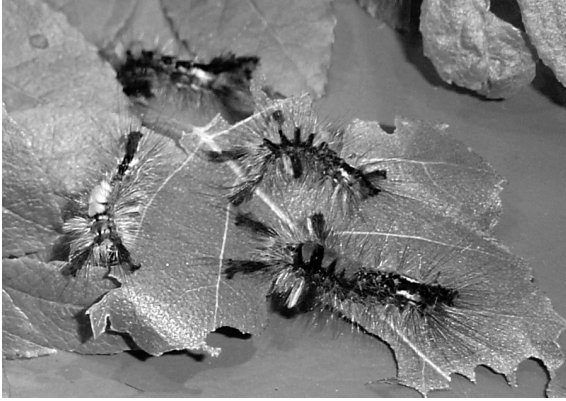
Tutkimuksessamme tarkasteltiin siirtogeenisten puiden: rauduskoivun, haavan ja hybridihaavan vuorovaikutusta kasvinsyöjien kanssa. Koivuun oli siirretty sokerijuurikkaan kitinaasi IV -entsyymiä ja haapoihin männyn pinosylviinisyntaasia tuottava geeni. Siirtogeenit oli siirretty puihin jo aiemmin toisen projektin osana sienitautikestävyuden tutkimiseksi. Kumpikin geeni oli siirretty koivuun agrobakteerimenetelmällä ja kummankin promoottorina oli kukkakaalin mosaiikkiviruksen geeni (CaMV).

Kitinaasilinjat jaettiin ryhmiin siirtogeenin ilmenemistason mukaan. Pääosa tutkimusmateriaalista saatiin kenttäkokeelta, joka kasvoi Helsingin yliopiston Viikin kampuksen koepelloilla. Kokeella kasvoi kolmen kasvukauden ajan siirtogeenisiä koivulinjoja, vastaavaa ei-siirtogeenistä kontrollia sekä muita ei-siirtogeenisiä genotyyppettä. Lisäksi hyönteisten ja nisäkkäiden syöttökokeissa käytettiin kasvihuoneessa kasvaneita haapoja ja koivuja.

Kenttäkokeella tehtiin puiden laatu- ja kasvututkimuksia sekä hyönteisinventointi. Kasvu- ja laatuinventoinnissa mitattiin puiden vuosittainen pituuskasvu, silmujen puhkeamisen ajoitus ja koivun ruskotäpläkärpäsen esiintymistaso siirtogeenistä kitinaasia tuottavissa puissa ja kontrollipuissa. Koivujen lehtien yleisväri määritettiin kasvavista puista stressitason määrittämiseksi. Kenttäkokeen koivuista otettiin lehtinäytteitä, joista määritettiin lehtiala, pituus ja (a)symmetria-indeksi, joka on myös stressi-indikaattori. Lehdistä määritettiin myös hyönteisten syömä sekä lehtilaikkusien kattama ala.

Hyönteisinventoinnissa koepuut tutkittiin alku-, keski- ja loppukesällä kasvinsyönnin ja lajiston ajallisen vaihtelun selvittämiseksi. Koeoksista määritettiin esiintyneet hyönteiset vähintään lahkotasolle. Lehdistä arvioitiin hyönteisten aiheuttamien vaurioiden tyyppi ja taso. Myös runsaina esiintyneiden rauduskoivunkirvojen loisinnan taso selvitettiin. Samalla tarkasteltiin lehtikirvojen luontaisten vihollisten, loispistiäisten esiintymistä siirtogeenisillä ja kontrollipuilla laskemalla näkyvästi loisitut kirvat.

Kasvatus- ja syöttökokeissa käytettiin koe-eläiminä hyönteisiä ja nisäkkäitä. Hyönteissyöttökokeiden tutkimuslajeina olivat generalistiperhoslajit täplätupsukas (*Orgyia antiqua*) (kuva 2) ja härkäpää (*Phalera bucephala*), joille syötettiin vaihtoehtoisesti siirtogeenisten kitinaasikoivujen lehtiä tai kontrollipuiden lehtiä. Koetoukat eivät voineet valikoida ravintoansa. Laboratoriossa tehdyissä syöttökokeissa selvitettiin, vaikuttaako siirtogeenisten koivunlehtien syönti perhostoukkien kasvuun, ravinnonkäyttöön ja kuolleisuuteen kontrollilehtien syöntiin verrattuna. Samalla tutkittiin kenttäkokeella aiemmin keväällä tehdyn lehtien vaurioittamisen vaikutusta oksien kasvuun ja perhostoukkien kasvuun ja ravinnonkäyttöön. Vaurioittamisella jäljiteltiin varhaisempien hyönteislajien lehtien kulutuksen vaikutusta ravinnon laatuun.



Kuva 2. Hyönteissyöttökokeen koe-eläin täplätupsukas.



Kuva 3. Nisäkkäiden syöttökokeen koe-eläin metsäkauris.

Nisäkkäiden ravinnonkäyttötutkimuksessa koe-eläiminä olivat metsäkauris (*Capreolus capreolus*) (kuva 3) ja metsäjänis (*Lepus timidus*). Kafeteria-mallin syöttökokeissa tutkittiin siirtogeenisen koivun ja haavan kelpaavuutta talviravintona kontrollimateriaaliin verrattuna. Kaurisryhmälle annettiin maisteltaviksi siirtogeenisiä koivuntaimia ja vastaavia kontrollitaimia. Taimet olivat koko ajan lauman jokaisen yhdeksän yksilön saatavilla. Samat taimet pidettiin tarjolla aina vuorokausi kerrallaan. Kaurissyöttökokeen koivumateriaalista tutkittiin liukoisten sokereiden taso sekä kulutettu biomassa. Metsäjäniskokeessa jokaiselle neljälle jänisyksilölle tarjottiin siirtogeenisiä koivu- ja haapanippuja ja

vastaavia kontrollinippuja. Jokainen tarjoilu kesti yhden yön. Syöttökokeissa verrattiin siirtogeenisten ja kontrollipuiden kelpaavuutta ja kulutusta.

Siirtogeenisten puiden kasvu ja laatu sekä vuorovaikutus kasvinsyöjien kanssa

Kitinaasia tuottavilla siirtogeenisillä puilla ilmeni kenttäkokeessa pleiotrooppisia vaikutuksia: niiden yleiskunto ja kasvu olivat heikompia kuin kontrollipuiden ja niiden lehtien värityksi indikoi stressiä, vaikka symmetriassa ei esiintynyt muutoksia. Siirtogeenisten puiden rungoissa esiintyi vähemmän koivun ruskotäpläkärpäsen miinajälkiä kuin kontrollipuissa. Heikko pituuskasvu todennäköisesti selitti sen alemmaa esiintymistiheyttä, koska lajin tiedetään suosivan nopeakasvuisia puita. Hyönteisten syömiä lehtiala ei eronnut siirtogeenisten linjojen ja vastaavan kontrollin välillä kahta linjaa lukuun ottamatta, mutta lehtilaikkusien kattama ala oli useilla siirtogeenisillä linjoilla suurempi. Näiden linjojen lehdet olivat myös pienempiä kuin muiden linjojen.

Kenttäkokeessa herbivoripaine erosi siirtogeenisten kitinaasia tuottavien puiden ja kontrollipuiden välillä: Siirtogeenisillä puilla esiintynyt hyönteislajisto oli osassa puulinjoja yksipuolisempaa kuin kontrollilla. Samoin siirtogeenisillä puilla esiintyneet lehtivauriot olivat osassa linjoja yksipuolisempia. Esimerkiksi miinattuja lehtiä esiintyi useassa siirtogeenisessä linjassa vähemmän kuin kontrollissa. Sen sijaan kirvatiheys ja lehtien vauriotaso olivat useassa siirtogeenisessä linjassa korkeampia kuin vastaavassa kontrollissa. Hyönteislajien ja vaurio-tyyppien kirjo kasvoi alkukesästä loppukesään kaikissa siirtogeenisissä linjoissa, niiden kontrollissa ja muissa ei-siirtogeenisissä genotyypeissä. Kirvojen loisinta-asteessa ei kuitenkaan ollut eroa siirtogeenisten puiden ja kontrollin välillä.

Hyönteisten syöttökokeissa siirtogeenistä kitinaasia tuottavaa lehtimateriaalia ravinnokseen saaneet täplätupsukkaat kasvoivat heikommin kuin kontrolliravintoa saaneet, mutta lehtien vaurioituskäsittely ei vaikuttanut toukkien kasvuun. Härkäpäällä kasvu-eroa ei esiintynyt. Kuolleisuus ei kuitenkaan eronnut siirtogeenistä ravintoa saaneiden ja kontrolliravintoa saaneiden välillä. Nisäkkäiden syöttökokeissa siirtogeenisten ja kontrollipuiden välillä ei ollut eroa

kelpaavuudessa metsäjänikselle eikä metsäkauriille. Kitinaasilla ja pinosylviinillä ei ilmennyt vaikutuksia metsäjänisten ravinnonvalintaan. Kauriille tarjottujen siirtogeenisten koivuntainten kelpaavuus ei eronnut kontrollista, eikä puiden liukoisten sokereiden pitoisuudessa ollut juuri eroja yhtä linjaa lukuun ottamatta.

Siirtogeenistä kitinaasia tuottavilla puilla ilmeni ennakoimattomia/tahattomia vaikutuksia itse puiden että kasvinsyöjien näkökulmasta: Puiden kasvu oli alhaisempi, puiden lehtien stressitaso oli suurempi (lehtien väri), puiden kohtaama herbivoripaine oli suurempi (kirvatiheys ja lehtien vauriotaso). Korkeampi kirvatiheys saattoi olla seurausta puiden kohonneesta stressitasosta, koska kirvojen tiedetään suosivan stressaantuneita puita. Syöttökokeissa siirtogeenistä ravintoa saaneiden koepuustoukkien kasvu oli heikompaa kuin kontrollitoukkien, erityisesti korkean kitinaasin ilmenemistason lehtiä saaneilla toukilla. Siirtogeenisten puiden vaikutukset olivat suurempia hyönteisille kuin nisäkkäille. Tuloksia voidaan hyödyntää kehitettäessä riskinarviointimenetelmiä siirtogeenisille metsäpuille.

Tämä kirjoitus käsittelee Suomen ensimmäistä siirtogeenisillä puille tehtyä kenttäkoetta, mutta maailmalla siirtogeenisten puiden kenttätutkimukset ovat jo pitkällä. On odotettavissa, että samantyyppiset entistä laajemmat kenttäkokeet alkavat esimerkiksi Aasiassa ja Amerikassa, missä panostetaan nopeasti kasvaviin kuitupuihin. Vaikka tällaiseen toimintaan sisältyykin riskejä, jotain hyvääkin siitä aiheutuu: panostamalla geenimuuntelun avulla lyhytkiertopuuviljelyyn, voidaan luonnonmetsiä ehkä säästää hakkuilta.

Kirjallisuus

- Hjältén, J., Lindau, A., Wennström, A., Blomberg, P., Witzell, J., Hurry, V. & Ericson, L. 2007. Unintentional changes of defence traits in GM trees can influence plant–herbivore interactions. *Basic and Applied Ecology* 8: 434–443.
- Hoenicka, H. & Fladung, M. 2006. Biosafety in *Populus* spp. and other forest trees: from non-native species to taxa derived from traditional breeding and genetic engineering. *Trees* 20: 131–144.
- Lin, S.Z., Zhang, Z.Y., Zhang, Q. & Lin, Y.Z. 2006. Progress in the study of molecular genetic improvements of poplar in China. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 1001–1007.
- Pasonen, H.-L., Vihervuori, L., Sanna-Kaisa Seppänen, S.-K., Lyytikäinen-Saarenmaa, P., Ylioja, T., Weissenberg, K. von & Pappinen, A. 2008. Field performance of chitinase transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth): growth and adaptive traits. *Trees – Structure and Function* 22: 413–421.
- Vihervuori, L., Pasonen, H.-L. & Lyytikäinen-Saarenmaa, P. 2008. Density and composition of an insect population in a field trial of chitinase transgenic and wild-type silver birch (*Betula pendula*) clones. *Environmental Entomology* 37: 1582–1591.
- MMM Liisa Vihervuori, FT Hanna-Leena Pasonen, MMT Päivi Lyytikäinen-Saarenmaa, Helsingin yliopisto, metsätieteiden laitos
Sähköposti liisa.vihervuori@helsinki.fi

