

# Geneettisesti muunnellut ruokakasvit

Anni Ilona Kortelahti  
Luk-tutkielma  
Biologian tutkinto-ohjelma  
Oulun Yliopisto  
01/2021

## Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	2
1. Johdanto.....	3
2. Erilaiset stressitekijät ruokakasvituotannossa.....	4
2.1. Abioottinen stressi.....	4
2.2. Bioottinen stressi.....	5
3. Genomin muokausmenetelmät.....	6
4. Vehnän genomin muokkaus.....	8
4.1. Toleranssi rikkakasvimyrkyille.....	8
4.2. Vastustuskyky powdery mildew -härmätaudin suhteen.....	11
5. Riisin genomin muokkaus.....	13
5.1. Rice blast -tauti.....	13
6. Tomaatin genomin muokkaus.....	15
6.1. Hedelmien pilaantuvuuden säätely.....	15
7. Tulevaisuuden näkymät ruokakasvien muokkauksessa.....	17
8. Yhteenveto.....	18
9. Lähdeluettelo.....	19

## Tiivistelmä

Genomin muokkausmenetelmät ovat menetelmiä, joiden avulla saadaan tuotettua kohdesekvenssin DNA:n kaksoisjuosteeseen aukko. Aukon muodostamisen jälkeen se korjataan solun normaalien korjausmenetelmien avulla. Menetelmien tarkoituksena on muokata olemassaolevien geenien toimintaa tai liittää kohdegenomiin kokonaan uusia osia. Käytetyimpiin genomin muokkausmenetelmiin kuuluvat muokattuja nukleaaseja hyödyntävät menetelmät. Näitä ovat esimerkiksi sinkkisorminukleaasit, TALEN sekä CRISPR-Cas9. Genomimuokkauksen tavoitteena on tuottaa sellaisia ruokakasveja, jotka ovat villityypin yksilöitä vastustuskykyisempiä eri stressitekijöiden suhteen. Stressitekijät vaikuttavat negatiivisesti kasvin elintoimintoihin sekä sadon muodostukseen. Erilaisia stressitekijöitä ovat abioottiset ja bioottiset stressitekijät, joissa abioottisiin kuuluu kasvuympäristön fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, kuten esimerkiksi maaperän kuivuus ja korkea suolapitoisuus sekä ilmaston kuumuus ja kylmyys. Bioottisia stressitekijöitä ovat erilaiset kasvipatogeenit, kuten virukset, bakteerit ja sienet. Ruokakasvien muuntelun tavoitteena on turvata jatkuvasti kasvavan ihmispopulaation ravinnonsaanti. Muokkauksen avulla on mahdollista parannella myös sadon kokoa ja ominaisuuksia. Esimerkiksi hedelmien pilaantuvuutta voidaan säädellä genomimuokkauksen avulla.

Maailmanlaajuisesti viljellyimpiin ruokakasveihin kuuluvat viljakasvit vehnä (*Triticum aestivum*) ja riisi (*Oryza sativa*) sekä koisokasveihin kuuluva tomaatti (*Solanum lycopersicum*). Kaikkia näitä kasveja on muokattu onnistuneesti genomin muokkausmenetelmien avulla. Esimerkiksi vehnästä ja riisistä on onnistuttu tuottamaan tuhoisille sienitaudeille vastustuskykyisiä yksilöitä. Vehnän kohdalla muokkaus tehtiin TALEN-menetelmällä ja riisille CRISPR-Cas9:n avulla. Tomaatin hedelmien pilaantuvuutta on onnistuttu säätelemään CRISPR-Cas9:n avulla. Vehnästä on saatu muokattua rikkakasvimyrkylle vastustuskykyisiä yksilöitä sinkkisorminukleaasien avulla. Muokattuja yksilöitä vertaillaan villityypin yksilöihin, minkä avulla saadaan selville esimerkiksi muokkauksen vaikutukset kohdekasvin fenotyypissä. Genomin muokkausmenetelmiä, erityisesti CRISPR-Cas9:ää, pyritään kehittämään koko ajan paremmaksi. Kehittämisen tavoitteena on vähentää ennakoimattomien muutoksien syntymistä kohdesekvenssiin.

## 1. Johdanto

Ruoantuotantoon liittyy nykyään monia haasteita, jotka hankaloittavat tehokasta ja laadukasta ruoantuotantoa. Esimerkiksi erilaiset abioottiset ja bioottiset stressitekijät vaikeuttavat sadon tuottoa, kun kasvien normaali kasvu ja kehitys häiriintyy. Myös jatkuvasti kasvava ihmispopulaatio aiheuttaa painetta ruoantuotannolle, koska ruokaa tulisi tuottaa koko ajan enemmän ja tehokkaammin. Ihmispopulaation on arvioitu kasvavan noin 10 miljardiin vuoteen 2050 mennessä. Ruoantuotannon näkökulmasta tämä tarkoittaa sitä, että tuotannon tulisi kasvaa 60-100 % nykyisestä (Jaganathan ym., 2018). Ilmastonmuutos ja muut ympäristöongelmat hankaloittavat tämän tavoitteen saavuttamista. Abioottiset ja bioottiset stressitekijät voimistuvat ja samalla laadukkaan viljelymaan pinta-ala hupenee. Stressitekijöillä on myös toisiaan voimistavia vaikutuksia, kun esimerkiksi kuumuus ensin häiritsee kasvin normaaleja elintoimintoja ja puolustusmekanismeja tehden kasvista alttiimman taudinaiheuttajille (Nejat & Mantri, 2017).

Genomin muokkaustekniikat ovat melko uusia työkaluja eliöiden muuntelussa. Niiden avulla on mahdollista tuottaa ruokakasvilinjoja, jotka ovat vastustuskykyisempiä erilaisten stressitekijöiden suhteen. Myös esimerkiksi hedelmien laatua ja pilaantuvuutta voidaan muunnella niin, että mahdollisimman suuri osuus viljelmistä saadaan hyödynnettyä. Myös ruokakasvien sadon suuruutta sekä ravinteikkuutta on mahdollista parannella. Eniten käytettyjä työkaluja genomin muokkaamisessa ovat muokatut nukleaasit (Site-Specific Nuclease, SSN). Sinkkisorminukleaasit, TALEN sekä CRISPR-Cas9 ovat tällaisia muokattuja nukleaaseja hyödyntäviä menetelmiä. Vanhin näistä menetelmistä on sinkkisorminukleaasimenetelmä ja uusin on CRISPR-Cas9 (Jaganathan ym., 2018).

Kandidaatin tutkielmaani olen valinnut kolme esimerkkikasvia, joihin tehtyjä muokkauksia käsittelen tarkemmin. Nämä kasvit ovat vehnä (*Triticum aestivum*), riisi (*Oryza sativa*) sekä tomaatti (*Solanum lycopersicum*). Jokainen näistä kuuluu viljellyimpien ruokakasvien joukkoon. Tutkielmassani tarkastelen millaisiin ongelmiin ruokakasvien muuntelulla on haettu ratkaisua sekä kuinka tällaista muuntelua tehdään. Tutkielmani loppupuolella käsittelen myös tulevaisuuden näkymiä ruokakasvien muuntelussa.

## 2. Erilaiset stressitekijät ruokakasvituotannossa

Kasvit kohtaavat ympäristössään monia erilaisia stressitekijöitä. Stressitekijät voidaan jakaa kahteen eri ryhmään, abioottisiin sekä bioottisiin. Abioottiset stressitekijät ovat elottoman luonnon fyysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia. Bioottista stressiä aiheuttavat erilaiset elävät organismit sekä virukset. Stressitekijät aikaansaavat kasvissa solu- ja molekyyli-tason vasteita, joiden avulla kasvi pyrkii puolustautumaan ja pysymään hengissä. Nämä reaktiot muodostavat monien eri komponenttien verkoston, johon kuuluvat muun muassa solukalvon reseptoriproteiinit, transkriptiofaktorit, kasvihormonit sekä lukuisat eri geenit. Solukalvon reseptoriproteiinit ottavat vastaan ulkopuolelta tulevan stressiärsyksen ja välittävät tiedon solun sisälle. Transkriptiofaktorit vaikuttavat geenien ilmentymiseen hilliten tai aktivoiden. Ne voivat esimerkiksi kiihdyttää vasteproteiinien muodostumista. Kasvin immuunipuolustukseen liittyviä hormoneja ovat abskissihappo, etyleeni, jasmonihappo sekä salisyylihappo. Hormonit signaloivat keskenään saaden aikaan kasvin selviytymistä parantavia vasteita. Esimerkiksi abskissihappo vaikuttaa huulisolujen aukioloon kuivassa ympäristössä (Nejat & Mantri, 2017).

Stressi heikentää kasvin kasvua, kehitystä sekä sadon tuottoa. Ruoantuotannossa tämä tarkoittaa hitaammin ja pienempää satoa tuottavia viljelykasveja. Ruokakasvien olisi tärkeää olla monipuolisesti vastustukykyisiä erilaisille stressitekijöille, koska niihin kohdistuu usean eri stressitekijän vaikutukset samanaikaisesti. Eri stressitekijöillä voi olla myös toisiaan vahvistavia vaikutuksia. Abioottiselle stressille, erityisesti kuumudelle ja kuivuudelle altistunut kasvi on usein helpompi kohde monille taudinaiheuttajille (Nejat & Mantri, 2017).

### 2.1. Abioottinen stressi

Abioottisen stressin lähteitä ovat ympäristön erilaiset fyysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet. Yleisempiä abioottisen stressin aiheuttajia ovat muun muassa maaperän kuivuus ja korkea suolapitoisuus, kuumuus, tulvat, kylmyys, säteily sekä maaperän raskasmetallit. Myös rikkakasvimyrkyt luokitellaan kuuluvaksi abioottisiin stressitekijöihin. Abioottinen stressi horjuttaa kasvisolujen tasapainotilaa häiritsemällä esimerkiksi aineenvaihdunnan normaalia toimintaa. Kohonnut lämpötila voi esimerkiksi estää entsyymien normaalia toimintaa sekä proteiinien muodostusta. Stressitekijät, kuten säteily voivat aikaansaada DNA:han aukkoja. Korjauksen yhteydessä DNA:han voi syntyä mutaatioita. Stressitekijöiden vaikutukset voivat aiheuttaa kohdekasvissa myös solukuolemaa (Debbarma ym., 2019).

Abioottisiin stressireaktioihin liittyy suuri joukko erilaisia transkriptiofaktoreita. Erityisesti AP2/ERF -tyypin transkriptiofaktorit liittyvät keskeisesti kasvien stressin sietoon. Tutkimuksissa on huomattu, että tällaisten transkriptiofaktoreiden lisääntynyt ilmentyminen usein lisää kasvin vastustuskykyä abioottisen stressin suhteen. Kasvihormonit liittyvät keskeisesti kasvien stressireaktioihin. Hormonit voivat aktivoida kasvien reaktioita, jotka auttavat kasvia selviämään ja pysymään hengissä. (Debbarma ym., 2019).

## 2.2. Bioottinen stressi

Abioottisten stressitekijöiden lisäksi kasvit kohtaavat myös erilaisia bioottisia stressin aiheuttajia. Tällaisia ovat patogeenit, joihin lukeutuu virukset, sienet sekä bakteerit. Näiden lisäksi myös erilaiset sukkulamadot, tuholaishyönteiset, herbivorit sekä rikkakasvit kuuluvat biologisiin stressitekijöihin. Tuholaiten ja patogeenien nopea muuntelu on suuri haaste vastustuskykyisempiä kasveja luodessa. Vastustuskyky tiettyä taudinaiheuttajaa kohtaan ei siis useinkaan ole kovin pitkäaikainen ratkaisu (Zhang ym., 2017).

Taudinaiheuttajat voivat aiheuttaa infektioita eri puolille kohdekasvia. Esimerkiksi sienipatogeenit voivat yhdessä bakteerien kanssa aikaansaada kasvin elintoimintoja häiritsevää kasvustoa. Lehtiin muodostuvat sienikasvustot häiritsevät fotosynteesiä ja näin vaikuttavat myös kasvin muihin elintoimintoihin. Myös johtojänteiden nuutumisen voi olla seurausta taudinaiheuttajasta. Sukkulamadot vaikuttavat kohdekasvin juurien toimintaan. Tästä seuraa samankaltaisia oireita kuin ravinteiden puutoksesta, kuten esimerkiksi kuihtumista sekä kasvun estymistä. Virusten aiheuttamiin oireisiin kuuluu esimerkiksi kloroosi eli viherkato. Tuholaitshyönteiset ja punkit aiheuttavat kasville vahinkoa munimalla ja käyttämällä kasvia ravinnokseen (Gimenez ym., 2018).

Kasveille on kehittynyt immuunipuolustus, jonka avulla kasvi pyrkii minimoimaan bioottisista stressitekijöistä aiheutuvat vahingot. Passiivinen immuunipuolustus tarkoittaa kasvirakenteita, joiden tarkoituksena on estää taudinaiheuttajien pääsy kasvin sisään. Tällaisia rakenteita ovat esimerkiksi kutikula, karvat sekä vahapeite. Kasvit pystyvät tunnistamaan taudinaiheuttajia reseptoriensa avulla. Patogeenien tunnistus aktivoi immuunipuolustusvasteen. Kasveilla immuunipuolustukseen kuuluu myös proteiineja, joiden tehtävänä on tunnistaa patogeeneista peräisin olevia molekyylejä. Immuunipuolustusvasteena voi olla esimerkiksi apoptoosi infektoituneella alueella (Gimenez ym., 2018). Myös bioottisen stressin aiheuttamiin vasteisiin liittyy joukko transkriptiofaktoreita, kohdegeenejä sekä kasvihormoneja.

### 3. Genomin muokkausmenetelmät

Genomien muokkaaminen uusimmilla menetelmillä perustuu muokattujen nukleaaalien hyödyntämiseen. Nämä nukleaaalit (Site-Specific Nuclease, SSN) ovat suunniteltuja tunnistamaan jokin tietty kohta kohde-DNA:n sekvenssistä. Nukleaaali leikkaa kohdesekvenssin kaksoisjuosteeseen aukon (double-strand break, DSB), joka myöhemmin korjataan solun luonnollisin korjausmekanismein. Korjausmekanismeja on kahta eri tyyppiä, NHEJ- sekä HR-menetelmä. Genomin muokkauksessa korjausmekanismien valintaan vaikuttaa se, millaisia muutoksia kohdesekvenssiin halutaan tehdä. NHEJ (non-homologous end joining) tuottaa helposti virheitä sekvenssiin korjauksen yhteydessä. Näitä virheitä ovat insertiot sekä deleetiot eli yhteisnimitykseltään indelit. NHEJ-menetelmää voidaan käyttää esimerkiksi silloin, kun kohdegeeni halutaan tehdä toimimattomaksi indeleiden avulla. HR-menetelmää (homologous recombination) käytetään muun muassa silloin, kun kohdesekvenssiin halutaan liittää uutta DNA-materiaalia. HR-menetelmä perustuu liitettävän fragmentin komplementaarisuuteen kohdesekvenssin kanssa. Menetelmän avulla voidaan esimerkiksi lisätä jokin geeni tai korvata alkuperäinen geeni toisella (Mishra & Zhao, 2018).

Genomin muokkaustekniikoilla tuotetut muutokset ovat helpommin ennakoitavissa kuin esimerkiksi säteilyn avulla tuotetut. Kasvimutaatioiden tuottamiseen on aiemmin käytetty säteilyä, mutta tämän menetelmän ongelmana on sen ennakoimattomuus. Säteilystä tuotetut kaksoisjuosteiden aukot syntyvät sattumanvaraisesti kohdekasvin genomiin, eikä aukkojen korjaus välttämättä onnistu halutulla tavalla. Tällöin seurauksena voi olla muun muassa solukuolemat sekä geneettisen informaation katoaminen (Zhao & Wolt, 2017). Genomin muokkauksessa muutoksia voidaan tehdä kolmella eri tavalla; voidaan muokata vain muutamaa nukleotidiä, korvata alleeli toisella tai liittää uusi geeni osaksi kohdegenomia (Miglani, 2017).

Sinkkisorminukleaaali (ZFN) on sinkkisormen sekä restriktioentsyymin yhdistelmä. Sinkkisormi on transkriptiofaktori ja sen tehtävänä on tunnistaa kohdesekvenssistä haluttu kohta. Yksi sinkkisormi tunnistaa kohdesekvenssistä tavallisimmin kolmen emäsparin mittaisen alueen. DSB:n aikaansaamisesta vastaa restriktioentsyyymi FokI, joka on alunperin bakteeriproteiini. FokI toimii ainoastaan dimeerinä, joten kaksoisjuosteiden aukon muodostamista varten tulee molemmissa DNA-juosteissa olla kiinnittyneenä oma sinkkisorminukleaaalinsa (Carroll, 2014).

Sinkkisorminukleaaalissa on tavallisimmin 3-6 sinkkisormiyksikköä, jotka yhdessä tunnistavat sekvenssistä pidemmän alueen (Mishra & Zhao, 2018). ZFN-menetelmän heikkouksia on se, ettei se ole kohdesekvenssin suhteen kovin tarkka, minkä vuoksi kohdegenomiin voi syntyä helposti

muutoksia alueille, jonne niitä ei ole ollut tarkoitus tuottaa. Näitä kutsutaan off-target -mutaatioiksi. (Zhao & Wolt, 2017).

TALEN-menetelmässä kohdesekvenssin löytämisestä vastaavat TALE-proteiinit ja aukon luomisesta vastaa ZFN:n tavoin FokI-entsyymi. Myös tätä menetelmää käytettäessä tulee molempiin DNA-juosteisiin olla liittyneenä oma nukleaaasinsa. TALE-proteiinit ovat alun perin *Xanthomonas* -bakteerisuvun jäsenistä löydettyjä proteiineja. *Xanthomonas*-bakteerit ovat kasvien patogeeneja, jotka aikaansaavat kohdekasvissa sairauden, kun TALE-proteiinit aktivoivat tiettyjen kohdegeenien transkriptiota. Näiden geenien aktivoiminen aikaansaa kasvissa sairauden. TALE-proteiini rakentuu noin 34:stä aminohaposta, jotka ovat proteiinista riippumatta lähes samat. Kohdan 12 ja 13 aminohapoissa kuitenkin on vaihtelua proteiinien välillä ja nämä aminohapot määrittävät, minkä emäksen TALE-proteiini tunnistaa kohdesekvenssistä. Rinnakkain olevat proteiinit tunnistavat yhdessä pidemmän alueen DNA-sekvenssistä (Mishra & Zhao, 2018). TALEN-menetelmän etuja on se, että kohdesekvenssin tunnistava alue on sinkkisorminukleaaseihin verrattaessa hyvin tarkka. Kohdekasvin genomiin ei tällöin pääse niin helposti syntymään kohdesekvenssin ulkopuolella sijaitsevia muutoksia. Kohdesekvenssin tunnistava proteiiniosa on kuitenkin hidas ja kallis valmistaa, koska se täytyy valmistaa aina erikseen jokaista kohdesekvenssiä varten (Zhao & Wolt, 2017).

CRISPR-Cas9 -menetelmän alkuperä on bakteereista ja arkeista löydetyistä CRISPR-puolustusmekanismeissa, jonka tarkoituksena on suojella organismia viruksien sekä vieraiden plasmidien haitallisilta vaikutuksilta. Menetelmä perustuu Cas9-proteiinin sekä RNA:n yhteistyöhön, jossa kohdesekvenssin kanssa komplementaarinen RNA-molekyylä (guideRNA) johdattaa Cas9-proteiinin kohdesekvenssin luo. Cas9 aikaansaa kohdesekvenssiin kaksoisjuosteeseen aukon. Aukko leikataan PAM-elementin läheisyyteen. Cas9:n sekä gRNA:n ilmentymisen kohdesolussa mahdollistavat kasveille tyypilliset RNA-polymeraasipromootorit. (Jaganathan ym., 2018). CRISPR-Cas9 -tekniikka on kahta edellä mainittua menetelmää uudempi keksintö ja se kuuluu toisen sukupolven genomien muokkaustekniikoihin. Menetelmän etuina ovat sinkkisorminukleaaseihin sekä TALEN-menetelmään verrattaessa tehokkuus, yksinkertaisuus, nopeus sekä alhaisempi hinta. Menetelmä on kuitenkin TALEN:ia alttiimpi tuottamaan kohdesekvenssin ulkopuolisia mutaatioita (Zhao & Wolt, 2017).



## 4. Vehnän genomien muokkaus

Vehnä (*Triticum aestivum*) on yksi maailman tärkeimmistä ja eniten viljellyistä ruokakasveista. Se on genomiltaan alloheksaploidi (AABBDD) ja sen genomiin kuuluu suuri määrä DNA:n toistojaksoja. Toistojaksot muodostavat noin 80-90 % vehnän genomista. Kokonaisuudessaan vehnän genomi on kooltaan 17 000 megaemestä (Y. Wang ym., 2014). Polyploidia on haastava ominaisuus genomimuokkauksen näkökulmasta, mikäli muokkaamisen onnistuminen edellyttää jokaisen geenikopion muokkausta (Ran ym., 2018). Seuraavissa kappaleissa käsitellään vehnän genomien muokkausta sinkkisorminukleaasien, TALEN- sekä CRISPR-Cas9-menetelmän avulla. Muokattavia ominaisuuksia ovat vastustuskyky rikkakasvimyrkyä sekä sienipatogeenin aiheuttaman härmätaudin suhteen.

### 4.1. Toleranssi rikkakasvimyrkyä

Ran ym. (2018) käsittelevät artikkelissaan sinkkisorminukleaasien avulla tuotettua vastustuskykyä imidazolinone-rikkakasvimyrkyä suhteen. Vehnä toimi tässä artikkelissa malliorganismina. Imidazolinonen kaltainen rikkakasvimyrkyjen toiminta perustuu siihen, että ne sitoutuvat AHAS-proteiineihin estäen niiden normaalin toiminnan. AHAS-proteiinit osallistuvat kasvin aminohappotuotantoon, joten niiden toiminnan estyminen johtaa ensiksi kasvin kasvun hidastumiseen ja lopulta sen kuolemaan. Kasvi siis näännyy vajavaisen aminohappotuotannon vuoksi.

Vehnällä on AHAS-geeni kromosomeissaan 6A, 6B ja 6D. Vastustuskyky imidazolinonelle voi syntyä jo pelkästään yhden aminohapon muutoksen seurauksena. Tällöin AHAS-proteiinin sekvenssissä kohdassa 630 seriini korvautuu arginiinilla. Artikkelissa käsiteltiin menetelmää, jossa sinkkisorminukleaasit kohdistettiin jokaiseen kolmeen homologiseen AHAS-geeniin. Sinkkisorminukleaaseilla tuotettu aukko liitettiin takaisin yhteen NHEJ-menetelmällä. Sinkkisorminukleaaseja rakennettiin yhteensä seitsemän, joista kolmen kohdesekvenssi oli S653-kodonin ylävirrassa ja loput neljä alavirrassa. Kaksoisjuosteeseen tehtävän aukon oli suunniteltu olevan yhdeksän emäsparin mittainen ja sijaitsevan S653-kodonin yläpuolella. Sinkkisorminukleaasien toimintaa ja syntyviä mutaatioita tutkittiin ensiksi vehnän protoplastien avulla. Kaikki testatut sinkkisorminukleaasit olivat aktiivisia ja muodostivat kohdesekvenssiin indeleitä.

Kohdesekvenssin muokkaamisessa käytettiin kahta erilaista tekniikkaa. Toinen tekniikoista oli alleelin liittäminen osaksi kasvin genomia ja toinen alkuperäisen alleelin korvaaminen uudella alleelilla. Sinkkisorminukleaasit vietiin vehnän kypsyttömiin zygotteihin alkioihin niitä

koodaavien plasmidien välityksellä. Plasmidien sekä liitettävän DNA-fragmentin siirtäminen soluihin suoritettiin geenipyssyn avulla pommittaen. Alleelin liittämismenetelmässä genomia muokattiin yhden sinkkisorminukleaasin avulla, joka muodosti yhdeksän emäsparin mittaisen aukon alkuperäiseen AHAS-geeniin.

Korvattaessa alkuperäistä alleelia uudella käytössä oli kaksi erillistä sinkkisorminukleaasia. Kumpikin nukleaasi muodosti oman aukkonsa kohdesekvenssiin leikaten alkuperäisen alleelin irti muusta sekvenssistä. Molemmissa tekniikoissa tuotettuihin aukkoihin liitettiin kaksijuosteinen DNA-fragmentti. Tämä liitos tehtiin jokaiseen AHAS-geenin homologiin. Leikkauskohtiin tuotettiin overhangit, jotka olivat suunniteltu myös liitettävän fragmentin päihin. Tällä tavoin haluttiin varmistaa fragmentin oikeanlainen liittyminen osaksi alkuperäistä sekvenssiä.

DNA-siirron onnistumista tutkittiin PCR:n ja sekvensoinnin avulla. Myös DNA-fragmentin liittämisen onnistumista havainnoitiin. Liittyminen voi olla tyypiltään täydellinen tai vajavainen. Vajavaisessa liittymisessä ilmenee indeleitä, kun puolestaan täydellisessä liittymisessä DNA-fragmentti on liittynyt saumattomasti osaksi kohdesekvenssiä. 86 % liitetyistä fragmenteista olivat täydellisesti liittyneitä.

T0-yksilöiden tutkimisessa käytettiin apuna kahta eri strategiaa; suoraa ja epäsuoraa valintaa. Suorassa valinnassa siirrettiin ensiksi 95 emäsparin mittainen luovuttajafragmentti yhdessä sinkkisormen kanssa. Fragmentti sisälsi muun muassa kuusi emäsmuutosta, joiden tarkoituksena oli erottaa siirrettävä alleeli alkuperäisestä alleelistä ja estää sinkkisorminukleaaseja leikkaamasta liitettävää fragmenttia. Fragmentissa oli myös 28 emäsparin mittainen alue, jonka tarkoituksena oli helpottaa liitetyn fragmentin tunnistamista myöhemmässä vaiheessa. Alkuperäisen alleelin korvausvaiheessa 79 emäsparin mittainen luovuttajafragmentti siirrettiin alkioihin kahden erillisen sinkkisorminukleaasin kanssa. Myös tähän fragmenttiin oli tehty emäsmuutoksia. Siirron onnistumista tutkittiin altistamalla alkiot imazamox-rikkakasvimyrkylle. Alleelin lisäysmenetelmällä saatiin tuotettua 12 rikkakasvimyrkylle vastustuskykyistä kasviyksilöä ja korvausmenetelmällä 2.

Epäsuorassa valinnassa alkioihin siirrettiin luovuttajafragmentti, sinkkisorminukleaasi sekä PAT-geeni. PAT-geenin ansiosta valinta voitiin suorittaa phosphinothricin-rikkakasvimyrkyn avulla. Kahdella yksilöllä havaittiin luovuttajafragmentin liittyminen ainakin yhteen lokukseen. Viidellä kasvilla oli muutoksia AHAS-geenin alleeleissa. Luovuttajafragmentin sisältävien yksilöiden huomattiin olevan vastustuskykyisiä imazamox-rikkakasvimyrkylle. Tämä saatiin selville testaamalla yksilöiden kykyä kasvattaa juuret imazamoxia sisältävässä kasvatusliuoksessa.

Suoran valinnan yksilöissä havaittiin erilaisia tuloksia luovuttaja-alleelin lisäyksen suhteen; joukossa oli yksilöitä, jotka olivat monoalleelisiä ja osa bialleelisiä. Joillain yksilöillä oli lisätty alleeli useammassa genomissaan A, B tai D. Eräillä yksilöillä oli bialleelisiä, toisistaan poikkeavia muutoksia saman genomien sisällä. Esimerkiksi alleeli 1 sisälsi liittyneen alleelin ja alleeli 2:ssa oli tapahtunut knockout, eli se sisälsi indeleitä. Epäsuoran valinnan yksilöistä 4/7 sisälsi indeleitä yhdessä alleelissään. Yhdellä yksilöllä oli useammassa genomissaan indeleitä. Kaksi viimeistä sisälsivät lisätyn alleelin. Toisella näistä yksilöistä oli myös indeleitä.

Muutosten periytymistä tutkittiin näistä T0-kasveista. T1-linjan kasvit tuotettiin itsepölytyksen avulla. Ominaisuuksien periytymisen huomattiin noudattavan Mendelin lukusuhteita. T1-kasvien kykyä kasvattaa juuret tutkittiin myös rikkakasvimyrkyn avulla. Yksilöt, joilla oli edes yksi toimiva muokattu AHAS-alleeli, kasvattivat pitkät juuret ja olivat muutenkin fenotyypiltään normaaleja. Yksilöt, joilta muokattu alleeli puuttui, onnistuivat kasvattamaan ainoastaan hyvin lyhyet juuret. Nämä yksilöt kärsivät myös kloroosista, eli ne olivat väritykseltään normaalia haaleampia.

Artikkelissa esiteltiin onnistunut ZFN avulla tuotettu muokkaus allopolyploidin vehnän genomissa. Tuloksena saatiin rikkakasvimyrkylle vastustuskykyisiä yksilöitä. Tuotettujen muutosten huomattiin siirtyvän seuraaville sukupolville Mendelin lukusuhteita noudattaen.

#### 4.2. Vastustuskyky powdery mildew -härmätaudin suhteen

Y. Wang ym. (2014) käsittelevät artikkelissaan työtä, jonka tarkoituksena oli muokata powdery mildew -taudille vastustuskykyinen vehnälaajike. Powdery mildew on tuhoisa härmätauti, jonka saa vehnässä aikaan *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* -sieni (*Bgt*). Se on *B. graminis*:n alatyyppejä, joka on erikoistunut nimenomaan vehnän infektoimiseen. Sienellä on myös useita muita eri viljelykasveihin erikoistuneita alatyyppejä, mikä tekee siitä erityisen vahingollisen viljelykasvien patogeenin. Työssä hyödynnettiin TALE-nukleaaseja sekä myös hieman CRISPR-Cas9 -menetelmää. Tavoitteena oli muokata vehnän kolmea MLO-geeniä, jotka vaikuttavat vehnän vastustuskykyyn taudin suhteen. Nämä kolme geeniä ovat nimeltään TaMLO-A1, TaMLO-B1 sekä TaMLO-D1. Muissa kasveissa tehdyissä tutkimuksissa on huomattu, että MLO-geenien toiminnan estäminen saa kohdekasvissa aikaan resistenssityden. MLO-geenien koodamat proteiinit ovat muun muassa solukalvon proteiineja, jotka mahdollistavat patogeenin pääsyn kasvisolun sisään (Kusch ym., 2016).

TALE-nukleaasit kohdistettiin TaMLO -geenien toiseen eksoniin. TALE-nukleaasit tunnistivat 16 ja 17 emäsparin mittaiset alueet kohdesekvenssistä. Sekvenssiä leikkaavana entsyyminä toimi AvaII. Nukleaasien toiminta varmistettiin ensiksi siirtämällä ne plasmidien välityksellä vehnästä eristettyihin protoplasteihin. Syntyneitä indeleitä havainnoitiin PCR-RE:n avulla.

Työn seuraavassa vaiheessa nukleaaseja siirrettiin vehnän kypsymättömiin siemenaiheisiin geenipyssyllä pommittaen. Pommitus tehtiin kahdelle eri vehnälaajikkeelle, jotka olivat nimeltään Kenong199 sekä Bobwhite. Kenong199:lle käsittely tehtiin viidesti ja Bobwhite:lle kerran. Vektori sisälsi myös *bar* -geenin, jonka avulla oli myöhemmin mahdollista valikoida yksilöt, joihin siirto oli onnistunut. Noin kahden kuukauden kuluttua PTT-rikkakasvimyrkyllä resistentit kallukset valikoitiin T0-kasvien jatkokasvatusta varten.

Mutaatioita havainnoitiin PCR-RE:n avulla. Tätä varten valmistettiin alukkeet, joiden avulla saatiin lisättyä TaMLO-sekvenssejä. Mutaatioita löytyi jokaisesta diploidista genomista. Mutaatioiden tyyppejä olivat homotsygootit sekä heterotsygootit mutaatiot. Suurimmalla osalla yksilöistä oli heterotsygoottinen mutaatio ainoastaan yhdessä TaMLO-geenissään. Muutamalla ilmeni heterotsygootteja mutaatioita kahdessa geenissään ja yhdellä yksilöllä oli heterotsygootti mutaatio yhdessä geenissä ja homotsygootti toisessa. Yhdellä yksilöllä ilmeni heterotsygootti mutaatio jokaisessa geenissään. Suurin osa mutaatioista oli alle 10 emäsparin mittaisia deleetioita, mutta joukossa oli myös pidempiä deleetioita sekä insertioita. Kahdessa yksilössä ilmeni useita erillisiä alle 10 emäsparin mittaisia deleetioita saman kohdesekvenssin sisällä.

Mutaatioiden siirtymistä seuraavalle sukupolvelle tutkittiin T0-kasvien itsepölytyksen avulla. T1-kasvit genotyypattiin MLO-alleeleille spesifien alukkeiden avulla. Homotsygootit mutaatiot siirtyivät aina jälkeläiselle. Heterotsygootit mutaatiot periytyivät Mendelin periytymissäntöjä noudattaen lukusuhteilla 1:2:1. Samoihin tuloksiin päästiin myös tuottamalla T1-kasveista T2-polven jälkeläisiä. Aiemmin mainitut erilliset deletiot samassa kohdesekvenssissä eivät periytyneet Mendelin periytymissäntöä noudattaen. Syyksi arvioitiin, että mutaatiot kohdistuivat somaattisiin soluihin. T1-kasveissa ilmeni myös täysin uusia mutaatioita, mikä kertoi nukleaasien säilyneen aktiivisina T0- tai T1-kasveissa.

Mutaatioiden roolia resistenssiyden synnyssä tutkittiin altistamalla taimet *Bgt*:n itiöille. Tutkittavina yksilöinä oli joukko eri geenien suhteen homotsygootteja mutanteja. Joukossa oli yhden, kahden tai jokaisen geenin suhteen homotsygootteja mutanteja. Tutkimuksissa huomattiin, että ainoastaan mutantti, jolla oli homotsygootti mutaatio jokaisessa TaMLO-lokuksessaan (aabbdd), oli vastustuskykyinen patogeenille. Sen lehdille ei muodostunut näkyvää sienikasvustoa muiden mutanttien tai villityypin yksilöiden tavoin. Näin ollen jokainen kolmesta alkuperäisestä MLO-geenistä mahdollistaa sienien aiheuttaman infektion. Tämä aabbdd-mutantti altistettiin myös kahdelle muulle infektoivalle *Bgt*-tyypille. Mutantti oli vastustuskykyinen myös niiden suhteen. Kolmen TaMLO-geenin samanaikaiset mutaatiot mahdollistavat vehnässä vastustuskyvyn härmätaudin suhteen.

Artikkelissa oli hyödynnetty lyhyesti myös CRISPR-Cas9-menetelmää, jonka tarkoituksena oli tuottaa mutaatioita ainoastaan TaMLO-A1 -geeniin. Menetelmällä onnistuttiin tuottamaan mutaatioita kyseiseen geeniin, mikä osoittaa myös CRISPR-Cas9:n olevan mahdollinen työkalu vehnän genomin muokkauksessa.

## 5. Riisin genomin muokkaus

Riisi (*Oryza sativa*) on vehnän ohella maailman viljellyimpiä viljakasveja. Se muodostaa miljardeille ihmisille tärkeimmän energianlähteen. Riisin sadonmuodostusta ja sen laatua on paranneltu vuosien saatossa perinteisen jalostuksen keinoin. Pienikokoisen genominsa ansiosta riisi soveltuu hyvin genomimuokkauksen kohteeksi. Riisiä onkin käytetty koekasvina monien eri genomin muokkausmenetelmien tutkimisessa. Tutkimuksissa on saatu tietoa myös eri geenien toiminnasta ja siitä kuinka näitä geenejä voitaisiin hyödyntää riisin ja mahdollisesti myös muiden viljelykasvien muokkaamisessa. Genomin muokkaustekniikat mahdollistavat myös tulevaisuudessa uusien, eri stressitekijöiden suhteen kestävämpien riisilajikkeiden tuottamisen (Mishra ym., 2018). Seuraavissa kappaleissa käsitellään tarkemmin tutkimusta, jossa riisistä on onnistuttu muokkaamaan vastustuskykyinen erään sienitaudin suhteen.

### 5.1. Rice blast -tauti

Rice blast on riisisatoa turmeleva sieni-infektiosta seuraava tauti, jonka saa aikaan *Magnaporthe oryzae* niminen sieni. Tauti on maailmanlaajuisesti yksi suurimpia sadon menetyksiä aiheuttavista sairauksista. Artikkelissaan Wang ym. (2016) käsittelevät, kuinka CRISPR-Cas9:n avulla saatiin tuotettua taudille vastustuskykyinen lajike. Muokkauksessa kohdegeeninä oli geeni nimeltään OsERF922. Geeni kuuluu ERF (ethylene responsive factors) -geeniperheeseen, joka on suuren transkriptiofaktorigeeniperheen alaluokka. OsERF922 toimii transkription aktivoijana kasvisolussa. OsERF922 -geenin on huomattu olevan säätelygeeni, joka säätelee negatiivisesti riisin vastustuskykyä taudin suhteen. Tämän lisäksi OsERF922:n lisääntynyt ilmentyminen alentaa kasvin toleranssia korkean suolapitoisuuden suhteen (Liu ym., 2012).

Työn tavoitteena oli siis aikaansaada OsERF922 -geeniin mutaatioita, jotka estävät geenin normaalin toiminnan. Genomin muuntelussa käytetty riisilajike oli nimeltään Kuiku131, jota viljellään esimerkiksi Pohjois-Kiinassa. Kohdesekvenssiksi valittiin 20 emäsparin mittainen sekvenssi OsERF922:n avoimesta lukukehyksestä. Cas9:n leikkauskohta sijaitsi seitsemän emäsparin päässä aloituskodonista tämän alavirrassa. Rakennettu plasmidi sisälsi guideRNA:n sekä Cas9:n sekvenssit. Vektori sisälsi myös resistenssigeenin hygromysiini -antibiootin suhteen. Menetelmän toimivuutta havainnoitiin ensiksi siirtämällä plasmideja riisin protoplasteihin. Sekvensoinnin avulla saatiin selville, että menetelmällä oltiin saatu tuotettua kohdegeenien mutaatioita. Mutaatioiden joukossa oli esimerkiksi yhden nukleotidin substituutio, viiden emäsparin deleetio sekä 30 emäsparin insertio. Tulokset tukivat työn jatkamista seuraavaan vaiheeseen.

Vektorit siirrettiin riisin kallukseen bakteerivälitteisesti *Agrobacterium tumefaciens* -kannan avulla. Kallusmateriaali, johon vektorin siirtäminen oli onnistunut, valikoitiin kasvatusliuoksen avulla, johon oli lisätty hygromysiini -antibioottia. Tuloksena oli 50 muunneltua T0-linjan kasvia, joista 21 yksilön kohdesekvenssiä tarkasteltiin tarkemmin. Syntyneiden mutaatioiden joukossa oli bialleelisia mutaatioita, homotsygoottisia mutaatioita, heterotsygoottinen mutaatio sekä kimeerinen mutaatio. Suurin osa (64,3 %) mutaatioista olivat tyypiltään alle kymmenen emäsparin deleetioita. Noin neljännes (23,8 %) olivat insertioita ja 11,9 % mutaatioista sisälsivät samanaikaisesti sekä deleetioita että insertioita. 90 % insertioista olivat yhden emäsparin mittaisia. Myöhemmissä tutkimuksissa havaittiin, että useamman Cas9:n kohdistaminen samaan kohdesekvenssiin kasvattaa mutaatioiden ilmaantuvuutta.

Mutaatioiden siirtymistä seuraaville sukupolville tutkittiin itsepölytyksen avulla. Yhteensä seitsemän yksilöä itsepölytettiin ja näistä neljällä yksilöllä oli bialleelisia mutaatioita. Heterotsygoottisia, homotsygoottisia sekä kimeerisiä mutaatioita ilmensi jokaista yksi yksilö. Sekvensoinnissa saatiin selville, että homotsygootit mutaatiot siirtyivät jälkeläisille. CRISPR-Cas9:llä tuotetut mutaatiot siirtyivät seuraaville sukupolville. Mutanttien genomista etsittiin myös siirrettyä DNA:ta (T-DNA). Tavoitteena oli löytää yksilöitä, joiden genomeista löytyy mutatoitunut OsERF922-geeni, mutta ei enää jälkiä esimerkiksi Cas9:stä. Tätä tutkittiin PCR:llä Cas9:ää varten tehtyjen alukkeiden avulla.

Seuraavassa vaiheessa tutkijat havainnoivat T2-linjan taimien vastustuskykyä taudinaiheuttajan suhteen. Testattavat taimet olivat homotsygootteja mutanteja, joilla oli keskenään erilaisia mutaatioita kohdegeenissään. Taimien vastustuskykyisyyttä taudinaiheuttajan suhteen testattiin suihkuttamalla niihin yhdistettä, joka sisälsi eristettyä *M. oryzaea*. Samanlainen käsittely tehtiin myös villityypin kasveille. Kasvien lehdistä havainnoitiin altistuksen aiheuttamia vammoja. Mutanttien lehdistä vammat olivat vähentyneet, kun taas villityypin yksilöiden lehdet lähes kuolivat käsittelyssä.

Mutanttien fenotyyppiä vertailtiin luonnollisissa oloissa kasvatettuihin villityypin yksilöihin. Kasveista mitattiin muun muassa kasvin pituutta, lehtien pituutta ja leveyttä, tuottavien röyhyjen määrää sekä jyvien määrää per röyhy. Vertailussa ei huomattu merkittäviä eroja villityypin sekä mutanttien kesken. Menetelmällä oli saatu tuotettua *M. oryzaea*:lle vastustuskykyisiä yksilöitä.

## 6. Tomaatin genomin muokkaus

Tomaatti (*Solanum lycopersicum*) on laajalti viljelty kaksisirkkaiseen kuuluva koisokasvi. Tomaatin hedelmät sisältävät useita tärkeitä ravintoaineita, mikä tekee tomaatista suosittua ruokakasvina. Tomaatin genomia muokattaessa tavoitteena on ollut muun muassa hedelmien laadun parantelu. Tomaattien vääränlainen kuljetus sekä varastointi aiheuttavat erilaisten stressitekijöiden ohella tomaattisadon menetyksiä. Kypsyneet hedelmät voivat kärsiä kuljetuksessa tai ne voivat päästä jopa pilaantumaa pitkittyneen varastoinnin vuoksi (Wai ym., 2020). Seuraavassa kappaleessa käsitellään tarkemmin tomaatin hedelmien säilyvyyden parantelua CRISPR-Cas9:n avulla.

### 6.1. Hedelmien pilaantuvuuden säätely

Yu ym. (2017) artikkelissa käsitellään tutkimusta, jonka tarkoituksena oli pidentää tomaatin hedelmien säilyvyyttä sadonkorjuun jälkeen. Hedelmien pidempi säilyvyys mahdollistaisi niiden mahdollisimman perusteellisen hyödyntämisen ilman suuria hävikkimääriä. Työssä käytettiin CRISPR-Cas9 -menetelmää. Kohdegeeninä oli ALC-geeni. Tavoitteena oli korvata alkuperäinen geeni alc-geenillä HR-korjausmekanismia hyödyntäen. Alc-geeni on yksi luonnollisesti syntyneistä mutaatioista, jotka vaikuttavat hedelmien kypsymiseen. Alc-aiheuttaa kypsymisen hidastumista. Näillä mutaatioilla on havaittu usein olevan negatiivinen vaikutus esimerkiksi hedelmien laatuun, makuun sekä vastustuskykyyn bakteerisairauksien suhteen. Alc-mutaatiolla tämä negatiivinen vaikutus on kuitenkin vähäisintä. Alc on NOR-geenin (non-ripening) alleeli, joka on muodostunut pistemutaation vaikutuksesta. Tässä mutaatioissa NOR-geenin koodaavassa sekvenssissä kohdan 317 tyymiini on korvautunut adeniinilla. Tämä mutaatio aiheutti valtiin korvautumisen asparagiinihapolla.

Kohdegeenin korvaamisen lisäksi T0-yksilöihin pyrittiin tuottamaan NHEJ-korjausmenetelmän avulla mutaatioita. Cas9 ja sgRNA siirrettiin samassa vektorissa tomaatin alkeisvarteen. Siirto tapahtui *Acrobacterium* -välitteisesti. Tällä tavoin tuotettiin yhteensä 11 erillistä T0-kasvilinjaa. Genominen DNA eristettiin transgeenisten kasvien lehdistä ja syntyneitä mutaatioita tutkittiin PCR:n ja sekvensoinnin avulla. Yhteensä 264 kloonin sekvensoitiin. Kahdeksan linjaa yhdestätoista sisälsivät mutaatioita. Kolme linjaa luokiteltiin villityypin linjoiksi, koska niissä ei ilmennyt mutaatioita. Mutaatioista 2 oli heterotsygoottisia, yksi bialleelinen ja loput viisi kimeerisiä. Enemmistö mutaatioista oli alle 20 emäsparin mittaisia deleetioita. Neljällä mutantilla ilmeni eri variaatioita samanaikaisista indeleista. Tällaisia olivat esimerkiksi yhden emäsparin insertiot yhdessä kahden tai kolmen emäsparin deleetioiden kanssa. Mutanttien joukossa ei ollut yhtäkään homotsygoottia mutaatiota.



Myös alkuperäisen geenin korvaamisessa vektori siirrettiin *Acrobacterium* -välitteisesti tomaatin alkeisvarteen. Vektori sisälsi Cas9:n, sg-RNA:n sekä kaksijuosteisen luovuttaja-DNA-fragmentin. HR-korjausmekanismin hyödyntämisen tekee haastavaksi se, että NHEJ on paljon aktiivisempi mekanismi. Transgeenisten kasvien tuottamisen turvaamiseksi alkeisvarsista tuotettiin kallusta, jonka avulla kasviyksilöiden määrän kasvattaminen oli mahdollista. Lopputuloksena saatiin yhteensä 26 transgeenistä kasvia. PCR:n jälkeen sekvensoitiin yhteensä 260 kloonina. Ainoastaan kahdessa yksilössä havaittiin HR-menetelmän avulla korjattu geenin korvaus. Yksilöistä toinen oli tyypiltään heterotsygootti sekä toinen oli kimeerinen. Loput kasveista olivat villityypin yksilöiksi luokiteltavissa tai ne sisälsivät mutaatioita. Off-target-mutaatioita ei havaittu kummankaan korjausmenetelmän suhteen.

Seuraavaksi tavoitteena oli tuottaa T1-linjan kasveja, jotka ovat homotsygoottisia resessiivisen alc-geenin suhteen. Itsepölytykseen valittiin aiemmin mainittu HR-korjausmenetelmän avulla tuotettu heterotsygootti yksilö. 233 tuotetusta T1-kasvista arvottiin 200 yksilöä, joiden avulla tutkittiin alleelien jakautumista yksilöiden kesken. Lukusuhteet ALC- sekä alc-geenien suhteen noudattivat Mendelin 1:2:1 lukusuhteita. Tästä vaiheesta jatkotutkimuksiin valikoituivat ne yksilöt, jotka olivat resessiivisen alc-geenin suhteen homotsygootteja eivätkä sisältäneet jälkiä Cas9:stä. Cas9 saatiin poistettua osasta yksilöistä itsepölytyksen sekä geneettisen segregaaion ansiosta.

Homotsygoottien yksilöiden fenotyyppiä vertailtiin villityypin yksilöihin. Tarkasteltavia ominaisuuksia olivat muun muassa kasvin pituus, sekä hedelmien erilaiset ominaisuudet, kuten esimerkiksi niiden kiinteys. Mutanttien ja villityypin yksilöiden välillä ei huomattu merkittävää eroa. Myöskään kukkimisen tai hedelmien kasvuvaiheen suhteen ei huomattu eroavaisuuksia. Alc-geenin huomattiin hidastavan värin muodostumista sekä kypsymistä. Se ei kuitenkaan vaikuta hedelmien poiminta-aikaan, sillä molempien ryhmien hedelmät kypsyivät lopulta poimintakypsiksi samanaikaisesti. Myös hedelmien säilöntäaikaa tarkkailtiin. Homotsygoottien sekä villityypin yksilöiden hedelmiä kerättiin molempia 6 kappaletta. Nämä 12 hedelmää säilytettiin huoneenlämmössä 40 päivän ajan, jonka jälkeen eroja havainnoitiin. Homotsygoottien hedelmissä näkyi vain vähäisiä merkkejä dehydraatiosta sekä pinnan ryppyisyydestä. Villityypin yksilöt olivat selvästi ryppyisempiä ja osassa näkyi jo pieniä pilaantumisen merkkejä. Näiden tuloksien perusteella huomattiin, että alc/alc genotyyppi pidentää hedelmien säilytysaikaa.

## 7. Tulevaisuuden näkymät ruokakasvien muokkauksessa

Dhankher & Foyer (2018) käsittelevät katsausartikkelissaan, kuinka ruoantuotannon turvaaminen sekä ympäristön suojaaminen ovat nyky-yhteiskunnan suuria haasteita. Ruoantuotannon tulee olla tehokasta ja laadukasta, mutta samalla sen tulisi toimia keinoin, jotka kunnioittavat luontoa ja sen monimuotoisuutta. Ilmastonmuutos lisää kasvien kohtaamien stressitekijöiden voimakkuutta, kun esimerkiksi kuumuus ja maaperän kuivuus, suola- sekä raskasmetallipitoisuudet lisääntyvät. Myös erilaiset taudinaiheuttajat voivat levitä uusille alueille lämpötilamuutosten ansiosta. Maaperän köyhtyminen ravinteiden osalta on myös ilmastonmuutoksen seurauksia. Laadukas viljelypinta-ala hupenee, mutta metsien raivaaminen uusien viljelyalueiden tieltä ei ole luonnon monimuotoisuuden kannalta hyvä ratkaisu. Voimistuvien stressitekijöiden sekä niiden yhteisvaikutusten vuoksi olisi ruokakasvien tärkeää olla monipuolisesti vastustuskykyisiä. Resistenssi pelkästään yhden stressitekijän suhteen ei ole suuremmissa mittakaavassa hyödyllistä. Ongelmia puuhaan veden puutteen suhteen voisi mahdollisesti helpottaa tuottamalla korkeille suolapitoisuuksille vastustuskykyisiä viljelykasveja, joiden kastelussa voitaisiin hyödyntää murtovettä sekä suolapitoisempaa vettä.

Myös muuntelussa käytettäviin muokkausmenetelmiin liittyy omat haasteensa. Eş ym. (2019) käsittelevät katsausartikkelissaan CRISPR-menetelmään liittyviä ongelmia. Esimerkiksi ennakoimattomille alueille syntyvät off-target -mutaatiot vähentävät menetelmän luotettavuutta. Myös geeniajurit liittyvät keskusteluun CRISPR:n luotettavuudesta. Geeniajurit mahdollistavat sellaisen ominaisuuden siirtymisen jälkeläisille suuremmalla todennäköisyydellä, joka normaalisti siirtyisi 50 % mahdollisuudella. Lisää tutkimusta kaivataan ja uusia parempia menetelmiä ollaan koko ajan kehittämässä. CRISPR-menetelmän kehittäminen voi tulevaisuudessa vähentää näitä edellä mainittuja ongelmia. Esimerkiksi Cas13-entsyymillä tehdyt tutkimukset osoittivat tarkempia muokkaustuloksia (Eş et al., 2019). Emästen muokkaustekniikalla (Base Editing) on onnistuttu tekemään muokkauksia, joissa ilmenee vähemmän indeleitä, sillä tekniikalla ei tuoteta aukkoa kohde-DNA:n kaksoisjuosteeseen. Myöskään off-target mutaatioita ei ilmene niin paljoa. Emästen muokkausmenetelmä on uusi genomin muokkaustekniikka, jonka avulla emäksiä vaihdetaan toisiksi. Menetelmää on käytetty jo ruokakasvien muokkauksessa. Esimerkiksi rikkakasvimyrkyllä resistentti riisilajike on onnistuttu tuottamaan emäsmuokkauksen avulla (Molla & Yang, 2019).

## 8. Yhteenveto

Genomin muokkausmenetelmiä on hyödynnetty monipuolisesti ruokakasvien muokkaamisessa. Uudemmista muokkausmenetelmistä CRISPR-menetelmät ovat suurimman kiinnostuksen kohteena. Muokkaamista on käytetty apuna ruokakasvien vastustuskyvyn sekä sadon ominaisuuksien parantelussa. Tavoitteena on tuottaa kasvilinjoja, jotka olisivat monipuolisesti vastustuskykyisiä erilaisten stressitekijöiden suhteen. Itsepölytyksen ja geneettisen segregaaation avulla muokatuista kasveista on mahdollista tuottaa jälkeläisiä, jotka eivät sisällä muokkauksessa käytettyä vierasta materiaalia genomissaan. Muokattujen kasvien fenotyyppejä vertaillaan monissa tapauksissa perusteellisesti villityypin yksilöihin. Tällä tavoin saadaan tietoa siitä, vaikuttaako muokkaus yksilöiden ulkoisiin ominaisuuksiin ja kuinka stressitekijöiden vaikutukset ilmenevät näiden ryhmien välillä.

Täysin ongelmatonta kasvien muokkaus ei ole, vaan lisätutkimuksia ja kehittelyä tarvitaan. Esimerkiksi ennakoimattomien off-target -mutaatioiden syntymisen vähentäminen on yksi genomin muokkausmenetelmien kehityskohdista. CRISPR-menetelmästä kehitelläänkin jatkuvasti tarkempaa työkalua. Tarkkuutta yritetään parantaa esimerkiksi erilaisten restriktioentsyymien avulla. Myös täysin uudenlaisten sovelluksien, kuten emäsmuokkauksen, on huomattu parantavan muokkauksen tarkkuutta. Muokkauksen vaikutuksia tulisi tarkastella myös ympäröivän ympäristön näkökulmasta. Voivatko muokatut viljelykasvit levittäytyä ympäristöönsä ja kuinka se vaikuttaisi ekosysteemeihin ja näiden alkuperäisiin lajeihin? Stressitekijät sekä ihmispopulaation kasvu haastavat tulevaisuuden ruoantuotantoa. Nopeasti muuttuvat ympäristöolot heikentävät kasvien elintoimintoja ja sadonmuodostusta. Genomin muokkaustekniikat voivat olla tulevaisuudessa hyvä apukeino helpottaa näitä ongelmia, mutta lisätutkimuksia kaivataan vielä. Muokatut nukleasit ovat olleet monessa kokeilussa tehokas työväline ja niiden avulla on saatu tuotettua onnistuneesti kasviyksilöitä, jotka ovat vastustuskykyisiä erilaisten stressitekijöiden suhteen.

## 9. Lähdeluettelo

- Carroll, D. (2014). Genome Engineering with Targetable Nucleases. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 409–439. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035418>
- Debbarma, J., Sarki, Y. N., Saikia, B., Boruah, H. P. D., Singha, D. L., & Chikkaputtaiah, C. (2019). Ethylene Response Factor (ERF) Family Proteins in Abiotic Stresses and CRISPR–Cas9 Genome Editing of ERFs for Multiple Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants: A Review. In *Molecular Biotechnology* (Vol. 61, Issue 2, pp. 153–172). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0144-x>
- Dhankher, O. P., & Foyer, C. H. (2018). Climate resilient crops for improving global food security and safety. *Plant, Cell & Environment*, 41(5), 877–884. <https://doi.org/10.1111/pce.13207>
- Eş, I., Gavahian, M., Marti-Quijal, F. J., Lorenzo, J. M., Mousavi Khaneghah, A., Tsatsanis, C., Kampranis, S. C., & Barba, F. J. (2019). The application of the CRISPR–Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnology Advances*, 37(3), 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.006>
- Gimenez, E., Salinas, M., & Manzano-Agugliaro, F. (2018). Worldwide research on plant defense against biotic stresses as improvement for sustainable agriculture. *Sustainability (Switzerland)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/su10020391>
- Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., & Venkataraman, G. (2018). CRISPR for crop improvement: An update review. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00985>
- Khan, Z., Khan, S. H., Mubarik, M. S., Sadia, B., & Ahmad, A. (2017). Use of TALEs and TALEN Technology for Genetic Improvement of Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 35(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11105-016-0997-8>
- Kusch, S., Pesch, L., & Panstruga, R. (2016). Comprehensive phylogenetic analysis sheds light on the diversity and origin of the MLO family of integral membrane proteins. *Genome Biology and Evolution*, 8(3), 878–895. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw036>
- Liu, D., Chen, X., Liu, J., Ye, J., & Guo, Z. (2012). The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3899–3911. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers079>
- Miglani, G. S. (2017). Genome editing in crop improvement: Present scenario and future prospects. In *Journal of Crop Improvement* (Vol. 31, Issue 4, pp. 453–559). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15427528.2017.1333192>
- Mishra, R., Joshi, R. K., & Zhao, K. (2018). Genome editing in rice: recent advances, challenges, and future implications. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9, p. 1361). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01361>
- Mishra, R., & Zhao, K. (2018). Genome editing technologies and their applications in crop improvement. In *Plant Biotechnology Reports* (Vol. 12, Issue 2, pp. 57–68). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0472-0>

- Molla, K. A., & Yang, Y. (2019). CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 10, pp. 1121–1142). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.008>
- Nejat, N., & Mantri, N. (2017). Plant immune system: Crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. *Current Issues in Molecular Biology*, 23. <https://doi.org/10.21775/cimb.023.001>
- Ran, Y., Patron, N., Kay, P., Wong, D., Buchanan, M., Cao, Y.-Y., Sawbridge, T., Davies, J. P., Mason, J., Webb, S. R., Spangenberg, G., Ainley, W. M., Walsh, T. A., & Hayden, M. J. (2018). Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnology Journal*, 16(12), 2088–2101. <https://doi.org/10.1111/pbi.12941>
- Wai, A. H., Naing, A. H., Lee, D. J., Kim, C. K., & Chung, M. Y. (2020). Molecular genetic approaches for enhancing stress tolerance and fruit quality of tomato. In *Plant Biotechnology Reports* (Vol. 14, Issue 5, pp. 515–537). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11816-020-00638-1>
- Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y., Liu, Y.-G., & Zhao, K. (2016). Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. *PLOS ONE*, 11(4), e0154027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154027>
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J.-L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32(9), 947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
- Yu, Q.-H., Wang, B., Li, N., Tang, Y., Yang, S., Yang, T., Xu, J., Guo, C., Yan, P., Wang, Q., Wang, Q., & Asmutola, P. (2017). CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12262-1>
- Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B. H. (2017). Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. In *Evolutionary Applications* (Vol. 10, Issue 1, pp. 5–24). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/eva.12434>
- Zhao, H., & Wolt, J. D. (2017). Risk associated with off-target plant genome editing and methods for its limitation. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), 231–240. <https://doi.org/10.1042/ETLS20170037>