

# MIKROLISÄYSALOITUSTEN KÄYTÄNTÖJEN LUOMINEN

## KINNALAN TAIMISTOLLE

Esimerkkinä *Prunus cerasus* 'Suklaakirsikka'



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Lepaa, Puutarhatalouden koulutusohjelma

kevät, 2018

Laura Keulas

Puutarhatalous  
HAMK Lepaa

---

<b>Tekijä</b>	Laura Keulas	<b>Vuosi</b> 2018
<b>Työn nimi</b>	Mikrolisäysaloitusten käytäntöjen luominen Kinnalan Taimistolle – esimerkkinä <i>Prunus cerasus</i> 'Suklaakirsikka'	
<b>Työn ohjaaja</b>	Arto Vuollet	

---

## TIIVISTELMÄ

Tavoitteena opinnäytetyössä oli luoda toimiva ohjeistus Kinnalan Taimiston tarpeisiin mikrolisäysviljelmien aloitusvaiheen työstä. Ohjeistus luotiin oppaan muotoon. Opinnäytetyössä tehtiin mikrolisäysaloitus *Prunus cerasus* 'Suklaakirsikasta' esimerkinomaisesti malliksi mikrolisäysaloituksesta. Tehdyn työn perusteella koottiin muistiinpanot mikrolisäysviljelmien aloitusvaiheen työstä ja dokumentoitiin työn vaiheet sekä lopulta koottiin opas.

Opas koostuu valmisteluvaiheen ohjeista, työselosteesta ja kuvista sekä tärkeimmistä mikrolisäysviljelmien aloittamisen ympärillä tapahtuvasta työstä. Ohjeiden ja muistilistojen lisäksi on koottu mikrolisäysviljelmien aloittamiseen vaikuttavista tekijöistä tiivis ohjeistus. Oppaassa mikrolisäysviljelmien aloittamisen työvaiheet selostetaan ja opastetaan selkeästi ja johdonmukaisesti työn etenemisen mukaan. Oppaan avulla voidaan tehdä mikrolisäysviljelmän aloitusvaihe aina suunnittelusta jatkokasvatukseen asti. Suklaakirsikasta tehty aloitus onnistui hyvin ja aloituksesta saatiin hyvää käytännön tietoa oppaan kirjoittamiseen. Ongelmatilanteet on työntekijälähtöisesti selvitetty ja laadittu opas palvelee tulevaisuudessa Kinnalan Taimiston käytössä perehdytyksessä ja on myös sovellettavissa muiden mikrolisäyslaboratorioiden käyttöön.

Kokonaisvaltainen ohjepaketti monista muistakin mikrolisäyksen työvaiheista olisi paikallaan kaupallisesti taimia tuottavien mikrolisäyslaboratorioiden käytössä. Ohjeet tehostavat työskentelyä sekä ajankäyttöä ja ohjeiden laatiminen sekä työvaiheiden miettiminen johtavat työvaiheiden ja työvälineiden päivittämiseen ja uudelleen organisointiin.

**Avainsanat** mikrolisäysviljelmä, opas, *Prunus*

**Sivut** 32 s. + liite 30 s.

Horticulture  
 HAMK Lepaa

---

<b>Author</b>	Laura Keulas	<b>Year</b> 2018
<b>Subject</b>	Creating practice of micropropagation initiation for Kinnalan taimisto – the case study of <i>Prunus cerasus</i> 'Suklaakirsikka'	
<b>Supervisors</b>	Arto Vuollet	

---

#### ABSTRACT

The aim of the thesis was to create a practical set of instructions for Kinnalan Taimisto's demands for the initiation work of micropropagation. The instructions were created in a form of a manual. In the thesis micropropagation initiation was started from the *Prunus cerasus* 'Chokoladnaja' as an example of a micropropagation initiation. Based on the finished work, the notes about the made initiation were gathered and the work stages were documented, and the manual was put together.

The manual consists of preparation stage instructions, working specifications and pictures together with the working specifications for micropropagation initiation. Along with the instructions and the checklists, a compact guide about the variety of things that affect the micropropagation initiation was created. In the manual the stages of the initiation work are described and guided clearly and consistently throughout the work progress. With the manual an initiation can be made from the planning of the initiation all the way to the further cultivation. The initiation made from the 'Chokoladnaja' succeeded well, and it gave great practical information for the manual. Problematic situations were solved in an employee driven manner and, in the future, the prepared manual serves Kinnalan Taimisto in work orientation purposes and the manual is also adaptable for other micropropagation laboratories.

A comprehensive manual about many other micropropagation work stages could be very useful for nurseries that are producing plants commercially. Manuals accelerate work and time management and compiling manuals and reflecting work stages will lead to upgrading the work stages and utensils and to reorganization.

**Keywords** micropropagation, manual, *Prunus*

**Pages** 32 p. + appendices 30 p.

## TERMIT JA LYHENTEET

<b>agar</b>	hiilihydraattipolymeeri, joka eristetään punaleivistä. Agar-jauhetta käytetään kiinteyttämään mikrolisäyksessä käytettävät alustat. Kiinteyttämiseen voidaan käyttää muitakin aineita
<b>aloitusmateriaali</b>	mikrolisäysviljelmän aloitusvaiheessa työstettävä kasvin pala, osa tai solukkoa
<b>aseptinen</b>	puhdas, mikrobiton; työskentely-ympäristön ja välineiden pito puhtaana ja mikrobittomina steriloimalla
<b>autoklaavi</b>	laite, jota käytetään kasvualustojen ja työvälineiden sterilointiin paineen ja kuumen höyryn avulla.
<b>bakteeri</b>	esitumallinen yksisolainen mikrobi
<b>bioburden</b>	steriloitavassa asiassa tulisi olla sterilointia aloitettaessa mahdollisimman vähäinen bioburden eli alkukontaminaatio, eli steriloinnin kohteen tulisi olla valmiiksi niin puhdas kuin on mahdollista
<b>emokasvi</b>	kasvullisessa lisäämisessä lisäysprojektin alkuperäinen yksilö eli kasvi, josta otetaan materiaalia aloitukseen mikrolisäyksessä
<b>fenotyyppi</b>	kasvin ilmiasu; havainnoitsijalle ilmenevä kasvi sellaisena kuin se on
<b><i>in vitro</i></b>	useimmin lasin tai koeputken sisällä
<b>kontaminaatio</b>	saastuminen, likaantuminen; mikrobien joutuminen ei-haluttuun paikkaan
<b>laminaarivirtauskaappi</b>	työskentelytila, jonka sisällä olevat viljelmät ja tavarat pysyvät puhtaina saastumiselta kaapin puhaltaman puhtaan ilmavirran ansiosta
<b>mikrolisäysaloitus</b>	tapahtuma, jossa mikrolisäysviljelmän mikrolisäyskäsittely aloitetaan steriloinnilla ja aloitusmateriaali laitetaan kasvaamaan kasvualustalle

<b>monistuserroin</b>	monistuserroin kertoo, kuinka monta versoa saadaan yhdestä versosta. Eroin lasketaan jakamalla monistuksessa saatujen versojen määrä leikattujen versojen lukumäärällä
<b>NaOCI</b>	natriumhypokloriitti, käytetään mikrolisäyksessä viljelmien aloituksessa aloitusmateriaalin sterilointiin. Suomessa käytetään yleisemmin lyhennettä NaClO
<b>plagiotropia</b>	pikkutaimet alkavat kasvaessaan monistuksessa käyttäytyä samaan tapaan kuin vanha kasvinosa, josta silmu on peräisin
<b>saprophyttinen</b>	kasvi, bakteeri tai sieni, joka käyttää ravinnokseen lahoavaa tai mätänevää ainetta
<b>sterilointi</b>	poistaa kaikki elinkykyiset mikrobit, epäpuhtaudet ja muut saastuntojen aiheuttajat ja siten puhdistaa esimerkiksi jonkin pinnan
<b>WPM-alusta</b>	Gregory Lloydin ja Brent McCownin kehittämä solukkoviljelyalusta puuvartisille kasveille. Yksi yleisimmistä tunnetuista lisäsalustoista.

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	MIKROLISÄYS JA TAIMISTOTUOTANTO .....	7
3	MIKROLISÄYSVILJELMIEN ALOITTAMINEN .....	8
3.1	Emokasvi ja aloitusmateriaali.....	11
3.2	Aloitusajankohta .....	12
3.3	Kasvualusta.....	12
3.4	Puhtaus mikrolaboratoriossa .....	13
3.5	Kasvatus.....	13
3.6	<i>Prunus cerasus</i> 'Suklaakirsikka' esimerkkikasvina .....	14
4	CASE: SUKLAAKIRSIKKAVILJELMÄN ALOITTAMINEN .....	15
4.1	Projektin suunnittelu ja toteutus .....	16
4.1.1	Viljelmän aloittamisen ajankohta.....	16
4.1.2	Suunnittelu .....	17
4.1.3	Aloitusmateriaalin valitseminen.....	17
4.1.4	Aloituksessa käytettävien alustojen valitseminen .....	18
4.1.5	Sterilointi .....	19
4.2	Työn toteutus .....	20
4.3	Tulosten tarkastelu.....	24
5	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	26
	LÄHTEET .....	30

## 1 JOHDANTO

Tehokkaan tuottamisen maailmassa mikrolisäys on noussut suosioon erityisesti ulkomailla, myös Suomesta löytyy muutamia lisäyslaboratorioita. Mikrolisäyslaboratoriot tuottavat emokasvin kaltaisia kasveja jopa suuria määriä. Pienien määrien tuottaminen ei ole kustannustehokasta eikä järkevää hintavalla mikrolisäyksellä. Mikrolisäyksellä voidaan tuottaa terveitä taimiyksilöitä ja lisätä kasveja, joiden lisäys muilla menetelmillä ei onnistu kovin hyvin tai ei ollenkaan. Suomessa mikrolisäysviljelmien aloituksia on aiemmin valmistanut Luonnonvarakeskus Laukaalla. Luonnonvarakeskuksen Laukaan yksikkö lopettaa toimintansa ja siirtää osan toiminnoistaan muualle. Tästä syystä mikroviljelmiä on yhä vaikeampaa saada ostettua valmiina. Laukaalla on myös suoritettu ahkerasti useita vuosia kokeita, joissa on perustettu mikrolisäysviljelmiä uusista kasveista. Tilanne on synnyttänyt toimivalle taimistolle tarpeen oppia mikrolisäysviljelmien aloitusvaiheen työ, jotta voidaan perustaa itse viljelmiä. Tästä syystä halutaan luoda käytännöt ja selkeät ohjeet mikrolisäysviljelmien aloitusten tekestä varten. Opinnäytetyö on työelämän kehitystyö, joka tavoittelee käytännön toiminnan kehittämistä, ohjeistamista ja järjestämistä sekä työn tehostamista.

Opinnäytetyön tilaaja on Kinnalan Taimisto, aikaisemmin Saarioisten Taimistot. Yritys on tehnyt ennenkin mikroviljelmien aloituksia, mutta dokumentointi on jäänyt vähälle eikä osaamista löydy olemassa olevalta henkilökunnalta kovinkaan paljon. Yritys haluaa pitää työohjeet päivitettyinä ja siksi tarvitaankin ohjeet, jotta tulevaisuudessa eri vaiheet ja tekniikat mikrolisäysviljelmien aloittamiseen ja sen ympärillä olevaan käytännön työhön voidaan tarkistaa ohjeista eikä tarvitse käyttää aikaa käytäntöjen luomiseen. Työssä käsitellään mikrolisäysviljelmien aloittamisvaiheen käytännön työn osuutta, ennakkovalmisteluja sekä hieman jatkokasvatusta. Työn rajaus on pyritty pitämään tarkasti viljelmien perustamisessa sekä aloitukseen liittyvien välttämättömien töiden parissa, sillä aiheena pelkkä aloituksen tekeminen on tilaajan kannalta kiinnostava, koska taimistolla toimitaan päivittäin mikrolisäämisen parissa.

Opinnäytetyötä varten tehty käytännön työ on tehty Kinnalan Taimiston laboratorion tiloissa syksyllä 2017. Työssä on selvitetty Suklaakirsikan mikrolisäyksen käytäntöjä ottaen käytännön työstä mallia ja käytännön työhön liittyen on kirjoitettu opas. Opas on tarkoitettu muille samankaltaisessa mikrolisäyslaboratoriossa työskenteleville aloituksen tekijöille, vaikka se onkin ennen kaikkea luotu Kinnalan Taimiston tarpeisiin. Tavoitteeksi nousevat seuraavat kysymykset: Miten mikrolisäysviljelmien aloituksia tehdään? Mitä ohjeita tarvitaan mikrolisäysviljelmän aloittamiseen? Kuinka tehdä mikrolisäysaloitus tehokkaasti ja puhtaasti? Työssä on tutkailtu mikrolisäystä aloitusvaiheen kannalta kiinnostavista näkökulmista ja esitelty tehty työ ja saadut tulokset, jonka mukaan on kirjoitettu liitteeksi

mikrolisäysviljelmien aloitusvaiheen opas. Opas käsittelee jäsennellysti aloitusvaiheen eri työvaiheet ja opastaa työhön sanallisesti ja kuvallisesti.

## 2 MIKROLISÄYS JA TAIMISTOTUOTANTO

Mikrolisäys toimii monella tasolla aina harrastelijasta, joka on oppinut lisäämään kasveja esimerkiksi omassa keittiössään, miljoonaluokan tuotantoon puhdistilalaboratorioihin. Mikrolisäyksen historia alkoi noin 1970-luvulla, jolloin muutamat taimistot erikoistuiivat solukkoviljelyn saralla. (Kyte & Kleyn 1996, 13). Tehokkaaseen tuottamiseen tähdättyä pyritään myös mahdollisimman tehokkaaseen mikrolisäykseen. Resursseja ei haluta heittää hukkaan, mutta rahaa ollaan valmiita käyttämään tehokkaan lisäämisen toivossa.

Jokaiselle kasville paras lisäysmuoto riippuu kasvilajista ja sen ominaisuuksista. Mikrolisäys on kasvullisen lisäämisen muoto, jossa kasvavaa solukkoa hyväksi käyttäen kasvatetaan kasvimassaa, josta myöhemmin saadaan uutta kasvimateriaalia kasvavista versoista. Mikrolisäyksen idea on käyttää pieniä kasvinosia, jopa yksittäisiä soluja ja lisätä niistä emokasvin kaltaisia kloonieja. Kloonieihin siirtyy kaikki emokasvissa olevat ominaisuudet, myös huonot. (Kyte & Kleyn 1996, 13). Mikrolisäyksellä tuotetaan puhdasta kasvimateriaalia mikrobittomissa olosuhteissa (Iliev, Gajdosova, Libiakova & Jain 2010, 1-2).

Mikrolisättyjen taimien tuottaminen voi olla ainoa tapa tuottaa riittävästi taimia ja vastata kysyntään (Kyte & Kleyn, 1996, s. 16). Kasvimassan tuottaminen on suhteellisen nopeaa ja sen tehokkuutta arvostetaan erityisesti sellaisten kasvien kohdalla, kun muut lisäyskeinot toimivat huonosti tai eivät ollenkaan. Mikrolisäys voi tulla kysymykseen, jos kasvin siemeniä ei ole saatavilla, siemenien käsittelyyn ja kasvattamiseen kuluisi paljon aikaa tai jopa jos siemenestä kasvanut kasvi ei ole yhtäläinen alkuperäisen kanssa. (Kyte & Kleyn 1996, 16). Mikrolisäys sopii erityisesti kasveille, joista halutaan nimenomaan emokasvin kaltainen, eli se sopii hyvin lisäystavaksi kasveille, joita myydään lajikenimellä (Huhtama 2013, 19).

Kaupallisen mikrolisäyksen hyviin puoliin kuuluvat valittujen kasvukloonien massatuottaminen, tautivapaiden kasvien lisäys ja kloonattujen emojen lisäys sekä se, että mikrolisäys mahdollistaa taimistoiden ympärivuotisen toiminnan. Mikrolisäyksen varjopuoliin kuuluvat mikrolisäyslaboration perustamis- ja ylläpitokustannukset, suuri työmenekki ja riskit lisäyksen onnistumisessa (Hartmann, Kester, Davies & Geneve 2014, 699-702). Lisäksi huonona asiana voidaan nähdä myös koulutetun työvoiman puute. Jokaisen kasvin kohdalla joudutaan kouluttamaan työvoima, koska usein eri kasveilla käytetään erilaisia tekniikoita aloittamisesta siirrostukseen.



Joka vuosi viljelijöiden ja taimistojen tilaa sekä aikaa menetetään hävikin muodossa. Hävikkiä syntyy, kun pistokasmateriaalista osa ei lähde kasvuun tai nuoria kasveja menetetään tuholaisille ja taudeille tai muiden ympäristöllisten seikkojen vaikutuksesta. Mikrolisäyksellä pystytään tuottamaan tervettä kasvimassaa; terve kasvu on paras suoja tauteja vastaan taisteltaessa (Kyte & Kleyn 1996, 17).

Mikrolisääminen on yleisen käsityksen mukaan kallista ja käsitys ei ole aivan väärässä, vaikka kyseessä onkin tehokas tapa tuottaa kasvimateriaalia. Mikrolaboration vuosirytmä on ihanteellinen, sillä se mahdollistaa tehokkaan työntekemisen silloin, kun ulkona odotellaan parempia ilmoja (Kyte & Kleyn 1996, 17). Työvoima on kallein osuus mikrolisäystyössä (Kyte & Kleyn 1996, 140). Mikrolisäysviljelmien hoitaminen ei vaadi päivittäisiä toimia, kuten taas siemenlisäyksen ja pistokaslisäyksen kanssa on (Kyte & Kleyn 1996, 17). Suurien kasvimassojen työstämiseen kuitenkin kuluu runsaasti työtunteja. Laboratorion perustaminen on satsauksena kallis, koska laitteet ja välineet maksavat suuria summia. Pienelläkin repertuaarilla pärjää, mutta hyödyn saaminen lisäämisestä on hankalaa, mikäli työskennellään minimillä esimerkiksi koneiden ja välineiden suhteen. Tuotannollisen mikrolaboration on saatava kasvit tuottamaan (Kyte & Kleyn 1996, 19). Laitteistoa on mahdollista ostaa tietysti myös käytettynä, mutta niiden saatavuus vaihtelee.

Useimmiten mikrolisätyt kasvit ovat elinvoimaisempia, tautiresistenssi on parempi ja ne ovat tautivapaita sekä lajikeaitoja, nämä ovat syitä mikrolisäyksen suosimisille. Vaikka tautivapaiden kasvien lisääminen mikrolaboratoriossa ei toisi pelastusta maailman ruokaongelmaan, on kuitenkin otettava huomioon, että tautivapaat kasvit mahdollistavat niiden siirtämisen ihmisten saataville maailmanlaajuisesti, olivatpa ne sitten ruokakasveja tai koristekasveja. Mikrolisäyksen kehittämiseen ja tuottamisen jatkamiseen motivaationa toimivat niin tuotto, tutkimus kuin henkilökohtainen mielenkiinto. Mikrolisäyksellä voidaan tuottaa huomattavan suuria määriä terveitä hyvin kasvavia taimia vähemmässä tilassa ja vähemmällä työvoimalla sekä myös kustannustehokkaammin kuin muilla kasvullisen lisäyksen menetelmillä. (Kyte & Kleyn 1996, 20). Mikrolisäyksellä on lisäksi mahdollista pelastaa kasveja sukupuutolta (Haymarket Media Group Ltd 2010), kun katoamassa olevia kasveja aletaan lisätä mikrolisäyksellä ja viljelmiä ylläpidetään laboratoriossa.

Mikrolisäysaloitusten avulla voidaan ottaa tuotantoon sellaisia kasveja, kun sillä hetkellä tarpeellista on. Versojen kasvattamisessa kuluu kuitenkin aikaa, joten nopea prosessi aloitus ei ole.

### 3 MIKROLISÄYSVILJELMIEN ALOITTAMINEN

Mikrolisäyksestä ja mikroviljelmien aloittamisesta kertovaa kirjallisuutta löytyy suhteellisen paljon englannin kielellä ja muutamia suomenkielisiäkin teoksia on olemassa. Keskeisimpiä mikrolisäyksestä kertovia teoksia ovat muun muassa Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices (Part 1) vuodelta 2014, jonka kirjoittajia ovat Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. ja Geneve, R. L. sekä In vitro culture of trees vuodelta 1992, jonka kirjoittajina ovat toimineet Bonga, J.M. ja Von Aderkas, P. Bongan ja Von Aderkasin kirjoittamassa kirjassa on selitetty aina laboratorion välineistöstä lähtien keskeisimmät tiedot mikrolisäykseen liittyen perusvälineistöstä erilaisten töiden kuvaukseen asti. Suomenkielistä kirjallisuutta on mikrolisäämisestä olemassa vähän. Ylipäätään kirjallisuus, jota löytää liittyen mikrolisäämiseen on iältään usein suhteellisen vanhaa. Työssä lähteenä on käytetty, kuten usein mikrolisäyslaboratorioissakin käytetään, suullista tietoa. Tiedoista osa on opittu Hämeen ammattikorkeakoulun Leppaan yksikön mikrolisäyslaboratoriossa työskentelemällä ja opiskelemalla.

Yrityksen, joka haluaa olla mukana nykypäivän kilpailuhenkisessä maailmassa ja tuottaa tehokkaasti sekä suunnitelmallisesti on koko ajan kehityttävä ja tarkkailtava omaa työtään, on myös puututtava epäkohtiin, jotka hidastavat tahtia. Tällaisessa yrityksessä työntekijöiden kouluttaminen syntyneiden tarpeiden mukaan nousee tärkeään rooliin. Työntekijöiden tulee tietää, mitä he ovat tekemässä ja saatavilla tulee olla riittävä ohjeistus työtehtäviin sekä erilaisiin ongelmatilanteisiin, jotta jatkuvaan neuvomiseen ja ohjaamiseen ei kulu turhaa aikaa. Pehdyttäminen kuuluu omalta osaltaan vahvasti yrityksen tehokkaan työntekemisen pakettiin. Pehdytyksellä luodaan pohja tulevaisuuden osaamiselle ja katetaan pöytä, johon voidaan aina tarvittaessa lisätä ainesosia eri puolilta yrityksen tarpeisiin. Työntekijöiden saatavilla olevat ohjeistukset ovat yksi tapa lisätä mikrolisäystyön potentiaalia, siitä syystä ohjeistusten tekeminen on tärkeää ja tarpeellista.

Työntekijöiden tietotaito, osaaminen ja kattavat ohjeet muodostavat yrityksen tehokkaalle tuottamiselle kivijalan yhden osasen, jota ilman yritys haparoi ja kuluttaa voimavaroja väärin paikkoihin. Ohjeistukset, joista voidaan tarvittaessa tarkistaa työn etenemistä koskevia seikkoja ja joihin voidaan työtä tehdessä tukeutua ovat tehokkaat ja työntekijävaihtuvuuden kannalta järkevät.

Opinnäytetyönä tehty mikrolisäysaloittamisen opas tehdään käytännön tarpeesta palvelemaan käytännön työtä. Vastaavanlaisia aloittamiseen ohjeistavia kokonaisvaltaisia oppaita tai ohjeita ei ole saatavissa. Kirjallisuus esittelee aloituksen vaiheita, mutta kokonaisvaltaiset opastukset siihen, miten mikrolisäysaloitukseen liittyvä työ tehdään, jäävät uupumaan.

Mikrolisäyksestä kertovassa kirjallisuudessa on esitelty laajasti erilaisia tekniikoita ja aloitusaloitustajia sekä aloittamiseen vaikuttavia seikkoja. Iliev, Gajdosova, Libiakova ja Jain (2010, 13) esittelevät kirsikan mikrolisäysaloit-

tuksesta yhden version. Toinen versio kirsikan mikrolisäysaloituksesta löytyy esimerkiksi Hartmannin, Kesterin, Daviesin ja Geneven (2014) kirjoittamasta kirjasta. Näiden kahden eri aloitustavan välillä on eroja. Esimerkiksi sterilointiajassa ja sterilointivoimakkuudessa on selvä ero ajallisesti sekä sterilointiliuoksen pitoisuudessa. Opinnäytetyössä ei paneuduttu niinkään kirsikan aloittamisen eri tekniikoihin, vaikka tarkoitus olikin saada aloituksesta käyttöön toimiva viljelmä. Opinnäytetyötä varten tehty aloitus Suklaakirsikasta palveli oppaan kirjoittamisessa ja toimi esimerkin omaisena työnä tulevaisuutta silmällä pitäen. Tämän opinnäytetyön tehtävänä oli siis selvittää itse aloitukseen liittyviä käytäntöjä ja asioita. Aiemmin on tehty lukuisia opinnäytetöitä, joissa on vertailtu eri kasveille alustoja ja niiden sopivuutta, tästä syystä alustojen vertailu ja parhaan mahdollisen Suklaakirsikalle sopivan aloitustavan löytäminen on rajattu työstä pois.

Mikrolisäyksen avulla voidaan poistaa viruksia kasveista ja tuottaa puhtaita taimia, näin tehtiin ensimmäisen kerran vuonna 1952 kärkikasvusolukosta aloitetulle viljelmälle (Dodds & Roberts 1982, 99). Mikrolisäysviljelmiä on mahdollista aloittaa solukkoviljelymenetelmällä, jolloin silmut preparoidaan esille versoista mikroskoopin avulla. Kaupallisen mikrolisäyksen perusta on kuitenkin hankasilmuista tehtävissä aloituksissa ja niistä tehtävässä monistuksessa (Dirr & Heuser 2006, 85). Mikrolisäyksessä aloitukseen käytettävä kasvin osa voi olla oksan pala, juurta, lehti tai silmu ja jopa yksittäiset solut (Kyte & Kleyn 1996, 13). Monistaminen tarkoittaa kasvavista versoista leikkaamalla saatavaa kasvimassan lisäämistä. Kun esimerkiksi hankasilmusta alkaa aloitusvaiheen jälkeen kasvaa verso, siirretään se aloitusaloitustalalta monistusaloitustalalle kasvamaan. Kasvuvaiheen jälkeen uudelleen kasvaneesta versosta leikataan paloja uudelleen aloitustalalle laitettavaksi, kutsutaan tätä monistamiseksi. Monistusvaiheen jälkeen versot juurrutetaan ja mikrotaimet kasvatetaan isoiksi taimiksi. Hankasilmuista tehtävät aloitukset perustuvat uinuvien vaihtoehtoisten meristeemien stimulointiin, jolloin ne alkavat kasvaa. (Dirr & Heuser 2006, 85).

Aloitusvaiheen tarkoitus on yrittää saada kasvit sopeutumaan ja kasvamaan aseptisissä oloissa (Huhtama 2013, 17). Mikrolisäysviljelmien aloittaminen vaatii perehtyneisyyttä ja mikrolisäyksen perusteiden tulee olla hallussa. Työskennellessä tulee pysyä kärryillä siitä, mitä on tekemässä ja miksi jotakin tehdään. Mikroviljelmän aloittamista varten otetaan selvää kasvin ominaisuuksista ja tarpeista hyvän kasvuun lähdön varmistamiseksi. Aloituksessa ei kuitenkaan useinkaan onnistuta niin hyvin, että kaikki versot lähtisivät kasvuun. Jotta aikaansaadaan toimiva viljelmä voi riittää, että yksi aloitusverso lähtee kasvuun ja siitä saadaan monistettua uutta kasvustoa. (George, Hall, De Klerk 2008, 33-34).

Mikrolisäysviljelmän aloitusvaiheen työstä käytetään termiä aloitus. Aloitus käsittää suunnitteluvaiheen, versojen työstön ja joissakin tilanteissa aloituksesta puhutaan myös nimittäen siten kasvamaan laitettuja versonpaloja eli tulevaa viljelmää. Myöhemmin mikrolisäysviljelmän aloitusvaiheen työstä puhutaan käsitteellä aloitus.

### 3.1 Emokasvi ja aloitusmateriaali

Emokasvi toimii mikrolisäysviljelmää aloitettaessa lisäysprojektin alkupe-  
räisenä yksilönä eli kasvina, josta otetaan materiaalia aloitukseen. Emokas-  
vin valintaan tulee kiinnittää huomiota ei vain iän puolesta, vaan kokonai-  
suutena. Emokasvin ominaisuus, jonka vuoksi se halutaan monistaa, voi  
pahimmassa tapauksessa osoittautua virukseksi, joka aiheuttaa esimer-  
kiksi lamoavan kasvutavan ja ominaisuus saattaa hävitä kasvia monistetta-  
essa. Tämä on kuitenkin useimmiten puhdistettujen viljelmien ongelma,  
tavallisella steriloinnilla kasveista ei pystytä hävittämään kaikkia viruksia ja  
bakteereita, vaikka haluttaisiinkin. (Haapala & Niskanen 1992, 59).

Versot preparoidaan 2-3 cm mittaisiksi paloiksi (Dirr & Heuser 2006, 85).  
Mikrolisäysaloituksen onnistuminen tai epäonnistuminen riippuu usein  
emokasvin kunnosta (Bonga & Aderkas 1992, 55). Nuoremmat kasvit ylei-  
sesti monistuvat usein paremmin kuin vanhat (Haapala & Niskanen 1992,  
59). Kasvien fysiologinen tila kudoksessa muuttuu myös vuodenajan mu-  
kaan ja niihin vaikuttaa sen lisäksi sääololliset tekijät sekä sijainti kasvissa.  
Esimerkiksi elinympäristölliset olot vaikuttavat mikrobikontaminaatioiden  
määrään kasvimateriaalissa. (Bonga & Aderkas 1992, 55).

Kasvien kasvussa on selvä nuoruusvaihe, minkä aikana kasvi ei kuki eikä  
niiden fysiologinen tila ole samanlainen kuin vanhemmilla kasveilla. Mo-  
nistusmateriaalin valinnassa on tärkeää kiinnittää huomiota ikään. Jotkin  
pikkutaimet alkavat kasvaessaan käyttäytyä samaan tapaan kuin vanha  
kasvinosa, josta silmu on peräisin. Näin käyttäytyvät esimerkiksi vanhoista  
havupuista aloitettujen viljelmien pikkutaimet, ilmiötä kutsutaan pla-  
giotropiaksi. Jotkin kasvit sen sijaan pystyvät siirtymää jo kasvussa ohitet-  
tuihin vaiheisiin ja monistumaan kuten siementaimet. (Haapala & Niska-  
nen 1992, 58). Joillakin kasveilla nuoruusvaihe kestää pidempään kuin toi-  
silla, näin toteaa Ahuja (1993, s. 96). Vaikka vanhemmat kasvit yleensä ovat  
vaikeampia *in vitro* lisätä kuin nuoremmassa kasvun vaiheessa olevat sa-  
man lajin edustajat, tulevat vanhemmat kasvuyksilöt yleensä helpommin  
valituksi juuri niiden iän vuoksi. Iäkkäämpiä kasveja halutaan valita, koska  
ne ovat osoittaneet jo kasvunsa aikana pärjäävänsä. Näistä kasveista voi-  
daan käyttää lisäykseen nuoria kasvinosia (Bonga & Aderkas 1992, 95). Kui-  
tenkaan pelkkä ikä ei kerro kaikkea. On paljon kasvuyksilöstä riippuvaa,  
kuinka siitä leikattava materiaali lähtee kasvamaan *in vitro* lisäyksessä  
(Ahuja 1993, 99). Bonga ja Aderkas kirjoittavat myös (1992, 96), että mik-  
rolisäysaloituksen onnistumiseen vaikuttaa lisäksi emokasvin puhti, vaikka  
kyseessä olisi helposti mikrolisättävä kasvi. Aloituksessa käytettävä mate-  
riaali tulee olla mahdollisimman nuorta solukkoa. Aloitukseen käytettävä  
materiaali löytyy mahdollisimman läheltä runkoa ja kasvin tyveä. (Bonga &  
Aderkas 1992, 97).

lältään vanhempien emokasvien kanssa varttaminen helpottaa toisinaan  
viljelmän alkuunlähtöä, silloin on kuitenkin ehdottoman tärkeää aloittaa  
viljelämä vartteesta (Haapala & Niskanen 1992, 58). Vanhemmista kasveista

voidaan käyttää myös juurivesoja useimpien puuvartisten kasvien kohdalla (Bonga & Aderkas 1992, 97. Vanhemmilla kasveilla myös tyvi- tai kantove-soista aloittamalla viljelmä voidaan saada aikaan helpommin kasvuun läh-tevä viljelmä (Bonga & Aderkas 1992, 97. Riikonen (2003, 7) kertoo tutki-muksessaan myös aktiivisessa kasvussa olevan verson olevan useammin parempi valinta mikroviljelmän aloitusmateriaaliksi kuin lepotilassa oleva silmu. Lisäykseen otettavan silmun tilaa kannattaa miettiä erityisesti sil-loin, jos viljelmän aloitus ei onnistu ensimmäisellä kerralla.

### 3.2 Aloitusajankohta

Useimmilla kasveilla mikroviljelmien aloittamiseen paras aika on aikainen kevät (Haapala & Niskanen 1992, 59). Kevät on suotuisa aika aloittamiselle, koska kasvit ja siten myös silmut heräävät talven jälkeen horroksesta ja talvi on tappanut suurimman osan taudeista ja muut haittatekijät, jotka saattavat viljelyn edetessä aiheuttaa viljelmän infektoitumisen. Mikrobien elinoloissa pitää olla sopivassa suhteessa lämpöä, ravintoa ja kosteutta sekä happea ja happamuutta. Mikrobit voivat lisääntyä kaukana optimikas-vuoloista, mutta niiden toiminta hidastuu, kun jokin niiden toimintaa vai-kuttavista asioista jää kokonaan pois tai on kauempana optimista. Parhai-ten mikrobien kasvuun voidaan vaikuttaa lämpötilan kautta. (Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, 2017). Kesän kuumuus ja kosteus saa-vat aikaan mikrobien kasvun, ne ovat haitaksi mikrolisäsaloitukselle.

Steriloinnin voimakkuuden tulee olla suurempi kostean ja lämpimän sään aikaan (Haapala & Niskanen 1992, 59), tällä on vaikutusta pintasteriloinnin suunnittelussa ja toteutuksessa. Steriloinnin voimakkuus tarkoittaa steri-loinnissa käytettävän tekniikan kykyä puhdistaa kasvimateriaali. Voimak-kuuteen vaikuttavat sterilointiaine, sterilointiaineen vahvuus ja steriloin-nin kesto.

### 3.3 Kasvualusta

Mikrolisäyksessä esiintyy lukuisia muuttujia, jotka vaihtelevat kasvien ja jopa lajikkeiden välillä. Esimerkiksi kasvualustassa olevien ravinteiden, so-kerin ja pH:n suhde voi vaihdella runsaasti. Uusien viljelmien aloittami-ssa vaikeudeksi nouseekin sopivien suhteiden löytyminen ja jopa pienien erojen vaikutus.

Mari Hakala (2010) vertailee tekemässään opinnäytetyössä kirsikan eri la-jikkeiden mikrolisäsaloitusta. Opinnäytetyössä on vertailtu kolmea eri aloitus-alustaa kolmelle eri kirsikkalajikkeelle. Kirjallisuudessa esimerkiksi Durr ja Heuser (2006) kertovat valmiiksi erilaisille kasveille sopivista alus-toista. Kirjasta löytyy tietoa hapankirsikan (*Prunus cerasus*) mikrolisäyk-seen sopivasta alustasta ja steriloinnista. Tällaisia tietoja voidaan soveltaa

tehtäviin mikrolisäysaloiuksiin ja kokeilla eri alustojen toimivuutta. Soveltaminen vaatii usein kokeita ja toistoja, jolloin voidaan saada selville paras mahdollinen alusta. Eri lähteissä sterilointitekniikan osaset vaihtelevat.

### 3.4 Puhtaus mikrolaboratoriossa

Mikroviljelmien onnistuneen viljelyn edellytys on puhtaat, hyönteisvapaat tilat ja mahdollisimman hyvä puhtaus sienistä ja bakteeri-infektioista. Kontaminantit ovat usein peräisin kasvien sisältä, ulkoisista tekijöistä tai kasvin pinnalta. Kasvissa saattaa lymytä virus tai viljelmä saattaa alkaa näyttää huonolta jonkin ulkoisen tekijän vaikutuksesta, kuten esimerkiksi punkki-kontaminaation sattuessa voi käydä. Kasvualustat viljelypurkeissa tarjoavat oivat olosuhteet viljelmien lisäksi myös muille kasvustoille. (Haapala & Niskanen 1992, 33). Kun noudatetaan tarkkoja työskentelyohjeita ja pidetään tilat sekä välineet puhtaina, voidaan välttää kontaminaatioiden leviäminen. Saastunnat synnyttävät hävikkiä ja lisäävät työtä, koska kontaminoituneet viljelypurkit steriloidaan ja kasvustot, myös elossa olevat versot, tapetaan yleensä autoklavoinnilla.

Yksi suurimmista riskeistä mikrolisäyksen kannalta on työntekijä. Työntekijän mukana laboratoriotiloihin saattaa kulkeutua bakteereita, hyönteisiä tai likaa. Henkilökunnan perusteellinen kouluttaminen ja perehdyttäminen pyrkii estämään mikrobisaastunnat työntekijöistä viljelmiin. Työntekijöiden osaaminen on myös suuressa roolissa, sillä mitä aiemmin kontaminaatiot pystytään huomaamaan ja poistamaan, sitä paremmin ne pysyvät kurissa ja ennaltaehkäistynä. (Uosukainen 1997, 9-11).

Bakteerikontaminantit aiheuttavat mikrolisäyslaboratorioissa infektioita. Niiden on todettu leviävän työvälineiden kautta viljelmästä toiseen. Välineiden puhdistamisessa suurin leviämiseen vaikuttava syy on puhdistuksessa käytetty etanoli ja liian nopea liekitys tai muun steriloinnin kesto ja riittämättömyys. (Boxus & Terzi 1987, 91-93).

Vanhoissa viljelmissä saattaa esiintyä ja ne voivat oirehtia piilevien kontaminanttien vuoksi. Piilevät kontaminantit aiheuttavat kasvun heikkene mistä ja saattavat jopa tappa viljelmiä sekä aiheuttaa nekroosia ja vaikuttaa juurtumiseen (Uosukainen 1997, 12).

Aseptinen työskentely on avainasemassa mikrolisäysviljelmien kanssa työskentelyssä aina viljelmän aloittamisesta lähtien. Puhtaus on muistettava lähtökohtana kaikessa työskentelyssä.

### 3.5 Kasvatus

Dirr ja Heuser (2006, 85) neuvovat mikrolisäysaloiuksia kasvatettavaksi kylmän valkoisen loisteputkivalon alla 24 tuntia vuorokaudessa (100 – 300 lumenia neliölle). Lämpötila tulee heidän mukaansa asettaa 28-30 °C tietä-

mille. Vallitsevat olosuhteet vaikuttavat aloittamiseen aivan kuten kaikkien kasvuun yleensäkin. Mikrolisätyt kasvit ovat herkkiä kuivumiselle, sillä ne kasvavat hyvissä olosuhteissa kasvatuspurkissa. Kosteus lasipurkin sisällä on korkeampi kuin ulkopuolella, eikä lasipurkin sisällä vaikuta ilman liike, joka lisäisi kuivumista normaalisti. Kasvualusta viljelypurkeissa on myös suurimmaksi osaksi koostumukseltaan vettä. Optimaalisia kasvatusoloja ylläpidetään viljelyhuoneessa, jossa kasveja säilytetään aina aloitusvaiheesta juurrutukseen asti. Dirr ja Heuser (2006, 84-86) neuvovat pitämään viljelyhuoneen ovea kiinni vedon ja olosuhteiden vaihteluiden minimoimiseksi.

### 3.6 *Prunus cerasus* 'Suklaakirsikka' esimerkkikasvina

*Prunus*-sukuiset kasvit kuuluvat kooltaan isoon *Rosaceae*-heimoon. Maailmanlaajuisesti *Rosaceae*-heimoon kuuluu ainakin 130 sukua ja yhteensä yli 2000 lajia. *Prunus*-suku eli tuomikasvit on suurin *Rosaceae*-heimon suvuista ja se käsittää yli 200 lajia. *Prunus*-sukuun kuuluvat muun muassa erilaiset luumut ja kirsikat, aprikoosi, tuomet ja monenlaisia muita kasveja. Ruusukasvien heimoon kuuluu niin puu- kuin ruohovartisiakin lajeja ja joukosta löytyy runsaasti ihmisten hyödyntämiä ja jalostamia lajeja kuten marjoja ja esimerkiksi omenat (*Malus*). Suomessa taloudellisesti tuottavin ruusukasvien heimoon kuuluva laji on lakka (*Rubus chamaemorus*). (LuontoPortti, 2017).

Yleisesti hedelmäpuita, kuten myös kirsikoita, voidaan lisätä juurivesoista, jos kyseessä on jalojuurinen lajike, sekä jalontamalla eli varrentamalla tai silmuttamalla ja mikrolisäyksellä eli solukkolisäyksen keinoin sekä siemenestä kasvattamalla. Yleensä lisäystapana käytetään silmuttamista ja varttamista (Hakala 2010, 8) sekä mikrolisäystä. Esimerkkinä kirsikan mikrolisäysviljelmän aloittamisesta voidaan mainita Mari Hakalan (2010) toteuttama opinnäytetyö, jossa aloitetaan kolme eri kirsikkalajiketta: Nordia, Kirsa ja Pernilla, sekä vertaillaan eri sterilointeja ja aloitusaloitustoja. Tällaisesta työstä saadaan helposti vinkkejä aloituksen tekemiseen ja voidaan huomioida epäonnistuneet kohdat ja hyväksikäyttää onnistumiset aloitusta tehtäessä. Muitakin vastaavan kaltaisia mikrolisäysaloituksia on tehty ja opinnäytetöiden joukosta löytyy useiden eri kasvien aloituksia. Kirsikan sanotaan olevan joskus jopa hankala kasvi mikrolisättäväksi (Hartmann, Kester, Davies & Geneve 2014, 722).

*Prunus cerasus* 'Chokoladnaja' eli Suklaakirsikka kasvatetaan usein pensasmaiseksi, mutta myös pieniä puumaisia Suklaakirsikkapuita tuotetaan. Suklaakirsikka kasvaa tavallisesti pyöreähköksi ja 150–200 cm korkeaksi ja se on kotoisin Baltian maista ja Venäjältä (Kinnalan Taimisto Oy, 2017). Satoa saadaan Suklaakirsikasta nopeasti, jopa 1–2 vuoden kuluttua istutuksesta (Blomqvist 2011, 228). Suklaakirsikkaa voidaan kasvattaa vyöhykkeillä I-IV(V) (Kinnalan Taimisto Oy, 2017). Suklaakirsikka on suosittu sen hyvän talvenkestävyyden takia (Blomqvist 2011, 228).

Marjat ovat luumarjoja, joiden väri on tumman punainen ja mehu on myös tummaa. Suklaakirsikka on morellityyppinen kirsikka ja, kuten morellikirsikoille tyypillistä, se on itsepölytteinen. Maultaan marja on miellyttävä, hapanimelä ja manteliin vivahtava. Suklaakirsikka sopii suoraan puusta syötäväksi, viineihin ja mehuihin sekä leivontaan. (Blomqvist 2011, 228).

#### 4 CASE: SUKLAAKIRSIKKAVILJELMÄN ALOITTAMINEN

Entinen Saarioisten taimistot Oy eli nykyinen Kinnalan Taimisto halusi luoda omiin tarpeisiinsa mikroviljelmien aloittamiskäytännöt. Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda toimivalle mikrolisäyslaboratoriolle kattava opas mikrolisäysviljelmien perustamista varten. Työn aikana kartoitettiin millaisia ongelmia voidaan kohdata viljelmiä aloitettaessa ja yritettiin löytää niihin ratkaisu, jotta jokaisella perustamiskerralla ei tarvitsisi kohdata samoja ongelmia. Ohjeet haluttiin luoda laboratoriolle myös perehdyttämistarkoitukseen ja opetustarkoitukseen, jotta tulevaisuudessa uudet työntekijät voivat tehdä aloituksia ohjeiden avulla. Ohjeistuksella pyritään luomaan työturvallisuuden kannalta riittävän kattava paketti siitä, mikä voi mennä vikaan aloituksia tehdessä ja kiinnittää ohjeistuksessa huomiota näihin seikkoihin. Mikrolisäysaloitusten tekemisestä kertova opas, joka valmistui tässä opinnäytetyössä, tulee käyttöön uusia työntekijöitä perehdytettäessä aloitusten tekemiseen. Vanhemmat työntekijät käyttävät tulevaisuudessa opasta muistin tukena ja apuna eri työvaiheiden tekemisessä. Oppaan tarkoitus on kuvata tapa tehdä mikrolisäysaloitus niin tarkasti ja yksityiskohtaisesti, että aloitus on mahdollista toteuttaa oppaan ohjeiden perusteella. Oppaan työselosteet ja välineluettelot sekä muistutukset työhön liittyvistä seikoista, joita tulee huomioida, on laadittu sillä ajatuksella, ettei jokaisella aloituskerralla tarvitse erikseen kuluttaa aikaa välineiden valmistelun miettimiseen ja pystytään ottamaan huomioon kaikki tarvittava. Ajankäyttö tehostuu, kun voidaan ottaa valmis välinelista ja seurata oppaan työohjeiden vaihekuvauksia ja kuvia.

Ohjeistuksen tekemisen tueksi perustettiin mikroviljelmä *Prunus cerasus* 'Suklaakirsikasta'. Taimiston käytössä on toiminut aiemminkin Suklaakirsikkaviljelmä, mutta viljelmä haluttiin uusia laboratorion käyttöön sen vanhan iän vuoksi ja monistamisen edistämiseksi. Viljelmien uudistaminen on välttämätöntä ja järkevää toiminnan kustannustehokkuuden kannalta. Taimistotuotannon on oltava kilpailukykyistä ja tehokkaaseen tuottamiseen on siten panostettava monella tasolla. Viljelmän perustamisesta saatiin käytännön tietoa toteutuksesta ja työvaiheista. Sitä kautta voitiin todeta, toimiiko teorian tasolla valittu aloittamistapa laboratoriossa käytännön osalta.

Tavoitteeksi asetettiin saada aloituksesta kasvavia versoja, jotta niistä voitaisiin monistaa lisää kasvimassaa ja saada lopulta aikaan toimiva viljelmä.



Toimiva viljelmä tarkoittaa yleensä parempaa monistuserrointa, mikä antaa mahdollisuuden suurempien massojen viljelemiseen. Näin pystytään vastaamaan kysyntään tehokkaasti. Kaupallisten mikrolisäyslaboratorioiden kalliiksikin sanotun toiminnan on tuotettava ja toiminnalla on pystytävä tuottamaan kasveja mahdollisimman kustannustehokkaasti. Mikrolaboratorion kallein osa on työ, mikrolisäys. Työn kustannuksiin voidaan vaikuttaa kouluttamalla työntekijöitä, osaava henkilökunta ei hukkaa aikaa vaan työt tehdään siten ajankäytöllisesti viisaasti.

Yrityksen mikrolisäyslaboratorion tuotannossa on ollut Suklaakirsikkaa jo vuodesta 2010. Viljelmä on saanut alkunsa Pälkäneellä taimiston omasta aloituksesta ja sitä on monistettu siitä lähtien. Viljelmä ei ole enää viimeisimpinä vuosina toiminut niin hyvin kuin olisi toivottu ja halutuissa tuotantomäärissä on jääty jonkin aikaa alle suunnitellun määrän. Mikroviljelmiä tulee tarkkailla säännöllisesti monistuskertoimen ja taimien laadun kautta, jotta voidaan tarvittaessa uusia viljelmä ennen kuin se alkaa monistua niin huonosti, ettei se ole enää tuotannollisesti kannattava. Tuotannon kannattavuutta pidetään yhtenä tärkeänä tekijänä perustaa viljelmä Suklaakirsikasta, siten voidaan taata elinvoimaisen viljelmän ylläpysyminen ja monistuminen ja sitä kautta vaikutetaan myös työn tehokkuuteen, koska elinvoimaista viljelmää on helpompi monistaa. Elinvoimaisen viljelmän parempi monistuminen näkyy monistuskirjanpidossa, josta voidaan tarkkailla monistuskertoimia, mitkä kertovat hiljalleen hiipuvasta monistustahdistusta viljelmien vanhetessa.

#### 4.1 Projektin suunnittelu ja toteutus

Projektin suunnittelu sai alkunsa keväällä 2017 yrityksen toiminnan kehityksessä heränneestä tarpeesta. Kinnalan Taimisto halusi itse alkaa teemmään mikrolisäysviljelmistä aloituksia. Näin päästäisiin turvaamaan viljelmien saatavuus ja mahdollinen viljelmien uusiminen tulisi siten myös kyseeseen. Kinnalan Taimiston toive oli, että pystyttäisiin luomaan mikrolisäysaloitusten tekemistä tukeva ja siihen perehdyttävä toimintamalli ja kirjallinen ohjepaketti. Lisäksi haluttiin laaja kuvallinen otos siitä, mitä käytäntöjä luodessa tehtiin sekä kuvasarja tukemaan tulevaisuudessa tehtäviä aloituksia. Tehtävästä kehitystyöstä sovittiin yrityksen kanssa keskustellen.

##### 4.1.1 Viljelmän aloittamisen ajankohta

Mikroviljelmän aloitusajankohdaksi valikoitui kesä, tarkemmin elokuu, koska se oli taimistolla laboratoriossa vähiten kiireistä aikaa vuoden syklissä. Koska tarkoituksena oli luoda ohjeet aloittamiselle, kouluttaa henkilökunta aloittamisprosessiin ja tietenkin luoda toimiva viljelmä, oli kesä aloittamisajankohtana sopivin ajankäytön kannalta. Viljelmää suunniteltaessa tiedostettiin ulkoiset riskitekijät emokasvissa, jota ei suojannut tuho-

laisilta talven pakkaneen tai kevään sisätiloissa tapahtuvassa hyödössä nopeasti kasvavan verson mahdollisesti vähäisempi kosketus ulkoisiin tekijöihin.

Vuoden 2017 kesä oli sääoloiltaan runsaan sateinen ja viileä. Kesän kuumat ilmat eivät oikeastaan olleet vielä ehtineet alkaa viljelmää aloitettaessa, vaikka syksy olikin melkein koittanut. Tämä nähtiin eduksi viljelmiä aloitettaessa, koska bakteerikanta kasvaa kasveissa sekä ilmassa lämpimän ilman seurauksena.

Viljelmien aloittamisen ajankohtaa ei haluttu siirtää myöhemmäksi, sillä kasvuun lähteneet versot olisivat saattaneet olla liian puutuneita. Liian puutuneista versoista aloittaminen on hankalampaa kasvin solukon fysiologisen tilan vuoksi. Aloituksen ajankohdan valikoiduttua versojen kasvun ja laboratorion toiminnalle sopivan ajankohdan mukaan suoritettiin aloitukset suunnitellusti.

Koko aloitusten tekemisprosessin ajan kirjattiin ylös muistiinpanoja ja kuvattiin tekemistä ja välineitä muistin tukemiseksi sekä laadittavia ohjeistuksia silmällä pitäen. Muistiin kirjattiin tiedot myös yrityksen oman aloitusraportin mukaan.

#### 4.1.2 Suunnittelu

Aloituksen onnistumisen kannalta merkityksellistä on sterilointitapa sekä aloitusalue. Näiden kahden asian selvittäminen vie eniten aikaa suunnittelussa. Ennakoon selvitetään mahdollisesti jo kokeiltuja aloitusalueita ja sterilointeja. Onnistuneen mikrolisäysviljelmän aikaansaamiseksi tulee selvittää myös monistus ja juurrutusalue aloitettavalle viljelmälle, tässä työssä keskitytään kuitenkin vain aloittamiseen. Tietoa erilaisista alustoista voidaan löytää mikrolisäyksestä kertovasta kirjallisuudesta, samoin steriloinneista löytyy erilaisia variaatioita internetistä ja kirjallisuudesta.

Suunnittelutyö ei löytänyt täysin lopullista muotoaan ennen kuin vasta kun aloitusviljelmät oltiin jo tehty. Ohjeistuksen muotoa mietittiin pitkään ja pohdittiin sen laajuuden tarpeellisuutta. Osana toteutusta tehtävä ohjeistus aloitusten tekemisestä ja siihen liittyvistä käytännöistä sekä tärkeiksi ja olennaisiksi koetuista seikoista päättyi lopulta muototutumaan opastypiksi. Lisäksi oppaassa kuvataan sterilointivaiheen työtä tarkasti, mutta joissakin muissa kohdissa vähemmän tarkasti niiden vaihtelevuuden ja muuttuvien tekijöiden takia.

#### 4.1.3 Aloitusmateriaalin valitseminen

Lisäysmateriaali opinnäytetyön mikrolisäysviljelmän aloittamiseen saatiin Kinnalan Taimiston astiataimesta. Emokasviksi valikoitui nuori astiataimi. Muut saatavilla olleen Suklaakirsikan emot olivat iältään vanhempia ja

tästä syystä päädyttiin valitsemaan nuori tervekasvuinen ja tyyppillinen Suklaakirsikan taimi. Taimi saatiin Kinnalan Taimiston omasta tuotannosta ja aloitusmateriaali kerättiin taimiston alueella olevalta kasvatuskentältä, jossa viljellään astiataimia tippukastelujärjestelmässä.

Aloitusmateriaaliksi valittiin nuorta kasvustoa, koska aloitusmateriaalin tulee aina kun mahdollista olla mahdollisimman hyväkuntoista. Koska kyseessä oli nuori taimi, voitiin suurin osa kasvavien versojen latvaosista käyttää aloituksen tekemiseen. Nuorta taimea päädyttiin käyttämään sen iän takia, sillä sen iän takia altistuminen ulkoisille haitoille ja saasteille on pienempi. Aloitusmateriaaliksi leikattiin aktiivisesti kasvavia versojen kärkiä. Aloitusmateriaaliksi parhaiten kelpaava materiaali löytyy mahdollisimman läheltä runkoa ja kasvin tyveä. Puutumattomat kasvin osat lähtevät parhaiten kasvuun. Aloitukseen käytetyt versot leikattiin saksien avulla astiataimesta taimimaalla. Leikkaamisessa huomioitiin silmujen paikat ja leikkaus suoritettiin varoen vaurioittamasta kasvia enempää kuin on tarve.

Kasvimateriaali aloitusta varten voidaan kerätä mihin aikaan vuodesta tahansa, mutta useiden kasvien aloittaminen onnistuu parhaiten jo kasvuun lähteneistä silmuista keväällä tai horroksessa olevista silmuista talvella tai aikaisin keväällä. Koska tämän viljelmän aloittamisen ajankohta on kasvavien versojen aikaa, ei versoja tarvitse hyötää.

#### 4.1.4 Aloituksessa käytettävien alustojen valitseminen

Kinnalan Taimiston alustareseptivalikoimasta löytyy valmiina aloitusaluustoja, jotka ovat olleet käytössä aiemmin tehdyissä aloituksissa eri kasveille. Aiemmin aloitettujen kasvien joukossa on myös Suklaakirsikka. Työssä päädyttiin vertailemaan kahta eri aloitusalustaa, jotka olivat aiemmin olleet kirsikka-aloitukissa mukana Kinnalan mikrolisäyslaboratoriossa. Vertailu päädyttiin suorittamaan, sillä heikon kirjanpidon ja muistiinpanojen puuttumisen vuoksi ei ollut tiedossa kumpi alustoista toimii ja miksi ne oli aiemmin valittu. Olemassa olevista raporteista kuitenkin nähtiin, että alustoille tehdyistä aloituksista oli lähtenyt versoja kasvuun ainakin alkuun.

Aloitusaluustoiksi valikoitui MS-alusta, Wa-alusta ja RV2-alusta. MS-pohjainen alusta on perusreseptiltään löydettävissä verkosta, sillä se on yksi tunnetuimmista alustoista. Kaksi muuta alustareseptiä ovat alunperin tulleet Kinnalan Taimiston käyttöön Luonnonvarakeskuksen Laukaan yksikön mikrolisäyslaboratoriosta. MS-pohjaista alustaa käytetään Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa aloitusalustana ja verrokkina Kinnalan Taimistolla käytetty WA-alusta. Kolmantena alustana mukaan otettiin RV2-alusta, koska haluttiin nähdä kasvin käyttäytyminen tällä alustalla ja tätä alustaa oli valmiiksi koeputkissa tehtynä. Kaikki kolme alustaa nähtiin sopiviksi ravinteiltaan kirsikalle aloitusvaiheessa.

#### 4.1.5 Sterilointi

Steriloinnilla pyritään poistamaan kasvien pinnalla eläviä bakteereita, tuholaisia, hiivoja sekä lahottajasieniä eli saprofyttisiä sieniä (Uosukainen, 1997, s. 9). Sterilointi on välttämätön, sillä kasvin pinta on puhdistettava, jotta pinnalla olevat kasvustot eivät pääse kasvamaan viljelyn alkaessa koeputkissa. Poistettavat tekijät saattavat kasvin pinnalle jäädessään aiheuttaa aloitusmateriaalin tuhoutumisen. Sterilointi tarkoittaa mikrobeista puhdistettua ja tähän steriloinnilla myös pyritään. Pintasterilointi on tärkeää, sillä yleensä kasvin pinnalla olevat sienet ja bakteerit kasvavat aloitusversoa rajummin ja valtaavat tilan hukuttaen sen. Lisäksi aloitusverso ja tällaiset kasvustot kilpailevat alustan ravinteista ja muodostavat myrkyllisiä aineita. (Dirr & Heuser 2006, 81). Aloituksen onnistumista voidaan mitata aloitettujen puhtaina pysyneiden koeputkien määrällä. Mikrolisäyviljelmän aloitusta voidaan pitää onnistuneena, jos 10 % koeputkista pysyy puhtaina aloitettujen putkien kokonaismäärästä. 30 % puhtaina pysyneitä aloitettuja koeputkia kokonaismäärästä voidaan todeta onnistuneen erinomaisesti. (Leppäkoski, 2018).

Sterilointitapoja on useita ja niissä esiintyy vaihtelua aina tekotavan, aineiden vahvuuden kuin vaiheiden ja työjärjestyksenkin suhteen. Dirr ja Heuser (2006, 82) ovat luetelleet useita erilaisia aineita, joita voidaan käyttää steriloinnissa. He esittävät myös sopivia käsittelyaikoja riippuen aineesta ja sen vahvuudesta. Luetelluista aineista tavallisimmin törmää 70 % etanoliin ja natriumhypokloriittiin eri vahvuisina liuoksina. Myös käsittelyajoissa on eroja.

Steriloinnin toimivuuteen vaikuttaa suuresti kasvin pinnan rakenteelliset seikat. Sterilointitapaa valitessa tulee ottaa huomioon kasvin ominaisuudet ja sen kyky kestää sterilointia. Jotkut sterilointikäsitteletyt tehoavat mikrobeihin huomattavasti nopeammin ja toiset ovat jopa niin voimakkaita, että steriloitava kasvi tuhoutuu käsittelyssä. Kasvimateriaali kuluu yleensä aina sterilointikäsitteilyssä jonkin verran, steriloinnin ei kuitenkaan ole tarkoitus tappaa kuin pinnalta ei haluttu mikro-organismeja. Jos kasvimateriaali kuolee pintakäsittelyssä, tulee sterilointiaikaan tai sterilointiaineen pitoisuuteen tehdä muutoksia. Jokaiselle aloitukselle pyritään tekemään optimaalinen puhdistus, joka tappaa bakteerit, mutta ei ole liian tehokas. (Dirr & Heuser 2006, 81-82). Aloitusmateriaaliksi valitaan nuorta kasvustoa myös steriloinnin helpottamiseksi. Nuoremmat kasvinosat ovat helpommin puhdistettavissa steriloinnilla, sillä niissä on vähemmän mikro-organismeja kasvin pinnalla (Uosukainen 1997,2-4).

Sterilointimenetelmä opinnäytetyöhön valikoitui pitkälti sen mukaan, mitä aineita ja välineitä oli saatavilla ja siten päättelemällä millainen sterilointi voitaisiin tehdä. Lisäksi tiedossa oli jo aiemmin yrityksen tiloissa käytetty sterilointiprosessi ja tätä päätettiin käyttää sovelletusti. Pintasterilointiin käytettävää kemikaalia valittaessa on hyvä pitää mielessä lähdekritiikki ja huomioida terveysvaikutukset, sillä osa mikrolisäyksen kirjallisuudesta on

ajalta, jolloin esimerkiksi elohopeaa ei pidetty kovinkaan vaarallisena. Dirr:n ja Heuserin (2006, 82) mukaan elohopeakloridi toimii sterilointiaineena, eikä kirjassa varoitella tämän tai muiden aineiden kohdalla niiden vaarallisuudesta, vaikka kirja on vuodelta 2006.

Tehty sterilointi pääpiirteittäin:

1. Versojen pesu hammasharjalla juoksevan veden alla
2. Saippuapesu 10 minuuttia magneettisekoittajassa sekoittaen: 3 tippaa / 100 ml ioninvaihtovettä
3. Versot huuhdellaan lävikössä ioninvaihtovedellä
4. Versot käsitellään 70 % Etax:lla 30 sekuntia
5. Huuhdellaan yhden kerran steriilissä ioninvaihtovedessä
6. Steriloidaan versot 1 % NaOCl (natriumhypokloriitti) + Tween20 3 tippaa / 100 ml steriloitua ioninvaihtovettä 10-15 minuuttia
7. Versot huuhdellaan 4 kertaa steriloidussa ioninvaihtovedessä: 1, 2, 5 ja 10 minuuttia.

Jatkuvalla tarkkailulla steriloinnin jälkeen pystytään huomaamaan pintakäsittelyn riittämättömyys, sillä hyvinkin nopeasti vakavat ripeästi kasvavat, perustamisen jälkeiset kasvustot alkavat vallata alaa paljastaen sisäiset ja piilevät kontaminaatiot (Uosukainen 1997, 9). Jotta aikaansaadaan riittävä sterilointi, hypokloriitin pitoisuutta ja liottamiseen käytettävää aikaa säätämällä voidaan tehdä helposti muutoksia sterilointiin optimaalisen tuloksen aikaansaamiseksi (Dirr & Heuser 2006, 82).

#### 4.2 Työn toteutus

Suklaakirsikkaviljelmän aloitus tehtiin Kinnalan Taimiston mikrolaboratoriossa kolmena eri päivänä. Aloitusmateriaali kerättiin ennen jokaista aloituserää: 3.8., 23.8. ja 6.9. vuonna 2017. Työn seuranta jatkui lokakuun loppuun asti, jonka jälkeen seurantaa tehtiin ilman kirjanpitoa vähäisten infektioiden ilmaantumisten takia. Tiedonhankintaan käytettiin ensisijaisesti taimiston omia muistiinpanoja. Tietoa aloituksen alulle laittamiseksi saatiin aloitusraporteista, joita löytyi useita kappaleita. Aloitusraporttien huonojen muistiinpanojen vuoksi tietoa haettiin myös kirjallisuudesta, jota on käytetty myös tämän opinnäytetyön tekemisessä ja kirjallisuus mainitaan lähteissä.

Työ toteutettiin Kinnalan Taimistolla olevia ohjeita noudattaen ja suunnitelmassa pysytellen. Työn aikana pyrittiin dokumentoimaan kuvaamalla ja muistiinpanoja tekemällä työhön liittyviä seikkoja ja vaiheita, jotta ohjeituksen ja käytäntöjen luominen olisi helpompaa ja näihin materiaaleihin voitaisiin tallentaa käytännön työtä malliksi.

Materiaalia kerättiin noin 130 cm korkeasta taimesta, jossa oli runsaasti oksia. Taimi kasvoi kahden litran ruukussa Kinnalan Taimiston rannassa si-

jaitsevalla kasvatusalueella. Yksilö valikoitui useista taimista sen hyvän kasvukunnon ja terveyden vuoksi. Lisäksi nuorella kasvilla odotettiin olevan vähemmän viruksia tai tauteja, joista olisi haittaa aloitukselle. Runsasta haaraista kasvua pidettiin myös elinvoimaisuuden merkinä ja haaroista toivottiin saatavan mahdollisimman hyvin materiaalia kerättyä aloitusta varten.

Ennen varsinaisia päiviä, jolloin aloitukset tehtiin, valmisteltiin aiempina päivinä välineet ja tarvittavat astiat aloituksia varten. Lisäksi tarkastettiin tarvittavien aineiden saatavuus. Alustat valmistettiin viikko etukäteen reseptien mukaan, ja koeputkiin jaettu sekä autoklavoitu alusta laitettiin kylmiöön säilöön koeputkitelineissä. Kahta alustoista valmistettiin ensin ja seuraavan viikon kuluttua kolmatta alustaa tehtiin erä. Näin ollen kaikkiin aloituseriin käytettiin yhtä alustaa jokaisella kerralla (Wa), yhtä alustaa vain yhteen aloituskertaan (RV2) ja kolmatta alustaa (WMP) käytettiin kahdella kerralla. Alustojen jakautumista tasaisesti aloitusten kesken ei pidetty merkityksellisenä; aloituksen koeosuus tehtiin pääasiassa Kinnalan Taimiston käyttöön. Kokeesta ei odotettu saatavaksi tuloksia. Alustojen lisäksi valmisteltiin välineistö sterilioimalla ne lämpökaapissa; tarvittavasta välineistöstä löytyy listaus tästä opinnäytetyöstä. Ennen aloitusmateriaalin leikkaamista valmisteltiin laminaarikaappi ja otettiin esille tarvittavat välineet sekä alustat ja aineet.

Laminaarikaapin sisällä työskentelyn helpottamiseksi astioiden foliokansiin merkittiin numerot ja tekstit, mitä aineita niihin tulee steriloinnin eri vaiheissa. Kun välineet pyyhittiin alkoholilla laminaarikaappiin, valmistettiin työtä kaatamalla pieniin dekantterilaseihin steriloitua ioninvaihtovettä valmiiksi odottamaan.

Aloituspohja leikattiin emokasvista aina aamulla, kun laboratoriossa tehtävät valmistelut oli saatu tehtyä ja välineet valmisteltu. Aloitusmateriaalin keräämiseen käytettiin muovista mittakannua, joka oli puolillaan ioninvaihtovettä. Materiaali leikattiin saksilla irti emokasvista. Materiaalin leikkaamisessa noudatettiin harkintaa ja valittiin nuoria ja terveitä versoja aloitusmateriaaliksi. Leikattu materiaali asetettiin veteen imupinnat veteen päin.

Materiaali tuotiin taimiston laboratorion keittiötilaan ja versot huuhdeltiin juoksevan hanaveden alla. Keräykseen käytetty kannu ja saksit huuhdeltiin myös. Versoista poistettiin lehdet siten, että lehtiruodista jäi noin puolen sentin pätkä runkoon pystyyn. Kuljetusastia pyyhittiin 70 % Etax:lla laboratorioon siirrettäessä. Puhdistetut versot ja välineet kuljetettiin laboratorioon, jossa versot puhdistettiin irtoliasta vielä juoksevan hanaveden alla pehmeällä hammasharjalla pois päin silmuista harjaten. Harjatut versot leikattiin aloituspaloiksi. Pitkistä versoista leikataan saksilla tai leikkuulaudalla veitsellä sopivia. Pala leikataan silmun kohdalta, silmun ylä- ja alapuolelle jätetään vartta, joka suojaa silmua. Jätettävän varren pituus riippuu kasvusta, mittaamalla täytyy varata tilaa leikata kuollutta solukkoa steriloinnin

jälkeen. Suunnilleen kahden sentin kokoiset palaset, joissa hankasilmu jää palan keskelle, ovat sopivia.

Aloituspalat laitettiin dekantterilasiin, jossa on 100 ml ioninvaihtovettä ja kolme tippaa Erisept-saippuaa. Versonpalat siirrettiin dekantterilasissa magneettisekoittajalle, sekaan lisättiin magneettisauva. Versoja sekoitettiin 10 minuuttia, aikaa mitattiin ajanottokellolla. Sekoitettut aloituspalat huuhdeltiin siivilässä ioninvaihtovedellä. Palat kaadettiin siivilästä petrimaljalta, johon kaadettiin ioninvaihtovettä, kunnes versot peittyivät ja kansi suljettiin.

Suljettu petrimalja pyyhittiin laminaarivirtauskaappiin, kuten muutoinkin laminaarissa työskennellessä, rätkä kaadetaan 70 % Etax -liuos ja rätkällä pyyhittää kaikki laminaarikaapin sisään siirrettävät asiat. Samaan aikaan pyyhittiin alkoholilla myös ajanottokello laminaariin. Aloituspalat siirrettiin pinseteillä petrimaljalta pieneen dekantterilasiin, jossa valmiiksi steriloitua ioninvaihtovettä siten, että versot peittyvät.

Ajanottokello asetettiin ottamaan aikaa 30 sekuntia. Ison dekantterilasin pohjalle siirrettiin huuhdellut versot pinseteillä ja päälle kaadettiin 70 % alkoholi 150 ml. Versoja huljuteltiin 30 sekuntia, jonka jälkeen versot siirretään pieneen dekantterilasiin, johon on kaadettu ioninvaihtovettä. Foliokannet suljetaan dekantterilasien päällä aina kun työskentely loppuu.

Ison dekantterilasin pohjalle tiputettiin pipetillä Tween20:tä kolme tippaa / 100 ml. Ajanotto-kello asetettiin mittaamaan aikaan 10 minuuttia ja aloituspalat nosteltiin Tween20:n jälkeen dekantterilasiin ja alkoholilla pyyhitty magneettisauva nostetaan versojen päälle. Aloituspalojen, Tween20:nen ja magneettisauvan päälle kaadettiin natriumhypokloriittiliuos (1 %) 150 ml. Dekantterilasin foliokansi paineltiin tiiviisti takaisin astian päälle ja nostettiin astia magneettisekoittajalle ulos laminaarista. Palasia sekoitettiin 10 minuuttia. Ajan kuluessa valmisteltiin tarvittavia tavaroita valmiiksi laminaarikaappiin.

Dekantterilasi pyyhittiin etaxilla takaisin laminaarikaapin sisään noin puoli minuuttia ennen ajan loppumista. Kun aika päättyi, versot nosteltiin pinseteillä pieneen dekantterilasiin, jossa on valmiiksi kaadettuna steriloitua ioninvaihtovettä. Astian päälle asetettiin takaisin foliokansi ja kello asetettiin yhden minuutin päähän. Paloja sekoitettiin heiluttelemalla astiaa, kunnes versot lähtivät pyörimään astian pohjalla vedessä. Minuutin kuluttua aloituspalat siirrettiin pinseteillä seuraavaan pieneen dekantterilasiin, johon oli kaadettu valmiiksi steriloitua ioninvaihtovettä. Kello asetettiin kahden minuutin päähän ja foliokansi paineltiin paikoilleen. Versoja huljuteltiin, kunnes aika loppui, jonka jälkeen aloituspalat siirrettiin seuraavaan dekantterilasiin. Astiaa heiluteltiin kuten aiemmankin huuhtelun kohdalla. Tämän huuhtelun kestoksi asetettiin viisi minuuttia ja ajan päätyttyä materiaali siirrettiin jälleen pinseteillä seuraavaan huuhteluasiaan. Viimeisen

huuhtelun pituudeksi asetettiin 10 minuuttia ja samaa hujuttelua jatkettiin. Viimeisen huuhtelun 10 minuutin ajan kuluttua loppuun sterilointi oli valmis ja aloituspaloja alettiin siirrostaa petrimaljalla koeputkiin laitettavaksi.

Jokainen aloituspala nostettiin huuhteluvedestä yksi kerrallaan puhtaalle kertakäyttöpetrimaljalle. Steriloinnissa kuollut ja vaurioitunut solukko leikattiin pois veitsen ja pinsettien avulla. Leikatut palat asetettiin koeputkiin pystyyn pitkien pinsettien avulla. Koeputken suu liekitettiin ja koeputken korkin suu liekitettiin ennen paikalleen asettamista. Ensimmäisellä aloituskerralla käytössä oli vain foliotaitoksista tehtyjä korkkeja. Alustoissa säilytyksen ajan olleet foliokorkit poistettiin ennen versojen siirtämistä putkiin. Vanhojen foliokorkkien tilalle laitettiin uusi steriloitu foliotaitos korkiksi, kun verso oli asetettu putkeen. Taitoksen toiselta puolelta, joka sijoitettiin koeputken suulle, steriloitiin keskikohta liekittämällä. Foliotaitos painettiin paikoilleen putken suulle käsin, samalla pitäen kiinni pinsetillä foliotaitoksen reunasta. Puolet koeputkista saivat vielä ennen laminaarikaapista ulos siirtämistä foliotaitoksen paikallaan pitämisen varmistamiseksi ympärilleen parafilmiä. Parafilmirullasta leikattiin puolentoista sentin levyisiä suikaleita, jotka venytettiin koeputken ympärille foliokorkin ja koeputken yhteen sitomiseksi.

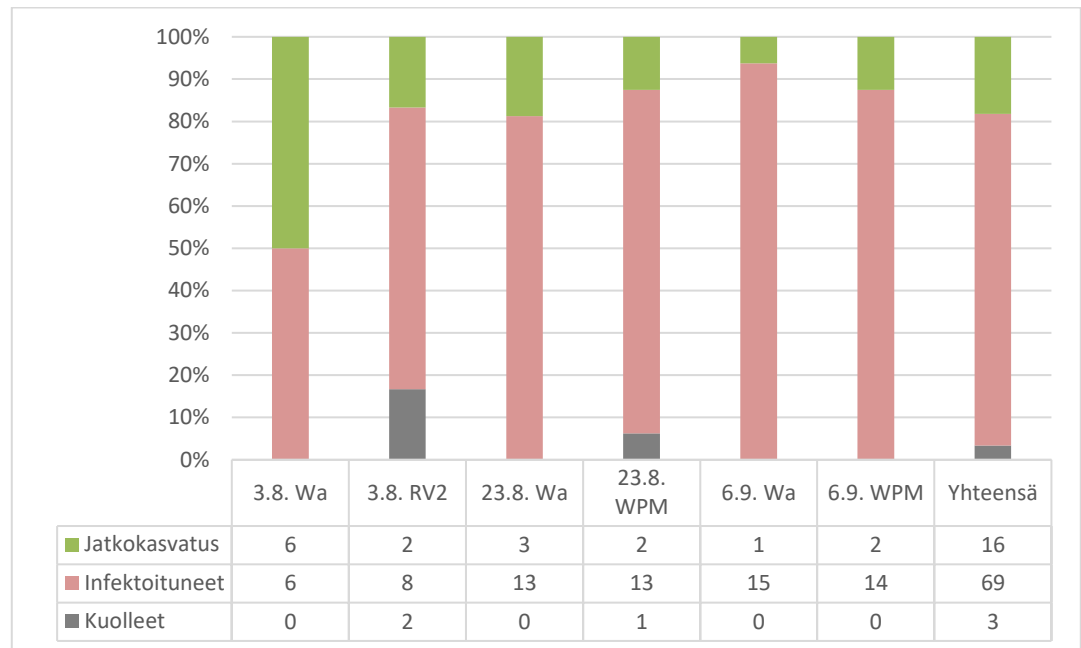
Jokaisella aloituskerralla noudatettiin samaa kaavaa ja työjärjestystä, kahdella viimeisellä kerralla käytössä oli koeputkiin sopivat muoviset korkit. Myös kahdella viimeisellä aloituskerralla puoleen koeputkien kokonaisuudesta kiedottiin korkkien ja koeputken ympärille parafilmiä. Koeputket merkittiin käyttäen tussia. Koeputken kylkeen kirjoitettiin aloituksen päivämäärä, kasvin koodi, alustan koodi ja alustan valmistuspäivä.

Työskennellessä noudatettiin normaaleja käytäntöjä välineiden ja käsien steriloinnin suhteen. Lisäksi kiinnitettiin huomiota vaatetukseen ja muuhun yleiseen puhtauteen. Muuttujana työssä voidaan mainita työntekijä, joka toimii jokaisella aloituskerralla hieman eri tavoin. Lisäksi aloituskertojen sääolot, ajankohdat sekä mittaamisessa ja punnitsemisessä olevat mahdolliset heitot ovat työn muuttujia, joilla saattaa olla vaikutus lopputulokseen.

Työvälineet pysyivät suurimmaksi osaksi samanlaisina työn alusta loppuun, välineet kuvataan liitteenä olevan oppaan selosteissa. Tulokset (Taulukko 1) on arvioitu silmämääräisesti ilman mittavälineistöjä. Kaikissa aloituksissa esiintyi suunnilleen yhtä paljon infektioita. Kaikissa alustoissa aloitus onnistui käytännön kannalta suhteellisen hyvin.



Taulukko 1. Suklaakirsikkaviljelmän aloitettujen versojen jakautuminen aloituspäivämäärittäin ja mikrolisäysaloitusalueittain jatkokasvatukseen päätyneiden, infektoituneiden ja kuolleiden versojen kesken.



#### 4.3 Tulosten tarkastelu

Suklaakirsikasta tehty aloitus oli hyvin onnistunut, vaikka infektoita ilmenikin runsaasti. Kaikkiaan 88 koeputkesta 69 kappaletta infektoitui. Vain hyvin pieni osa koko aloitusversojen määrästä kuoli, kokonaisuudessaan 3 kappaletta eli vain 3 prosenttia. Kaikista aloitusversoista 18 prosenttia eli 16 versoa 88 versosta pääsi jatkokasvatusvaiheeseen.

Steriloinnin onnistumista havainnoitiin ensimmäisen erän jälkeen, ja todettiin, että sterilointi ei ollut tappanut versoja ja infektioiden määrä pysyi kohtalaisena. Steriloinnin voimakkuus oli kasville sopiva. Aloitusalueelle siirrettyjä versoja havainnoitiin noin viikon kuluttua perustamisesta viikon välein siihen saakka, kunnes ne siirrettiin kasvamaan jatkokasvatusalueelle.

Työn tavoite oli selvittää sopivat menetelmät tehdä aloituksia Kinnalan Taimistolla ja samalla luoda toimiva viljelmä *Prunus cerasus* Suklaakirsikasta. Tavoitteessa onnistuttiin ja pystyttiin selvittämään hyvä tapa tehdä sterilointi ja mitä aloituksen tekeminen on käytännössä. Kartoitettiin tarvittavat välineet ja opittiin, mitä tietoa tai taitoa puuttuu mikrolisäysviljelmien aloittamiseen liittyen. Lisäksi tavoitteena oli luoda ohjeistus. Käytännön töiden kautta pystyttiin luomaan kattavat kuvalliset ohjeet ja näin tulevaisuudessa voidaan luottaa siihen, että mikrolisäysaloituksia tehtäessä aloitus-

vaiheentyöhön voidaan ottaa tukea ja kerrata vaiheita ohjeen avulla. Henkilökunta, joka toimi työn suorittajana perehtyi aloittamiseen laajasti ja siten myös koulutettiin henkilökuntaa, niin kuin yhdeksi tavoitteeksi asetettiin. Suklaakirsikasta onnistuttiin aloittamaan toimiva viljelmä ja

Ensimmäisellä aloituskerralla käytettiin foliotaitoskorkkeja ja parafilmiä. Foliokannet valmistettiin tavallisesta kotitalousfoliosta taittelemalla ja leikkaamalla noin 5 cm x 5 cm kaksinkertaiset palaset. Foliokannet steriloiittiin foliokääreen sisässä lämpökaapissa ja kääre pyyhittiin alkoholilla laminaariin, jossa kääre käärittiin pitämään taitoksia tarjolla pöydällä laminaarikaapissa. Muutoin foliokansien kanssa toimittiin, kuten muidenkin korkkien kanssa. Jos opinnäytetyön tarkoitus olisi ollut selvittää Suklaakirsikan viljelmän aloittamisen paras mahdollinen aloitustekniikka, olisi ollut järkevämpää käyttää samoja korkkeja jokaisella erällä, jotta muuttujat olisivat olleet pienempiä. Aloituserä, jossa käytettiin foliokansia, menestyi eristä parhaiten. Infektioiden määrä oli pienin ja versot kasvoivat hyvin. Syytä on vaikea sanoa, mutta erän onnistumiseen saattoivat vaikuttaa muun muassa aikaisin aloitusajankohta sekä juuri foliokansien käyttö.

Ensimmäisen aloituserän jälkeen Kinnalan Taimistolle saapuivat tilatut muoviset koeputkiin tarkoitetut korkit, jotka otettiin käyttöön toiseen aloituserään. Koska korkit eivät olleet kovinkaan tiiviin oloiset, päätettiin puoleen aloituksessa tehdyistä putkista laittaa varmistukseksi parafilmi korkin ja putken ympäri. Näin päästiin kokeilemaan korkkien tiiviyyttä ja parafilmin vaikutusta infektioiden määrään. Parafilmin käytöllä muovisten koeputkenkorkkien kanssa ei todettu olevan suurta vaikutusta infektioiden määrään. Kokeen otos todetaan kuitenkin liian pieneksi, jotta voitaisiin sanoa tarkasti sen merkityksellisyys.

Suuri osa jatkokasvatukseen siirtyneistä versoista (Taulukko 1) kuoli jatkokasvatuksen aikana tai niissä ilmeni infektioita. Lokakuun alussa (9.10.) tehdyssä siirrostuksessa elossa ja kasvussa oli vielä kuusi versoa. Versot olivat hyvässä kasvussa ja ne monistuvivatkin hyvin. Saadut tulokset tehdyistä kokeista Suklaakirsikalla eivät ole opinnäytetyön kannalta merkityksellisiä, sillä työn tavoitteena ei ollut kokeilla erilaisia sterilointeja tai tapoja aloittaa Suklaakirsikkaa, vaan selvittää käytännön työn kautta aloitusten tekemistä.

Työ vastaa kysymykseen, miten mikrolisäsviljelmien aloituksia tehdään, erittäin hyvin. Työn kautta saatiin paljon käytännön tietoa ja käytännön työn kautta laadittiin opas mikrolisäsaloitusten tekemisestä. Lisäksi selville saatiin, mitä ohjeita tarvitaan viljelmien aloittamista koskien. Opas on saanut rajauksensa juuri käytännön työn kautta tulleesta tiedosta ja tarpeesta, kaikki tarpeelliseksi koettu ohjeistus on kirjattu. Mikrolisäsaloitusten tehokkuutta on myös pohdittu ja pyritty löytämään ajankäytönkannalta tärkeitä apukeinoja esimerkiksi erilaisten listausten kautta oppaaseen. Koska alussa kysymykseksi heräsi, miten voidaan tehdä aloitus mahdollisimman tehokkaasti ja puhtaasti, oppaaseen kerättiin kädestä pitäen

läpi aloituksen vievät ohjeet. Ohjeita seuraamalla voidaan tehdä puhtaasti aloitus ja onnistua aloituksen tekemisessä, mikä lisää tehokkuutta. Vaikka aloituksia tehtäessä yleensä aina esiintyy infektioita ja syntyy hävikkiä, mikä on epätehokasta, pystytään järkevällä työskentelyllä ja virheiden välttämällä tehostamaan aloituksen tekemistä.

## 5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyö on tehty lähtökohtaisesti vastaamaan työelämän tarvetta, joten tutkimusongelman asetteleminen ei ollut haasteellista. Kinnalan Taimisto haluaa itse tuottaa viljelmien aloituksia eri kasveista omiin tarpeisiinsa. Oppaan laatiminen mahdollistaa aloitusten tekemisen ja palvelee samalla muissa tarkoituksissa yrityksen käytössä. Kun Kinnalan mikrolaboratoriossa on hyvä opas mikrolisäysaloitusten tekemiseen ja aloittamisen tekemisen käytännön työ opitaan, voidaan tuottaa aloituksia juuri sellaisista kasveista ja lajikkeista kuin halutaan. Oppaan muotoon tehty työ on suunniteltu vastaamaan työelämässä eteen tuleviin kysymyksiin ja antamaan tukea mikrolisäyksen aloitusvaiheen työhön. Opinnäytetyönä tehty opas on kokonaisuudessaan työelämää kehittävä, sillä sen tekeminen koulutti Kinnalan Taimiston henkilökuntaa ja mahdollistaa tiedon jakamisen tulevaisuudessa uusille työntekijöille. Viljelmien aloittamisen käytännön työ on dokumentoitu kuvina sekä kirjallisesti, joten henkilökunnan mahdollisesta vaihtumisesta huolimatta aloituksia pystytään tekemään oppaan avulla. Työntekijöiden kouluttaminen nousi esiin tärkeänä seikkana aloitusvaiheen opasta laadittaessa. Kun työ opitaan, voidaan sitä kautta vaikuttaa ajankäyttöön ja nopeuteen sekä vaikuttaa moniin muuttujiin aloitusprosessissa. Kouluttaminen aloitusprosessiin on tärkeää hyvän lopputuloksen aikaansaamiseksi.

Mikrolisäysviljelmien aloitusvaiheen opas on erittäin käytettävä ja sen hyödyntäminen käytännön töissä on helppoa kirjallisen ja kuvallisen ohjeistuksen vuoksi. Oppaan käyttäminen myös muissa mikrolisäyslaboratorioissa on mahdollista tiedon soveltamisen kautta. Työn tuloksena tehty opas soveltuu ammattimaiseen mikrolisäystuotantoon ohjeeksi aloitusten tekemiseen. Ohjeessa kuvataan eri työvaiheet tarkasti ja yksityiskohtaisesti tehdyssä järjestyksessä. Ongelmatilanteet ja epäkohdat ovat työntekijä-lähtöisesti selvitetty.

Kirsikan aloittamisesta löytyy useita aiemmin tehtyjä kokeita ja sen todetaan joissakin lähteissä olevan jopa hankala kasvi mikrolisättäväksi (Hartmann, Kester, Davies & Geneve 2014, 722). Tehdyn aloituksen kautta saatiin kuitenkin merkittävästi tietoa aloittamisen käytännön työstä ja töiden valmisteluista sekä välineistöstä. Opinnäytetyön kannalta aloitus onnistui erittäin hyvin. Aloituksesta saatiin kuvamateriaalia ja aloituksen tekemi-

nen mahdollisti käytäntöjen luomisen ja oppaan kirjoittamisen sen nykyiseen muotoon. Kirsikan aloittamisen vaikeudesta huolimatta käyttöön saatiin toimiva mikrolisäysviljelmä.

Aloituksen tekeminen Kinnalan Taimistolla johti välineistön päivittämiseen ja mikroviljelmien aloitusten tekemisen taitojen kehittymiseen. Taimiston mikrolisäyslaboratoriolla on nyt valmius tuottaa aloituksia eri kasveista ja lisätä kasveja omaan tuotantoonsa. Lisäksi opittiin mistä voidaan hakea tietoa aloitusten tekemiseen eri kasvien kohdalla. Oppaan tekeminen opetti, että aloitustekniikoita on monia ja toimiva viljelmä voidaan aikaansaada monella eri tavalla. Eri muuttujat aina työntekijästä sääoloihin vaikuttavat mikrolisäysaloituksen tekemiseen ja yhtä ainoaa oikeaa tapaa aloittaa mikrokasveja ei ole. Tiedonhankinnassa opinnäytetyössä etuna oli, että työtä toteutettaessa ei tekijällä ollut aiempaa kokemusta aloituksista. Tämän seikan vuoksi päästiin helposti kosketuksiin sellaisten kysymysten kanssa, joita ensikertalaisella on mikrolisäysviljelmän aloitusvaiheessa.

Mikrolisäysaloituksen tekeminen on työlästä ja vaatii runsaasti aikaa. Aikaa kuluu suunnitteluun, välineiden valmisteluun ja itse sterilointiin sekä vielä aloituksen jälkeen tarkkailuun. Kokonaisuudessaan prosessi vie työtunteja runsaasti, vaikka toisinaan kokonainen mikrolisäysaloitus saattaa infektoitua ja näin työn hyöty menee hukkaan. Koko prosessi osoitti, että suunnitteluun ja valmisteluun on kulutettava aikaa mahdollisimman hyvän lopputuloksen saamiseksi. Ajankäytön kannalta osoittautui erittäin järkeväksi koostaa opas ja kuvaus töistä. Ajankäytön tehostaminen mahdollistuu turhan työn minimoinnilla ja työtä tukevalla materiaalilla sekä välineistöllä. Ajankäyttöön voidaan kiinnittää enemmänkin huomiota, kun mikroviljelmien aloittamiseen liittyvät työt tulevat tutuiksi. Ajankäyttöön seikkoihin pystytään vaikuttamaan ennakkovalmisteluilla ja erilaisten mikrolisäysaloituksiin vaikuttavien asioiden huomioinnilla. Jos esimerkiksi emokasvin valinta on suoritettu huolimattomasti, voi koko viljelmän aloittamisen onnistuminen olla kiinni siitä; terveellä emolla on suuri vaikutus aloituksen onnistumiseen.

Tehokkaaseen tuottamiseen pyrittäessä tulee työnteen sujua sulavasti ja vaivattomasti. Töiden suunnitteleminen ennakkoon ja tilanteiden ennakoiminen ja siten myös varautuminen on osa tehokasta tuottamista. Kun versoviljelmän aloituksen tekeminen on suunniteltu valmiiksi tarpeeksi hyvin, voidaan tekohetkellä keskittyä vain hetkelliseen ajankäyttöön. Ajanhallintaa tulee miettiä koko ajan aloitusta tehdessä, sillä esimerkiksi työpäivän puitteissa tauot saattavat rajoittaa tai haitata tekemistä. Ajankäyttöön voidaan vaikuttaa järkevän työskentelyn kautta aina aloitusalan valmistamisesta ja työvälineiden valmisteleminen saakka. On järkevää valmistaa alustaa suurempia eriä kerralla ja välineitä useammalle viljelmien aloituskerralle samalla kertaa. Esimerkiksi aloitusalan valmistamisessa pieniä eriä valmistettaessa työtekniset seikat, kuten pH-säätö, vaikeutuvat. Suurempien erien kanssa työskentely on mittaamisen ja pH-säädön kannalta tehokasta ja helpompaa. Useita pieniä eriä valmistettaessa joudutaan valmistukseen käytettävää välineistöä puhdistamaan useita kertoja, kun taas

yhden suuremman erän kerralla tiskaamisen käytettävä aika kulutetaan vain kerran.

Ajankäytöllisesti sekä tehokkuuden kannalta on mielenkiintoista tietää paljonko mihinkäkin työvaiheeseen kuluu aikaa. Opinnäytetyötä tehtäessä kelloitettiin työskentelyn eri vaiheita, jotta voitaisiin miettiä teoreettisesti suurien viljelmien aloittamiseen kuluva aikaa. Työn kellottamiseen ei kuitenkaan ole päästy paneutumaan tämän opinnäytetyön tiimoilta. Kellottamisesta pääteltiin, että pienetkin seikat aloitustyön eri vaiheissa kuluttavat hyvinkin paljon aikaa. Esimerkiksi foliokansien käyttämisessä parafilmisui-kaleiden pyörittäminen koeputken ympärille kulutti aikaa huomattavasti enemmän kuin, mitä koeputkien korkittamiseen kului muovisia korkkeja käytettäessä.

Ensimmäisessä aloituserässä käytettiin foliotaitoskansia ja parafilmiä korkkeina. Folioiden taitteluun ja leikkaamiseen saatiin kulumaan hyvä tovi aikaa, sillä oikeita mittoja ei ollut tiedossa ennakkoon. Aikaa kului huomattavan paljon enemmän, kuin ennakoita kuviteltiin. Lisäksi foliokansien käyttämisessä kuluu paljon aikaa myös laminaarikaapissa työskennellessä. Kansien käyttö koettiin hitaaksi ja huomattiin, että foliota kuluu paljon vaikka hukkapaloja ei syntyisikään taitoksia valmisteltaessa. Kinnalan Taimistolle tilattiin muoviset koeputkiin sopivat korkit. Korkit todettiin helpoksi käyttää ja työskentely sujui varmemmin kuin foliotaitosten kanssa. Työskentelyvarmuus vähentää infektioriskiä ja mahdollistaa paremman onnistumisen mikrolisäysaloituksen tekemisessä. Muoviset koeputkien korkit todettiin kannattavaksi ostokseksi, sillä niitä voidaan käyttää pesun jälkeen aina uudelleen jatkossakin.

Työhön olisi voitu valita samat aloitusalueet jokaiselle aloituskerralle. Näin saadut tulokset olisivat olleet paljon enemmän vertailtavissa. Aloituksen ajankohta jäi suhteellisen myöhäiseen syksyyn. Kylmän kesän jälkeen tällä seikalla ei tuntunut olevan suurta merkitystä infektioiden kannalta.

Mikrolisäysviljelmien aloittamiseen kuluu resursseja, eikä rahalle aina saada vastinetta. Aloitukset eivät aina onnistu, varsinkaan silloin kun kokemus aloittamisesta on vähäistä. Usein aloitusten tekeminen vaatii aloitusalueiden ja sterilointitekniikoiden kanssa hienosäätöä ennen kuin saadaan aikaan toimiva aloitustapa ja mahdollisesti kasvavia versoja.

Mikrolisäysaloitusten tekemisessä voisi yrittää kehittää yhteistyötä muiden mikrolaboratorioiden kanssa. Asetelmaan liittyy hankaluuksia muun muassa salassapidon kannalta, mutta yhteistyön kehittäminen säästäisi aikaa ja kulut pienenisivät. Mitä voitaisiin tehdä toisin, jotta jokaisen laboratorion ei tarvitse tehdä aloituksia, tai onko jokaisen mikrolaboratorion järkevää tehdä itse aloituksia jää selvitetäväksi ja nähtäväksi tulevaisuuteen.

Työtä kootessa huomasi selvästi olemassa olevan perusteellisen ohjemaateriaalin puuttumisen koskien mikrolisäysaloituksia. Tarvetta suomenkieliselle ohjeistukselle ei sinänsä ole olemassa, sillä Suomessa mikrolisäys on

pienialaista ja tieto periytyy tekijältä toiselle. Kuitenkaan olemassa ei ole myöskään kokonaisvaltaisesti kädestä pitäen aloittamiseen ohjeistavaa teosta edes englanniksi. Joihinkin mikrolisäyslaboratoriossa tehtäviin töihin on olemassa ohjeita, joiden alkuperä ei ole tiedossa. Tällaista tietoa saadaan, kun mikrolaboratorioissa tehdään koemaisesti kokeiluja ja todetaan asioita, joita ei välttämättä koskaan kirjata mihinkään eikä lähdetä todistamaan suuremmilla koe-erillä. Opinnäytetyötä varten läpikäyty kirjallisuus osoitti myös mikrolisäystä käsittelevän kirjallisen tiedon olevan iältään melko vanhaa. Ehkä uutta kirjallisuutta aiheen ympäriltä olisi paikallaan saada.

Mikrolisäystyöhön ja aloitusten tekemiseen liittyy monia riskejä ja vaaranpaikkoja, jotka työntekijän tulee tiedostaa. Tapaturmien vähentämiseksi työntekijöiden olisi hyvä olla koulututtuneita edes riskien tiedostamisen vuoksi.

Tutkimuskysymyksenä ollut mikrolisäysaloitusten tehokkuus vaatii lisätyötä. Vaikka tehokkuuteen vaikuttavia seikkoja pysyttiin huomioimaan opinnäytetyön tekemisen kautta ja aikaa kuluttaviin seikkoihin voidaan siten varautua ja puuttua jatkossa, jää silti mahdollisimman tehokkaan aloituksen tekemisen kysymys edelleen vaille täydellistä vastausta. Lisätyössä tulisi selvittää eri vaiheiden nopeutta ja miten niitä pystyttäisiin nopeuttamaan. Lisäksi selvitettävää olisi erilaisten sterilointien välisessä vertailussa eri kasveille. Pienten aloitusmäärien todettiin olevan epätehokasta ja epätaloudellista.

## LÄHTEET

- Ahuja, M. R. (1993). *Micropropagation of woody plants*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer academic Publishers.
- Alanko, P. & Saario, M. (1997). *Pihan ja puutarhan marjat*. Sulkava: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Blomqvist, L. (2011). *Puutarhan hedelmäpuut*. Vaasa: Ab Leif JM Blomqvist Oy.
- Bonga, J.M. & Von Aderkas, P. (1992) *In vitro culture of trees*. The Neatherlands: Springer.
- Dirr, M. & Heuser, C. (2006). *The refrence manual of the woody plant propagation 2. edition From seed to tissue culture*. Portland, London: Timber Press.
- Dodds, J. H. & Roberts, L. W. (1982). *Experiments in Plant Tissue Culture*. Melbourne, Australia: Cambridge University Press.
- Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. (2017). Noudettu 15.6.2017 osoitteesta <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/mikrobien-kasvua-edistavat-tekijat/>
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1. The Background*. Dordrecht, The Neatherlands: Springer.
- Haapala, T.;& Niskanen, A.-M. (1992). *Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys*. Helsinki: Opetushallitus.
- Hakala, M. (2010). Opinnäytetyö: *Pensaskirsikkalajikkeiden 'Nordia', 'Kirska' ja 'Pernilla' mikrolisäys*. Lepaa.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. & Geneve, R. L. (2014). *Hartmann and Kester's plant propagation: principles and practices* (Part 1). Harlow, Essex: Pearson Education, Inc., Publishing as prentice Hall.
- Huhtama, L. (2013). Opinnäytetyö: Mikrolisäyksen edut ja haitat taimistoviljelyssä. Noudettu 20.8.2017 osoitteesta [http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/59181/Huhtama\\_Leena.pdf?sequence=1](http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/59181/Huhtama_Leena.pdf?sequence=1)

Haymarket Media Group Ltd. (2010). National Rhododendron Collection saved by micropropagation. Noudettu 17.12.2017 osoitteesta <https://www.hort-week.com/national-rhododendron-collection-saved-micropropagation/lands-cape/article/1010472>

Iliev, I., Gajdosova, A., Libiakova, G. & Jain, S. M. (2010) Plant Cell Culture: Plant Micropropagation. John Wiley & Sons, Ltd. Noudettu 4.2.2018 osoitteesta [http://media.wiley.com/product\\_data/excerpt/80/04706864/0470686480.pdf](http://media.wiley.com/product_data/excerpt/80/04706864/0470686480.pdf)

Jain, S. M., & Häggman, H. (2010). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Kinnalan Taimisto Oy. (2017). Noudettu 9.10.2017 osoitteesta <http://www.kinnala.fi/tuote/hedelmaepuut/kirsikkapuut>

Kyte, L., & Kleyn, J. (1996). *Plants from test tubes: an introduction to micropropagation 3rd. ed.* Hong Kong: Timber Press, Inc.

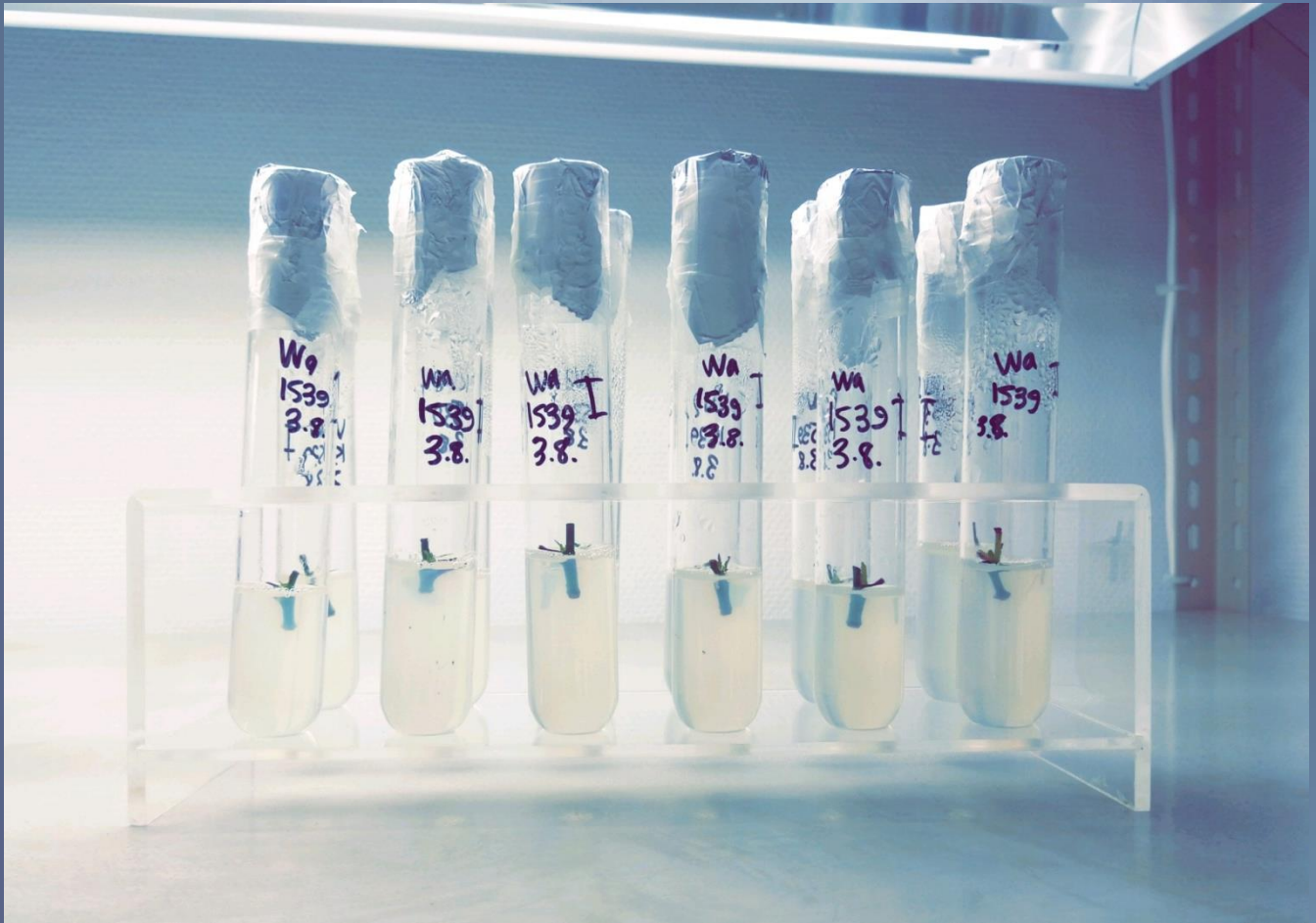
Leppäkoski, S. (2018). Aloituksien onnistumisen määrittäminen. Sähköpostiviesti tekijälle 8.1.2018.

LuontoPortti. (2017). Noudettu 6.9.2017 osoitteesta <http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/?c=rosaceae>

Riikonen, A. (2003). *Metsävaahteran (acer platanoides) mikrolisäys*. Helsinki: Helsingin yliopisto, Soveltavan biologian laitos.

Uosukainen, M. (1997). *Kontaminaatiot solukkoviljelylaboratorioissa*. Vihtavuori: MTT, Puutarhatuotannon tutkimuslaitos, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema.





# MIKROLISÄYSVILJELMIEN ALOITTAMISVAIHEEN OPAS

Laura Keulas

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	34
2	EMOKASVI.....	36
2.1	Aloitusmateriaali .....	37
3	VALMISTELUT.....	38
3.1	Työvälineet ja aineet .....	38
3.2	Välineiden sterilointi ja ennakkovalmistelut.....	38
4	LABORATORIOPUHTAUS.....	40
4.1	Vaatetus .....	41
4.2	Siivous ja desinfiointi.....	42
5	TYÖTURVALLISUUS MIKROLABORATORIOSSA .....	42
5.1	Kemikaalit.....	42
5.2	Muu turvallisuuden edistäminen .....	43
6	KASVUALUSTA .....	44
6.1	Kasvualustan valmistaminen.....	45
6.2	Kasvualustan jakaminen ja sterilointi.....	46
7	VILJELMÄN PERUSTAMINEN.....	47
7.1	Lisäysmateriaalin leikkaaminen .....	48
7.2	Sterilointitekniikka .....	48
7.3	Sterilointityö.....	49
7.4	Raportointi, merkinnät ja muistinpanot .....	56
8	VILJELMÄN PERUSTAMISEN JÄLKEEN.....	58
8.1	Viljely lyhyesti.....	58
8.2	Koeputket .....	59
8.3	Infektoituneiden putkien poisto-ohjeet.....	60

## 1 JOHDANTO

Tämä ohjeistus on laadittu ohjeistamaan mikrolaboratoriossa työskentelyä ja neuvomaan mikroviljelmien perustamisessa. Ohjeen tarkoitus on selventää mikrolisäyksen aloittamisen eri vaiheet ja siihen liittyvät työt sekä opastaa työhön. Kasvien lisäämisestä löytyy runsaasti kirjallisuutta sekä internetlähteitä. Oppaan tarkoitus on selventää vain mikrolisäyksen osuutta ja keskittyä nimenomaan viljelmän perustamiseen ja antaa valmius suorittaa aloitus ohjeen avulla.

Mikrolisäyksessä on omat haasteensa ja helppoutensa. Kasvien lisäämismuotona se toimii useiden kasvien kohdalla erinomaisesti ja tekniikalla pystytään tuottamaan terveitä ja halutulla tavalla kasvavia taimia. Taimikasvatuksellisesti mikrokasvien kasvattaminen on oma lukunsa, sillä mikrokasvit ovat vaativia ja tarvitsevat säännöllistä hoitoa. Mikrotaimet saattavat kasvaa monistusvaiheessa kausiluontoisesti, niiden kasvattaminen saattaa olla eri huoneiden välillä erilaista ja ne voivat kasvaa eri tavoin eri huoneissa. Tällaisten haasteiden kanssa työskennellessä mikrolisäyksestä oppii paljon tarkkailemalla ja seuraamalla viljelmiä ja niiden käyttäytymistä. Aloittamisessa myös on omat haasteensa ja helppoutensa. Koko aloitusprosessi menee muuttujista huolimatta usein samalla kaavalla ja kaavan muuttujia muuttamalla voidaan tehdä aloitus eri kasveista. Tämä voidaan nähdä helppoutena, sillä aloittaminen toteutetaan ohjeita noudattaen. Haasteena on steriloinnin onnistuminen ja riittävän sterilointivasteen saavuttaminen aloitusmateriaalia puhdistettaessa.

Ohjeessa on selostettu mahdollisia ongelmakohtia ja pyritty selventämään työtapoja, joilla aikaansaadaan mahdollisimman hyvä viljelmän aloitus. Ongelmakohtiin ei aina ole olemassa suoraa vastausta, eikä kaikesta pysty millään sanomaan mistä ongelmat johtuvat; aina ei ole edes järkevää selvittää syitä kaikelle. Kuitenkin avustavia vinkkejä siihen, millaisista asioista on kyse, on käyty oppaassa läpi ja pyritty kuvaamaan seikat siten, että ongelmia ratkottaessa pystyttäisiin mahdollisesti saamaan selville ongelman aiheuttaja ja korjaamaan tilanne.

Ohjeeseen on koottu suosituksia siitä, kuinka aloituksien tekeminen saataisiin sujumaan Kinnalan Taimiston puitteissa mahdollisimman jouhevasti. Kehityskohteitakin on pyritty avaamaan. Opasta mikrolisäysviljelmien aloittamisesta voidaan soveltaa muissakin mikrolisäyslaboratorioissa ottaen puitteet huomioon. Opas on koottu ajatellen Kinnalan Taimiston olemassa olevia ohjeistuksia ja luottaen niiden käytettävyyteen sekä oppaan käyttäjän kykyyn ammentaa puuttuvat tiedot sitä kautta. Näin ollen ulkopuoliselle lukijalle saattaa jäädä aukkoja ohjeistukseen, mutta peruseriaatteelta opas mahdollistaa viljelmän aloittamisen ja kuvailee sen tärkeimmät kohdat sanallisesti ja kuvallisesti.

Oppaan tekemisen tueksi käytetyt lähteet tulevat ilmi opinnäytetyöstä, jonka seurauksena opas on tehty. Lähteet on listattu opinnäytetyön loppuun. Koska ohjeistus on toteutettu kirjoittajan omien havaintojen perusteella, sekä lähdetietoihin vedoten, on hyvä muistaa, että kokonaisuudessaan aihe käsittää laajasti sellaista asiaa, jotka on jätetty oppaasta pois. Opinnäytetyön liitteenä oleva ohjeistus on laadittu ensisijaisesti palvelemaan kaikkia työvaiheita ja valmistelemaan aloittamiseen sekä viemään loppuun aloitettujen viljelmien hoito aina monistusvaiheeseen asti. Lisäksi on liitetty ohjeistusta

tärkeimmistä aloittamiseen liittyvistä töistä steriloinnin lisäksi. Näiden lisäohjeiden avulla voidaan toteuttaa kokonaisvaltaisemmin aloitukseen liittyviä töitä aina valmistelusta infektioputkien pesemiseen asti.

Oppaasta löytyy toistomaisesti kuvallinen ja sanallinen ohjeistus. Tämän toiston tarkoitus on tahallinen ja tukee oppaan käyttäjän työtä.

## 2 EMOKASVI

Kun päätetään perustaa mikrolisäysviljelmä, on aivan ensimmäiseksi hyvä perehtyä asiaan kirjallisuuden kautta. Kirjallisuudesta saadaan hyvää pohjatietoa aloittamiseen liittyen. Pohjatiedon lukeminen ja ymmärtäminen kuuluvat aloitusprosessiin varsinkin silloin, kun tekijä tekee aivan ensimmäisen mikroviljelmän aloituksensa. Mikroviljelmien aloittaminen vaatii ymmärrystä kasvien fysiologiasta sekä ymmärrystä laboratoriotyökentelystä.

Alkuvaiheessa valitaan monistettava kasvi, niin sanottu emokasvi, josta halutaan luoda kopioita. Mikrolisäyksellä tuotetut versot ovat emonsa kaltaisia, joten emokasvi valitaan huolella ja harkiten. Emokasvin tulee olla hyväkuntoinen. On tärkeää muistaa, että kloonit omaavat myös emonsa kaikki huonot ominaisuudet ja kasveista tulee samaan tapaan kasvavia kuin emosta. Emokasvin ominaisuus, jonka vuoksi se halutaan monistaa, voi pahimmassa tapauksessa osoittautua virukseksi, joka aiheuttaa esimerkiksi lamoavan kasvutavan ja ominaisuus saattaa hävitä kasvia monistettaessa. Tämä on kuitenkin useimmiten puhdistettujen viljelmien ongelma, tavallisella steriloinnilla kasveista ei pystytä hävittämään kasvin sisällä olevia viruksia, vaikka haluttaisiinkin. Tässä vaiheessa tulee kiinnittää huomiota myös lajikkeeseen ja sen aitouteen. Jotta mikrolisäyksellä tuotettuja versoja voidaan kasvattaa ja myydä lajikenimellä, on tiedettävä, että emo on ollut kyseistä lajiketta.

Emokasvin valintaan vaikuttaa lisäksi myös emotaimen ikä, nuoret kasvit monistuvat paremmin mikrolisäyksellä. Emokasvina voidaan käyttää myös vanhojen kasvien nuorempia osia, viimeisimpänä kasvaneita versoja, jotka ovat fysiologisesti nuoria. Emokasvin ollessa jo vanhemmalla iällä, voidaan saavuttaa parempi tulos kasvin varttamisen avulla. Varttaminen helpottaa toisinaan viljelmän alkuunlähtöä, silloin on kuitenkin ehdottoman tärkeää aloittaa viljelmä vartteesta.

Mikrolisäysviljelmien aloittamiseen voidaan käyttää samaa emomateriaalia kuin pistokaslisäyksessä käytetään. Mikrotaimia tuotettaessa on kuitenkin tärkeää kiinnittää huomio kasvien terveyteen ja ikään, sillä pistokasmateriaalina ei aina käytetä uusia kasveja, vaan pistokkaat leikataan vanhoista tai hyvinkin iäkkäistä kasveista. Mikrotaimimateriaaliksi tulisi valita parhaimmat tuoreista kasvuista ennen pistokasmateriaalin ottamista.

Lisäysmateriaalia voidaan kerätä myös hyödetyistä kasveista. Kasvin ollessa lepotilassa, voidaan kasvista ottaa oksia hyötöön esimerkiksi kasvihuoneeseen ja sitä kautta saadaan materiaalia aloitusta varten. Tämä on hyvä tapa tuholaisherkkien kasvien kohdalla, sillä dormanssissa olevia kasveja ei yleensä vaivaa tuholaispopulaatiot niidenkin viettäessä horroskautta. Kasvihuone tarjoaa lisäksi lämpöä ja valoa tarpeeksi lepotilan loppumiseksi. Hyödön tullessa kysymykseen on hyvä varmistaa kasvukaudella kasvin yleiskunto ja todeta sopivuus viljelmän aloitusmateriaaliksi. Hyötö voidaan suorittaa kasvusta riippuen myös huoneoloissa.

## 2.1 Aloitusmateriaali

Aloitusmateriaaliksi kelpaavat mahdollisimman tuoreet ja nuoret verson osat. Viimeimpänä kasvaneissa versoissa on vähiten taudinaiheuttajia ja ulkoiset tekijät ovat päässeet vähiten vaikuttamaan nuoriin kasvinosiin. Sopivat kasvinosat voi tunnistaa taivuttamalla versoa. Liian puutuneita versoja ei tule käyttää.

Emokasvin kuntoon vaikuttavat monenlaiset tekijät. Emokasviksi ei kelpaa niin sanottu stressikasvi, jota ovat vaivanneet tuulet, kuivuus, paahde tai liian märkä kasvualusta. Emokasvin oloja voidaan parantaa lannoituksella. Jos saatavilla on vain iäkkäämpää kasvimateriaalia, voidaan aloitusta varten kasvin oloja parantaa myös nuorentamalla kasvia kasvattamalla emosta otettuja pistokkaita tai vartteita kasvihuoneessa, kunnes kasvu on parempaa. Aloituspalan kohta kasvissa on merkityksellinen, sillä kasvin oksat ovat eri kohdissa kasvia erilaisissa kasvun vaiheissa.

### Aloitusmateriaali

Kun emokasvi on valittu, tulee kaikki siitä tiedossa olevat tiedot kirjata ylös

Kasvin terveys tarkastetaan huolellisesti

Aloituksessa käytettävä materiaali tulee olla mahdollisimman nuorta solukkoa.

Aloitukseen käytettävä materiaali kerätään mahdollisimman uusista sivuversoista läheltä kasvin tyvää. Vanhinta solukko on kasvin latvassa ja tyvellä.



Aloitusmateriaaliksi valikoituu emokasvi, joka on mahdollisimman terve ja kasvultaan mahdollisimman hyvä. Kasvutapa siirtyy aloitusmateriaalin versoihin.

Aloitusmateriaaliksi pyritään valitsemaan mahdollisimman nuoria versoja niiden hyvän monistumisen ja elinvoimaisuuden vuoksi. Lisäksi tuoreisiin kasvuihin eivät ole vielä ehtineet vaikuttaa sääolot kuten vanhoihin kasveihin. Nuoriin kasvuihin eivät ole päässeet vaikuttamaan niin suuresti myöskään bakteerit, hiivat, sienet ja muut aloitukselle haitalliset tekijät.

Kasveihin vaikuttavia tekijöitä ovat vuodenajat ja sääololliset tekijät, ne tulee ottaa huomioon materiaalia valitessa ja kerätessä. Lisäksi kasvimateriaalin sijainti kasvissa vaikuttaa aloitusmateriaaliin

Materiaalia voidaan kerätä ulkona kasvavien kasvien lisäksi hyötöön otetuista kokonaisista kasveista tai oksista.

### 3 VALMISTELUT

Valmistelut ovat suuri osa viljelmien aloituksen työstä. Välineiden valmisteleminen vie aikaa ja vaatii suunnittelua. Tarvittavat tavarat ja aineet suositellaan katsottavaksi läpi ennakkoon ja suunniteltavaksi valmiiksi, milloin välineiden ja tarvikkeiden sterilointi tapahtuu.

#### 3.1 Työvälineet ja aineet

Laboratoriovälineiden hankkiminen on hintavaa ja välineiden toimittaminen kestää yleensä jonkin aikaa. Suomessa toimii muutamia laboratoriovälineitä toimittavia yrityksiä.

Mikrolisäykseen tarvitaan paljon välineistöä ja välineiden määrä riippuu paljon laboratorion koosta ja sen toiminnan suuruudesta. Pääsääntöisesti on hyvä varmistaa ennen viljelmän perustamisen aloittamista, että tarvittavat välineet ovat valmiina.

#### 3.2 Välineiden sterilointi ja ennakkovalmistelut

Laminaarivirtauskaapissa työskennellessä työvälineiden, kuten pinsettien, sterilointiin voidaan käyttää kvartsi-sterilaattoria eli lasihelmisterilisaattoria tai spriilamppua. Spriilamppu palaa polttonesteen voimin ja välineet steriloidaan kastamalla ne ensin alkoholiin ja polttamalla alkoholi pois; tätä kutsutaan liekitykseksi.

Ennen viljelmän perustamispäivää tulee valmistella välineitä ja tarvikkeita, koska laminaarissa työskennellessä on myös osan välineistä oltava steriileitä. Sterilointi kuumentamalla lämpökaapissa on hyväksi havaittu tapa poistaa kontaminantit välineistä, joita aiotaan käyttää laminaarissa. Lämpö- eli kuumailmasterilointiin käytetään laboratorio-oloissa lämpökaappia. Lämpökaappeja löytyy markkinoilta runsaasti eri kokoisia ja näköisiä, erilaisilla ohjelmilla ja toiminnoilla. Pääsääntöisesti lämpökaapin ei tarvitse omata mitään erityisiä ominaisuuksia välineiden sterilointia varten. Lämpökaappia pidetään päällä 4 tuntia 160 °C:ssa.

Lämpökaappiin laitetaan steriloitumaan neljäksi tunniksi, mielellään viimeistään päivää ennen seuraavat välineet:

- 5 x pieni dekantterilasi (noin 100 ml) tai pieni lasipurkki (vauvanruokapurkki), kaksinkertainen folioneliö kanneksi, painele kansi hyvin kiinni reunoihin
- 2 x iso dekantterilasi (noin 300 ml), kaksinkertainen folioneliö kanneksi, painele kansi hyvin kiinni reunoihin
- Työvälineitä: kaksi veistä ja kahdet lyhyemmät pinsetit, yhdet tai kahdet pitkävartiset pinsetit kääritään folion sisään ja suljetaan lämpöteipillä tai välineet suljetaan lämmön kestävän muovin sisään ja suljetaan muovi tiiviiksi siihen tarkoitettulla laitteella
- Haihdutusmalja folioon käärittynä, suljetaan lämpöteipillä

- Jos käytössä on lasiset petrimaljat eli haihdutusmaljat, tulee ne laittaa steriloitumaan ennen käyttöä lämpökaappiin, mahdollisesti jo edellisenä päivänä tai yönä. Mikäli käytössä on muoviset steriilipakatut petrimaljat, niiden saatavuus on hyvä varmistaa etukäteen
- Foliokannet taiteltuna ja käärittynä steriloitipakettiin putkimäärän mukaan
- Jos koeputkiin laitetaan foliokorkit, laitetaan koeputket steriloitumaan lämpökaappiin folioon käärittynä.
- (Foliokannellinen mittalasi)

Steriloi valmiiksi ioninvaihtovettä, sitä kuluu siirrostuksessa ja steriloinnissa. Kuluva määrä riippuu aloitettavan mikrolisäviljelmän aloitusmateriaalin määrästä ja työstäjästä. Ylimääräistä on hyvä olla saatavilla, jos pullo sattuu hajoamaan tai korkki on steriloinnin jälkeen jumiutunut liian tiukalle.

Viljelmää perustettaessa tarvitaan myös koeputkia ja koeputkitelineitä. Koeputki on juuri sopiva kasvupaikka pienelle kasvin alulle. Koeputket on helpoin hallita koeputkitelineiden avulla, sillä koeputket rikkoutuvat herkästi eivätkä kaikki koeputket pysy pystyssä pohjan kaarevan muodon vuoksi. Koeputkia tulee olla riittävästi, sillä kasvualustaa tarvitsee tehdä järkevä määrä eikä keitettyä alustaa ole järkevää kaataa pois, jos se ei mahdu putkiin. Koeputkien määrällä pystytään hyvin aloittaessa miettimään esimerkiksi jonkin kasvualusta kokeen otoksen laajuutta ja kerralla tehdyt aloituserät voivat olla suurempia. Vaikka tavoite mikroviljelmien aloittamisessa on saavuttaa yksi kasvava verso, jota aletaan monistaa, on silti todennäköisempää onnistua, kun koeputkia on kasvatuksessa enemmän.

Koeputket ja muut lasiset laboratoriovälineet ovat usein borosilikaattilasia. Lasin käyttö laboratoriovälineissä on turvallista, koska materiaali kestää hyvin kemikaaleja ja kuluusta, myös puhdistaminen käy suhteellisen helposti. Lasi ei useinkaan ime itseensä kemikaaleja ja jäämät on helppo puhdistaa jopa käsin tiskaamalla.

Foliokansia käytettäessä kansien taittelu tapahtuu seuraavasti:

1. Paksua foliota taiteltaessa taitos kaksinkertainen, tavallinen kotitalousfolio taitellaan kolmeen kerrokseen.
2. Foliorullan päästä taitetaan noin kymmenen sentin kohdalta taitos, jotta saadaan kaksinkertainen suikale
3. Suikaleen katkaiseminen käy nopeimmin viivoittimen avulla
4. Foliorullan leveyden ja sitä myötä suikaleen pituuden mukaan suikale taitetaan kolmeen tai neljään kertaan siten että voidaan leikata noin 10 cm x 10 cm kaksin- tai kolminkertaiset palaset irti

Taitellut ja leikatut foliokannet laitetaan pinoon ja foliosta otetaan palanen, joka laitetaan kaksin kerroin. Folioneliöpino taitellaan foliopalan sisään siten, että taitettu reuna tulee käärettä laminaarissa avattaessa helposti saataville. Näin helpotetaan foliokansien ottamista pinosta. Käyttämättömät foliokannet voidaan taitella uuden



kääreen sisään. Käärityt kannet laitetaan lämpökaappiin muiden steriloitavien välineiden mukaan.

## Valmistelut – välineet ja aineet

Tarvittavat välineet kerätään valmiiksi ja valmistellaan laminaarikaappi. Välineet voidaan pyyhkiä alkoholilla odottamaan laminaarivirtauskaappiin ennen työn aloittamista.

Ennen varsinaisen työn aloittamista on tärkeää varmistaa, että kaikki oikeat välineet löytyvät ja astioita on steriloitu tarpeeksi. Lisäksi pitää valmistaa natriumhypokloriittiliuos valmiiksi odottamaan sterilointia.



## Valmistelu – dekanterilasien merkintä

Työskentelyn aloittamisen helpottamiseksi ja sekaannuksilta välttymiseksi voidaan dekanterilasien foliokansiin kirjoittaa kuvan kaltaisesti niiden roolit steriloinnissa.

Numerot yhdestä neljään ovat pieniä dekanterilaseja ja edustavat huuhtelukertoja, etax ja NaOCl ovat sterilointiaineita ja ne tulevat isoihin dekanterilaseihin. Lisäksi tarvitaan ioninvaihtovedellä varustettu pieni dekanterilasi.

Tiedot foliokansissa helpottavat työskentelyä ja astiat eivät mene sekaisin kun ne pitää järjestyksessä.

## 4 LABORATORIOPUHTAUS

Puhtaus on tärkeä asia, sillä epäpuhtaus voi aiheuttaa hallitsemattomia kontaminaatioita, pilata viljelmiä ja aiheuttaa suuria taloudellisia tappioita. Puhtaus on hyvin moniulotteista ja työntekijöiden kouluttaminen on ensisijaisen tärkeää työn onnistumisen kannalta. Mikroviljelmien onnistuneen viljelyn edellytys on puhtaat, hyönteisvapaat tilat ja mahdollisimman hyvä puhtaus sienistä ja pieneliöistä.

Infektoituneita viljelyastioita ei suositella avattaviksi. Aloittamisen kannalta tämä on myös tärkeää, sillä lähes poikkeuksetta aloituksissa ilmenee runsaasti infektioita aloitusputkissa ja vielä sen jälkeenkin. Putkia ei myöskään saa avata ja niiden käsittelyssä tulee noudattaa erityistä varovaisuutta herkan rikkoutumisen mahdollisuuden vuoksi. Infektiopurkeista leviää ilmaan itiöitä, jotka saattavat aiheuttaa lisää infektioita myöhemmin avatuissa purkeissa.

#### 4.1 Vaatetus

Laboratoriossa käsitellään kemikaaleja, pesuaineita ja toisinaan ollaan tekemisissä myös tulen kanssa. Tästä syystä pukeutumiseen ja vaatetukseen tulee kiinnittää jonkin verran huomiota. Vaatteiden lisäksi suojavarustukseen kuuluu joissakin työtehtävissä hengityssuojain ja kemikaalin kestävä suojakäsineet. Hengitysmaskeja ja käsineitä on saatavilla runsaasti erilaisia, niiden sopivuus ja tilauspaikka kannatta katsoa sen mukaan kuinka suuri menekki on ja mihin tarkoitukseen sekä kuinka puhdasta halutaan.

Pääsääntöisesti laboratorioon ei kannata pukeutua pölyäviin villaisiin vaatteisiin tai liehuviin vaatteisiin. Ylimääräiset pölyt voivat olla haitaksi puhtaille viljelmille ja laminaarivirtauskaapin toiminta saattaa häiriintyä suurista pölydyksistä, eikä se pysty pitämään kaikkea kaapin ulkopuolella puhaltimensa avulla. Työskentelyä saattaa haitata myös liehuvat vaatteet, jotka voivat jäädä kiinni tai syttyä palamaan. Tämä on riski työn tekemisen kannalta, mutta myös ilmiselvä riski työntekijälle.

Vaatetuksella tarkoitetaan myös suojatakkaa, jota yleensä laboratorioissa pidetään yllä. Yleisesti laboratorion suojatakkeissa suositaan materiaalina puuvillaa; puuvilla syttyä huonommin tuleen kuin keinokuituiset vaatteet. Laboratorio-oloissa takki suojaa roiskuvilta ja kaatuville kemikaaleilta ja pitää omissa vaatteissa olevia hiukkasia kurissa. Suojatakkeja myydään hoitajille tarkoitetuissa nettikaupoissa, laboratoriotyöntekijöille tarkoitetuissa nettikaupoissa sekä työvaatteita myyvissä erikoisliikkeissä. Laboratorioissa käytetään suojatakkaa, joka suojaa kasveja työntekijältä sekä omia vaatteita työssä mahdollisesti aiheutavalta sotkeutumiselta. Kirjallisuudessa kehoitetaan välttämään pitkiä hihoja suojavaatteissa, sillä ne keräävät pölyä.

Jalkineet, joita käytetään laboratorion tiloissa, on hyvä pitää vain laboratorioissa sisällä käytettävänä jalkineina. Mikrolisäyslaboratoriotiloihin ei saa mennä ulkojalkineilla. Jalkineiden mukana kulkeutuu likaa ja kontaminantteja laboratorion tiloihin. Ulkokenkien päälle voidaan vetää suojapussit, jotta nopeat vierailut laboratorioissa helpottuvat. Ylimääräisiä vierailuja laboratorion tiloissa tulee kuitenkin välttää turhan kulkeutumisen estämiseksi. Työssä käytettäväksi jalkineiksi soveltuvat useimmat kengät. Työskentelyn kannalta mukavampaa on, jos kenkien pohjista löytyy kantapään alta hieman korkoa ja pohjat ovat jämäkät. Esimerkiksi keittiöissä käytettävät jalkineet soveltuvat hyvin mikrolisäyslaboratorioon. Ohutpohjaisia kenkiä ei suositella, sillä mahdolliset lasinsirut saattavat lävistää pohjat. Kenkien pohjat desinfioidaan tai puhdistetaan muuten säännöllisesti.

Työskennellessä voi olla paljain käsin tai vaihtoehtoisesti käyttää kertakäyttöisiä käsi-neitä. Laminaarivirtauskaapissa työskenneltäessä on suositeltavaa, että pitkät hiukset pidetään kiinni, jotta ne eivät häiritse työntekoa, eikä niitä tarvitse siirrellä pois edestä.

Viljelmää perustettaessa tulee muistaa suojavaatteiden olevan tarkoitettut käytettäväksi vain laboratoriossa. Esimerkiksi sisäkengissä tai laboratoriotakissa ei tule lähteä ulos noutamaan aloitusmateriaalia. Aloitusmateriaalin käsittelyssä tulee myös huomioida vaatteiden mahdollinen likaantuminen ja pyrkiä olemaan kuljettamatta likaa laborato- rion puolelle.

## 4.2 Siivous ja desinfiointi

Kengissä ja vaatteissa sekä astioissa ja tavaroissa kulkeutuvan irtolian estäminen koko- naan on lähes mahdotonta. Kulkeutumista voidaan kuitenkin hillitä asettamalla labora- torion kulkuväylälle hiukkasia imeviä mattoja. Kenkien pohjia tulee pestä ja desinfioida aina tarvittaessa, kuitenkin hyvänä pesuvälinä voidaan pitää noin viikkoa. Aloituksia teh- täessä aloitusmateriaalista irrotettavat lehdet putoilevat helposti lattialle, silloin jalki- neiden pesemistä voidaan harkita tilanteen mukaan.

Siivous tulee suorittaa säännöllisesti ja yleisestä puhtaudesta tulee huolehtia päivittäis- sessä työssä. Siivoukseen kuuluu työohjeiden mukaisesti pöytien pyyhintä alkoholilla joka aamu sekä imurointi ja lattioiden pesu säännöllisesti. Siivouksesta pidetään kirjan- pitoa.

Aloitukseen liittyen siivoamiseen ja desinfiointiin on hyvä kiinnittää huomiota aloitus- materiaalia sisään tuotaessa. Välineiden huolellinen puhdistaminen jälkeinpäin on osa puhtaanapitoa, joka edistää aloituksen onnistumista ja yleistä laboratorion puhtautta.

Kasvatushuoneen siisteydestä tulee huolehtia muiden tilojen siistimisen ohella. Hyllyt pyyhitään säännöllisesti ja desinfioidaan ajoittain.

## 5 TYÖTURVALLISUUS MIKROLABORATORIOSSA

Turvalliseen työympäristöön panostamalla aikaansaadaan turvallisempaa työskentelyä ja vähennetään työtapaturmia. Kun tiedostetaan riskit ja osataan varautua niihin, voi- daan yrittää ymmärtää työturvallisuutta ja luoda turvallista työskentelyä, lisäksi voidaan minimoida tapaturmat ja vahingot. Turvallisuus liittyy aina työntekijään ja turvallisuus voidaan nähdä monialaisesti sekä monelta kantilta. Työntekijän pitää tuntea työturval- lisuusohjeet hyvin ennen työn aloittamista.

### 5.1 Kemikaalit

Kemikaalit tulee pitää suljettujen ovien takana, lukollisessa kaapissa tai huoneessa. Ke- mikaaleista tulee olla laboratoriotiloissa CLP-asetuksen mukainen luettelo. Kemikaalien

kanssa noudatetaan aina varovaisuutta ja tarkistetaan käyttöturvallisuustiedotteista aineiden vaarallisuutta ja käsittelyä koskevat tiedot ennen työn aloittamista. Työssä käytetään aina asianmukaisia suojaimia. Kemikaalien käsittelyssä käytetään hengityssuojainta. Kemikaaleja käytetään aloituksissa alustojen valmistamisessa. Alustojen valmistamisessa noudatetaan työohjeita, jolloin kemikaalien kanssa työskentely on työntekijälle turvallista.

Kemikaalien säilytyspakkauksissa on usein merkittynä niiden haitallisuus, kuitenkin usein laboratorio-oloissa pakkauksiin ei ole aina merkitty vaarallisuudesta tiedottavia asioita. Kemikaalien vaarallisuus selviää käyttöturvallisuustiedotteista. Laboratoriossa tulee aina olla saatavilla käyttöturvallisuustiedotteet jokaiselle käytettävälle kemikaalille. Jokaisen laboratoriossa työskentelevän henkilön, joka käyttää kemikaaleja tai on niiden kanssa tekemisissä, tulee tutustua käyttöturvallisuustiedotteisiin. Käyttöturvallisuustiedotteiden ajantasaisuus tulee myös tarkistaa ajoittain.

Hallitsemattomia reaktioita pitää tietoisesti välttää koko ajan kemikaalien kanssa työskennellessä ja yleisesti laboratoriossa. Hallitsemattomat reaktiot syntyvät useimmiten merkitsemättömistä astioista tai välineiden käytöstä ohjeiden vastaisesti. Laboratorion työntekijät pitävät huolta astioiden merkitsemisestä. Astioiden kylkiin tulee merkitä mitä ne sisältävät. Jos laboratoriossa löytyy astia, jonka sisältö on epävarma, tulee tällaisissa tilanteissa menetellä niin, että aine voi reagoida minkä tahansa toisen aineen kanssa ja aiheuttaa terveydelle vaaraa ja hävitys tapahtuu sen mukaan.

Pullojen ja erilaisten astioiden kylkiin merkitään tarralla, teipillä tai tussilla aineen selkeästi tunnistettava koodi tai nimi. Lisäksi merkitään valmistuspäivämäärä vuosiluvun kera sekä astiassa olevan aineen määrä tai pitoisuus. Lisäksi voidaan merkitä muita tarvittavia tietoja. Periaatteena on hyvä pitää sitä, että jonkun toisen on tiedettävä merkintöjen perusteella mitä astia sisältää.

Laboratorio-oloissa kaikki merkitsemättä jätetyt astiat, pullot ja muut säilytysastiat ovat suuri riski. Vain se henkilö, joka on jättänyt astian merkitsemättä, tietää mitä astia sisältää. On kuitenkin mahdollista, että unohdetaan, mitä mihinkäkin astiaan on laitettu ja tästä syystä laboratoriossa tulee aina merkitä kaikki astiat, jos ne sisältävät jotakin. Astioissa, joissa ei ole merkintää, tulee aina suhtautua varauksella. Tällaisissa tilanteissa pyritään selvittämään astian sisältö, mikäli selvyyttä ei tule, hävitetään kyseisen astian sisältö, kuten työohjeissa kerrotaan. Tulee myös ottaa huomioon, että astian sisältö saattaa aiheuttaa terveydelle haitaksi olevia asioita, kuten vaikuttaa hedelmällisyyteen tai vaikuttaa hengitysteihin. Astioita merkittäessä tulee pitää yhteiset pelisäännöt selvillä ja muistaa, että joku toinen saattaa lukea sinun kirjoittamaasi merkintää, joten huolellisuus ja selkeys on pidettävä osana työtä.

## 5.2 Muu turvallisuuden edistäminen

Yleistä turvallisuutta voidaan ylläpitää asentamalla palovaroittimet mikrolaboratorion tiloihin voimassa olevien määräyksien mukaan. Lisäksi tiloissa olisi hyvä olla saatavissa sammutuspeite sekä hiilidioksidisammutin. Jauhe- tai vaahtosammuttimen käyttöä la-

laboratoriotiloissa suositellaan vältettäväksi, koska nämä sammuttimet aiheuttavat sotkua ja saattavat pilata laitteiston, kuten virtauskaapin, käyttökelvottomaksi. Sammuttimien tulee sijaita helposti havaittavilla paikoilla ja työntekijän on tutustuttava sammuttimien käytön perusperiaatteisiin. Muihin työturvallisuutta edistäviin asioihin laboratorioissa kuuluu myös silmäsuihku, jota pidetään lähettyvillä ja helposti saatavilla kemikaaleja käsiteltäessä. Myös hätäsuihku kuuluu laboratorioden turvavarusteluihin.

Turvallisuutta voidaan edistää myös pitämällä laitteet huollettuna. Älä käytä laitteita, mikäli ne pitävät outoja ääniä tai ovat jotenkin rikki. Laboratorion tiloissa ei milloinkaan saa syödä. Syödessä kemikaaleja saattaa kulkeutua käsien kautta suuhun tai ruokien murekset ja jätteet aiheuttaa laboratorioissa ei haluttuja vaikutuksia.

Lämpölevyä käytetään alustojen keittämisessä sekä toisinaan kantaliuosten valmistamisessa liukenemisen nopeuttamiseksi. Lämpölevyä käytettäessä se lämmitetään useimmiten korkeisiin lämpötiloihin. Kuumen levyn lähellä työskenneltäessä on noudatettava varovaisuutta ja pyrittävä estämään palovammojen syntymistä. Käsien suojaksi tulee laittaa kuumuutta kestävä käsineet ja pitää alustojen keittämisen ajan käsineet lähettyvillä.

Spriilamppua käytetään liekitykseen aloituksessa; liekki steriloi pinnan. Lampun käytössä tulee tiedostaa polttonesteen syttymisvaara lampun kaatuessa. Lamppu saattaa polttaa myös työntekijän käsiä, mikäli työskentely tapahtuu liian lähellä liekkiä. Myös alkoholirätti saattaa syttyä lampun liekistä. Välineitä liekitettäessä tulee huomioida, että alkoholin valuessa käsille myös käsissä oleva alkoholi saattaa syttyä palamaan. Tulen läheisyydessä on suositeltavaa pitää pitkät hiukset sidottuina, sillä ne saattavat syttyä palamaan. Lisäksi hiukset saattavat kantaa kontaminantteja, jotka ovat vaaraksi viljelmille.

Kontaminanttien, tuholaisten ja vedon estämiseksi sekä tasaisten olojen ylläpitämiseksi viljelyhuoneen ovea pidetään aina kiinni.

## 6 KASVUALUSTA

Kasvualustaa valittaessa tulee muistaa, että aloituksissa käytetään yleensä aloituksia varten suunniteltuja alustoja. Tällaisten alustojen pitoisuudet eroavat monistusalustoista ja alustojen tarkoitus on tukea kasvuun lähtöä.

Kasvualustan valinta aloitetaan selvittämällä olemassa olevaa tietoa. Jos tietoa sopivasta kasvualustasta ei löydy valmiina, voidaan soveltaa olemassa olevaa tietoutta kasvualustoista ja ravinteista ja tehdä kokeiluja. Kokeiden tekeminen on usein aikaa ja rahaa vievää, tästä syystä taustoitusta on syytä tehdä tehokkaasti ja hyvin selvitellessä eri lähteistä. Kasvualusta kokeilujen tekeminen on usein haastavaa, sillä pelkästään eri sokerin käyttäminen kasvualustan valmistamisessa voi vaikuttaa kasvien kasvuun. Hyviä lähteitä löytyy kirjallisuudesta. Useimmissa mikrolisäyksestä kertovassa kirjallisuudessa on ohjeellista tietoutta hyvinkin yksityiskohtaisesti alustojen käytöstä eri kasveilla. Esimerkkejä löytyy useimmista mikrolisäämistä käsittelevistä teoksista

Ravinteiden oikeanlainen saatavuus on tärkeää nuorelle viljelmälle. Aloitusaluustoja varten voidaan joutua valmistamaan omia kantaliuoksia, koska ravinnemäärät vaihtelevat monistus- ja aloitusaluustojen välillä. Tämä seikka kannattaa huomioida ja verrata ravinteiden määriä ja suhteita ennen alustan valmistamista. Aloitusalustan valinnassa tärkeintä on tutustua kasvin tarvitsemiin ravinteisiin ja luoda alusta, joka sopii kasvityypille. Kaikki alustat eivät sovi kaikille kasveille vaan alusta valitaan aina tapauskohtaisesti. Ravinnemäärien säätäminen vaikuttaa kasvin kasvuun, kasvun laatuun ja terveyteen sekä tietynlaisten solujen kasvuun ja erilaistumiseen. Ravinteiden säätämisestä ja niiden vaikutuksesta on olemassa tietoa kirjallisuudessa.

Aloitusalusta tulee valmistaa huolellisesti, jotta koostumus on oikeanlainen ja aloitettu kasvi saa alustasta irti tarvitsemansa. Alustoja valmistettaessa on hyvä huomioida valmistettavan alustan määrä. Vaikka koeputkiin mahtuu hyvin vähän kasvualustaa kerrallaan, tulee kuitenkin huolehtia, että alustaa on tarpeeksi. Tarvittava koeputkien määrä eli aloituksessa tehtävän aloitettavien versojen lukumäärä päätetään etukäteen ja valmistetaan alustaa tarpeen mukaan. Tähän vaikuttaa myös koeputkien määrä. Aloitusalustaa valmistettaessa puhutaan yleensä pienistä määristä valmistettavaa alustaa. Pieni määrä alustaa keittyy suhteellisen nopeasti ja pH-säädössä tulee olla tarkka, koska säätöön käytettäviä kemikaaleja annosteltaessa pienessä määrässä alustaa pH nousee ja laskee herkemmin kuin isossa alustamäärässä.

## 6.1 Kasvualustan valmistaminen

Kasvualustan valmistaminen tapahtuu aivan kuten monistusaluustojenkin valmistaminen. Valmistamisen tukena käytetään olemassa olevia ohjeistuksia. Kinnalan Taimiston ohjekansiosta löytyy kantaliuosten ja ravintoaluustojen valmistamiseen omat kirjalliset ohjeet, joiden mukaan alustan valmistaminen suoritetaan.

Laadullisesti paras ravintoalusta valmistetaan ohjeiden mukaan noudattaen reseptiä ja siinä annettuja mittoja tarkasti. Ravintoalusta kootaan kantaliuoksista, jotka on ilmoitettu reseptissä. Nämä kantaliuokset saattavat erota jonkin verran samankaltaisten alustojen perusreseptien kantaliuoksista. Kantaliuokset valmistetaan ennen alustan tekemistä niiden omista resepteistä taimiston työohjeiden mukaisesti. Mittayksiköiden kanssa tulee noudattaa tarkkaavaisuutta. Mittaamiseen tulee käyttää aina oikeita mittausvälineitä. Pienempien, alle 20 ml, nesteiden mittaamiseen tulee käyttää pipettiä taimiston ohjeistuksen mukaan väliastian kautta pipetoituna mittaamisen pienentämiseksi. Pipetinkärkiä ei saa sekoittaa, jokaiselle aineelle tulee käyttää omaa kärkeä. Sama pätee kantaliuoksia valmistettaessa, jokaiselle aineelle otetaan oma dekantterilasi ja lasisauva. Pipetit ovat herkkiä mittausvälineitä, niitä ei saa kääntää sivuttain, kun pipetinkärjessä on nestettä. Suurempien nestemäärien, kuin 20 ml, mittaamiseen voidaan käyttää mittalasia.

Mittavälineitä valitessa tulee huomioida niiden mitta-asteikon tarkkuus, joka on yleensä ilmoitettu asteikon vieressä. Mittojen tarkkuudessa on hyvä pyrkiä noudattamaan mahdollisimman tarkkoja mittoja aina kantaliuosten tekemisestä lähtien. Mittaamisen tarkkuus näkyy kasvualustoissa ja kantaliuoksissa eniten silloin, kun valmistettava määrä ei ole iso. Mittauksen heiton merkitys kasvaa prosentuaalisesti pienempien valmistettavien erien kohdalla. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että suuria määriä valmistettaessa saisi tehdä tahallaan mittausrvirheitä. Esimerkiksi kantaliuosta valmistettaessa kemikaaleja punnitessa painon desimaalit eli merkitseviä numeroita huomioidaan tarkemmin, koska kemikaalia ei itsessäänkään punnita suurta määrää. Alustan valmistamiseen käytetään aina puhtaita laboratorioastioita, jotka on puhdistettu oikein ja joihin ei säilytyksessä ole päässyt likaa. Alusta valmistetaan yleensä aina erlenmeyerpulloissa, jossa se myös keitetään.

## Kantaliuokset

Kantaliuoksia tarvitaan ravintoalustan koostamiseen

Kantaliuokset valmistetaan kemikaaleista reseptin ja kantaliuosohjeistuksen mukaan punnitsemalla ja mittaamalla

Kemikaalit liuotetaan ja liuokset yhdistetään, jolloin valmista liuosta voidaan käyttää ravintoalustassa helposti mittaamalla liuosta tarvittava määrä yksittäisten kemikaalien sijasta



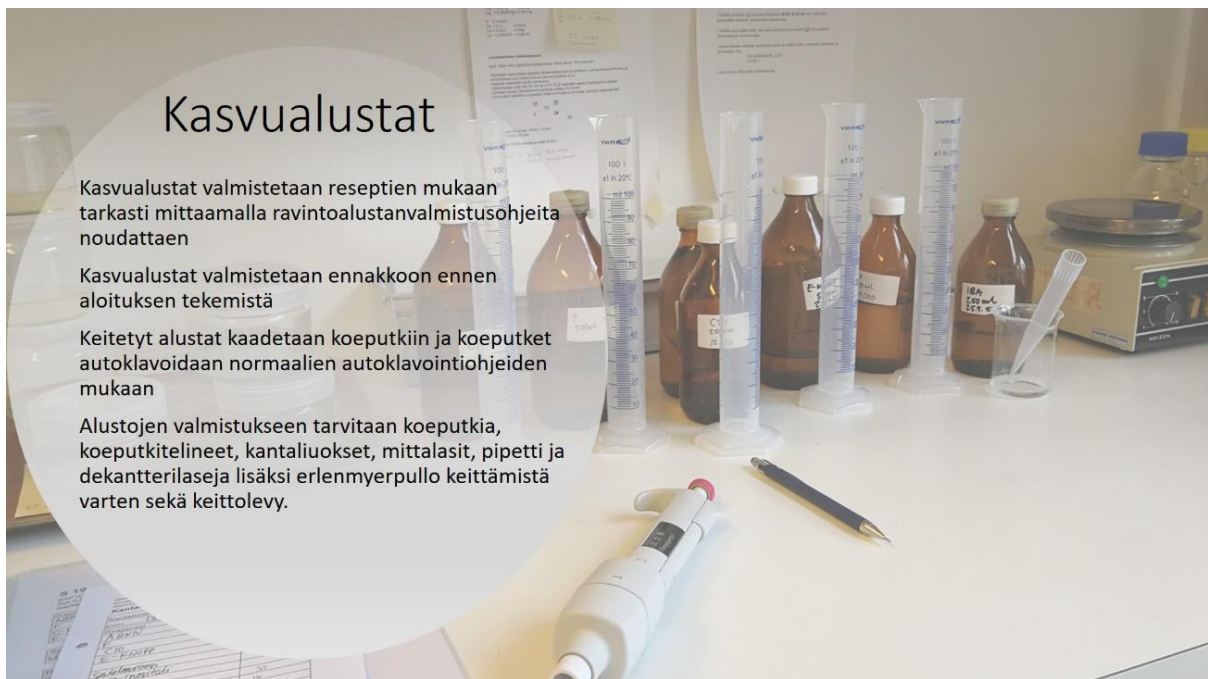
### 6.2 Kasvualustan jakaminen ja sterilointi

Kasvualustan keityttyä ohjeiden mukaan ja kun alusta näyttää erlenmeyerissä kirkkaalta ja tasaiselta, voidaan alusta jakaa kaatamalla. Jakaminen tapahtuu kannun ja mittalasin avulla. Alustan määrä mitataan ja oikea määrä kaadetaan koeputkeen.

Koeputket asetellaan ennen kaatamista valmiiksi koeputkitelineisiin suuaukot ylöspäin. Alustaa kaadetaan erlenmeyeristä kannuun. Jos alustaa jää, loput laitetaan keittolevyille sekoittumaan ilman lämmitystä, jotta alusta ei ala jähmettyä. Kannusta kaadetaan alustaa mittalasiin, josta oikea määrä alustaa kaadetaan koeputkeen. Kun alusta on jaettu, voidaan korkit laittaa suunnilleen paikoilleen, ei kuitenkaan kokonaan kiinni.

Autoklaavinkestävät koeputkitelineet voidaan laittaa koeputkien kanssa autoklaaviin. On kuitenkin mahdollista laittaa koeputket myös esimerkiksi lasipurkeissa pystyssä au-

toklaaviin. Alustan sterilointiin käytetään autoklaavin ohjelmaa, jossa alustat lämmitetään 120 asteeseen riippuen alustasta ja autoklaavista noin 15 minuutista 23 minuuttiin. Sterilointiaika voi vaihdella laboratoriokohtaisesti riippuen laitteistosta.



## Kasvualustat

Kasvualustat valmistetaan reseptien mukaan tarkasti mittaamalla ravintoalustanvalmistusohjeita noudattaen

Kasvualustat valmistetaan ennakkoon ennen aloituksen tekemistä

Keitetyt alustat kaadetaan koeputkiin ja koeputket autoklavoidaan normaalien autoklavointiohjeiden mukaan

Alustojen valmistukseen tarvitaan koeputkia, koeputkitelineet, kantaliuokset, mittalasit, pipetti ja dekanterilaseja lisäksi erlenmyerpullo keittämistä varten sekä keittolevy.

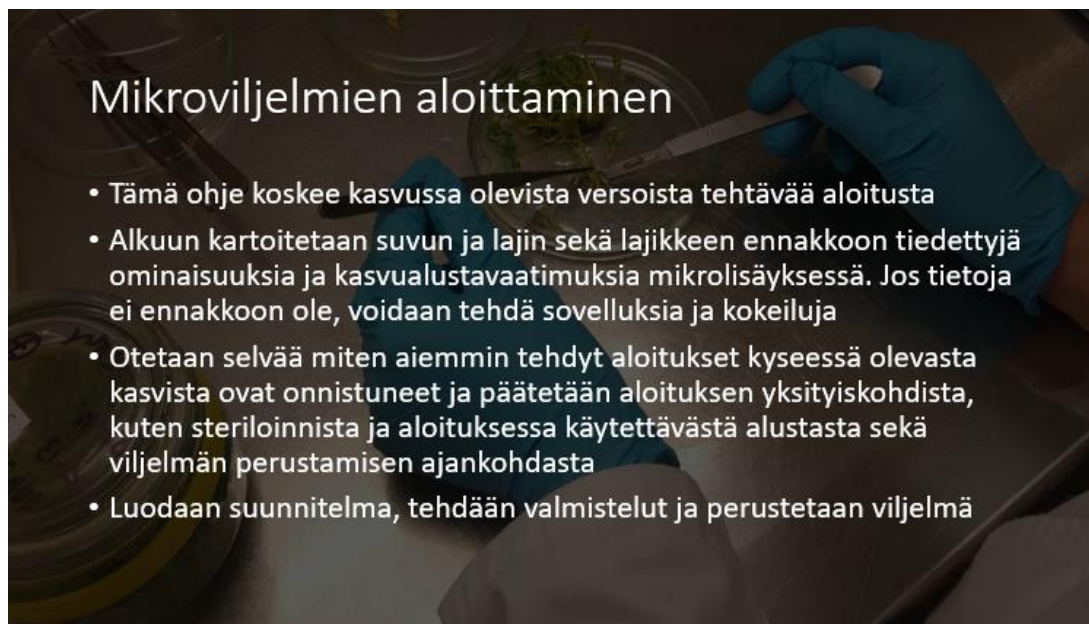
Jos käytössä on foliotaitoskorkit, autoklavoidaan alusta muovikorkillisessa keittopullossa korkki löysästi kiinni samoin periaattein kuin muovikorkein varustetut alustat. Tämä tulee huomioida jo alustan keittovaiheessa sekä valmisteluvaiheessa koeputkien ja mittausvälineistön steriloinnin osalta. Kun pullot on autoklavoitu, suljetaan pulloista korkit. Pullot avataan uudelleen laminaarissa, kun aletaan kaataa laminaariin valmiiksi valmisteltuihin koeputkiin alustaa. Foliokorkit suljetaan kunkin koeputken päälle ensin liekittämällä spriiilampulla foliotaitosneliön keskiosaa ja koeputken suuta pitäen pinseillä kiinni ja sitten painaen taitos suosan päälle. Foliokorkit on hyvä sulkea varmistaen vielä parafilmiliuskalla. Parafilmistä leikataan noin sentin levyinen ja vähintään viiden sentin pituinen kaistale, joka venytetään folion ja koeputken liitoskohtaan muutaman kerran putken kiertäen.

## 7 VIJELMÄN PERUSTAMINEN

Viljelmän perustaminen tapahtuu valmistelu- ja suunnitteluvaiheen jälkeen. Mikroliksäyviljelmän perustaminen vaatii aikaa tekijän kokemuksesta ja nopeudesta sekä tietojen omaksumisesta riippuen aluksi reilustikin, jopa useita tunteja. Ajankulutus riippuu tietysti myös aloitettavan viljelmän aloitusversojen määrästä sekä sterilointitekniikasta. Mitä enemmän versoja laitetaan aluksi kasvamaan, sitä enemmän joudutaan tekemään



töitä laminaarin puolella. Aikaa tulee varata kuitenkin reilusti, jotta työssä ei tule kiire ja pystytään aloittamaan viljelmä ilman virheitä.



### 7.1 Lisäysmateriaalin leikkaaminen

Emotaimesta, joka on huolella valittu ja tarkistettu otetaan lisäysmateriaalia mikrolisäysaloitusta varten. Aloitettavan viljelmän suuruudesta riippuen lasketaan jo aloitusmateria emokasvista leikattaessa, paljonko aloitusmateriaalia tarvitaan viljelmän aloittamiseksi. On järkevää leikata hieman enemmän aloitusmateriaalia, kuin minkä kokoinen aloitusviljelmä on suunniteltu tehdä, sillä laminaarityöskentelyssä aloituspaloja saattaa pudota tai leikkaamisen epäonnistuttua mennä käyttökelvottomiksi. Lisäksi alkuvalmisteluja tehdessä, ennen laminaarityöskentelyä, voidaan vielä hylätä silmuja, mikäli niissä huomataan jotakin poikkeavaa tai esimerkiksi mutaatioita.

Versoja leikataan saksilla tai veitsellä valitusta emosta. Versot asetetaan leikkauspinta veteen riittävän isoon astiaan, esimerkiksi kannuun.

### 7.2 Sterilointitekniikka

Mikrolisäysaloituksia tehtäessä aloitusmateriaali kerätään yleensä oloista, joissa valloillaan kasvavat kasvin kanssa rinta rinnan bakteerit, sienet, tuholaiset, hiivat ja saprofyttiset sienet. Sterilointi suoritetaan aloitusmateriaalille aina aloituksia tehtäessä. Pintakäsittely tehdään viljelmiä aloitettaessa, jotta voidaan taata riittävä torjunta enimpiä viljelmiä vaarantavia tekijöitä vastaan. Sterilointi tarkoittaa kasvin pinnan puhdistamista näistä tekijöistä. Steriloinnilla ei pyritä poistamaan tauteja, mikäli niitä esiintyy emokasvissa vaan pelkästään ulkoisia tekijöitä. Tämän vuoksi emokasvin valinnassa on kiinnitettävä huomiota tautivapaan yksilön valintaan. Pinnan puhdistaminen eli sterilointi tunnetaan myös nimellä pintasterilointi.

Kasvin pinnalla olevat kontaminantit tulee poistaa ennen viljelmän aloittamista, sillä ne jatkavat kasvuaan koeputkissa aloitusmateriaalin kanssa. Kontaminanttien kasvaessa ne valtaavat kasvutilan versolta ja pahimmillaan hukuttavat kasvavan version alle. Kasvualustan ravinteet on suunniteltu tukemaan tietynlaista kasvua ja antamaan aloitetulle versolle mahdollisimman hyvän kasvuun lähdön ainekset. Kun alustasta ottaa esimerkiksi jokin sieni ravinteita omaan käyttöönsä, syntyy kilpailua ravinteista ja version kasvu saattaa jäädä vähäiseksi tai loppua kokonaan ravinteiden puutteen vuoksi. Kasvin pinnalta poistettaessa nämä tekijät eivät myöskään pääse muodostamaan kasvualustaan myrkyllisiä aineita, jotka saattaisivat olla haitaksi aloitukselle.

Sterilointitekniikoita löytyy runsaasti erilaisia. Vaihtelua saattaa esiintyä aina sterilointiaineen, sterilointiajan, sterilointiaineen vahvuuden ja työjärjestyksen välillä. Sterilointiin käytettäviä aineita ovat esimerkiksi natriumhypokloriitti, etanoli, bromivesi, antibiootit, kalsiumhypokloriitti, vetyperoksidi ja elohopea(II)kloridi.

Steriloinnin suunnittelussa otetaan huomioon kasvin fysiologia ja mietitään sen ominaisuuksien mukaan paras pintasterilointitapa. Sterilointiajalla tai laimeammalla sterilointiliuoksella voidaan säätää pintasteriloinnin voimakkuutta. Laimeammalla liuoksella steriloidessa sterilointiaikaa voidaan myös vastaavasti pidentää. Tarkkoja aikoja on vaikea sanoa, koska tilanne on aina kasvikohtainen ja riippuu ulkoisista tekijöistä. Jos voimakkuuden säätö aiheuttaa kontaminaatioita haitaksi asti, voidaan viljelmä aloittaa talvella jolloin ulkoiset tekijät vaikuttavat vähemmän. Jos aloituksessa kuolee selvästi suuri määrä versoja tai ne ovat pahoin vaurioituneita pintasteriloinnin jälkeen, voidaan silloin steriloinnin voimakkuutta säätää laimeammaksi. Voimakkuuden säätäminen on ajasta ja liuoksen voimakkuudesta riippuva, silloin laimeammalla liuoksella voidaan saada vähemmän solukkovaurioita aikaan, mutta myös kontaminantit saattavat jäädä oleilemaan kasvin pinnalle. Liian voimakas liuos saattaa tuhota kasvin solukkoa liian paljon. Suhde on säädettävä oikeaksi kunkin kasvin kohdalla. Oikean voimakkuuden valintaan voidaan käyttää apuna kirjallisuutta. Puuvartiset kasvit kastetaan yleensä alkoholissa ennen vahvempaa sterilointia, tämä ei ole kaikille kasveille tarpeen.

### 7.3 Sterilointityö

Ennen steriloinnin aloittamista tulee valmistella laminaarivirtauskaappi käyttökuntoon. Kaikki välineet ja tarpeelliset tavarat pyyhitään sisään.

Yllättäviin tilanteisiin tulee varautua. Työvälineitä ja steriloituja astioita tulee valmistella enemmän kuin yhteen aloitukseen tarvitaan, jotta foliokansirikkojen tai välineiden saastumisen ei tarvitse keskeyttää aloitustyötä.

Muistilista työvälineistä:

- kaksi lyhyttä pinsettiä, kaksi veistä ja kaksi steriiliä terää, kaksi pitkää pinsettiä
- Steriloitua ioninvaihtovettä riittävästi, muutamia litroja steriloituna pullossa
- Välineiden sterilointiin käytettävä lasihelmisterilisattori
- koeputket, joissa valmistettu alusta
- 5 x pieni steriloitu dekantterilasi (noin 100 ml) tai pieni lasipurkki, kaksinkertainen folioneliö kansi

- 2 x iso steriloitu dekantterilasi (noin 300 ml), kaksinkertainen folioneliö kansi
- Työvälineitä: kaksi veistä sekä terät ja kahdet lyhyemmät pinsetit, yhdet tai kahdet pitkävartiset pinsetit
- Steriloitu haihdutusmalja välineitä varten laminaariin
- Jos käytössä on lasiset petrimaljat eli haihdutusmaljat, tulee ne laittaa myös steriloitumaan ennen käyttöä lämpökaappiin. Muovisia kertakäyttömäljoja käytettäessä saatavuus varmistetaan etukäteen
- Siivilä versojen puhdistamiseen
- Pehmeä hammasharja
- Koeputkissa olevat alustat valmistellaan etukäteen ja niiden oikea koostumus tarkistetaan ennakkoon, käytettävät alustat valitaan ennen valmistamista. Koeputkien siirtelyyn ja säilyttämiseen koeputkitelineitä
- Tween20 ja pipetti annosteluun
- Natriumhypokloriitti
- Etax 70 % ja Etax 96 % sekä spriilamppu ja tulitikut
- Hengityssuoja ja tarvittaessa suojakäsineet
- Kello ajanottoa varten
- Foliotaitoskannet

#### Lisäksi

- Desinfiioivaa saippua versojen pesuun
- Muistiinpanovälineet ja raporttipohja

## Laminaarikaapin valmistelu

Välineet pyyhitään alkoholilla valmiiksi puhdistettuun laminaarikaappiin yleisten ohjeiden mukaan

Bunsenlampun polttonesteen määrä on hyvä tarkistaa laminaariin siirrettäessä ja suorittaa täyttö mikäli tarpeen, jotta työ ei myöhemmin keskeytyisi

Folioihin käärittyjen astioiden kääreet tarkastetaan alkoholilla pyyhittäessä ja kansien eheys tarkistetaan, jotta mahdolliset saastunnat tätä kautta voidaan estää

Tarvittavista välineistä löytyy muistilista tästä oppaasta



## Natriumhypokloriitti

- Natriumhypokloriitti eli NaOCl
- Valmistetaan etukäteen ennen steriloinnin aloittamista
- Steriloinneissa voidaan käyttää eri vahvuisia ja eri aineita sterilointiin. Sterilointiaineena tässä steriloinnissa käytössä oleva natriumhypokloriitti valmistetaan vahvemmasta hypokloriittiliuksesta laimentamalla
- Lasketaan prosenttiluvun mukaan kuinka paljon vahvaa liuosta kaadetaan mittalasiin ja paljonko lisätään ioninvaihtovettä, jotta saadaan halutun vahvuinen liuos
- 1 %:nen hypokloriittiliuos valmistetaan mittalasiin, jotta se voidaan kaataa suoraan laminaarin ulkopuolelta laminaarin sisällä olevaan dekantterilasiin.



### Työvaiheet:

1. Valmista valmiiksi natriumhypokloriittiliuos. Steriloinnista riippuen vahvuus voi vaihdella, tässä ohjeessa kuvatussa steriloinnissa käytetään 1 %:sta liuosta. Ennen liuoksen valmistamista mittalasiin, huuhtelee mittalasi 70 %:lla Etaxilla ja ioninvaihtovedellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää foliokannen kanssa steriloitua mittalasia.
2. Ulkoa sisälle tuodut lehdessä olevat versot pestään irtoliasta ja mahdollisista tuholaisista ennen laboratorioon viemistä. Tässä vaiheessa voidaan leikata lehdet pois siten että jäljelle jää lehtiruodista pätkä.
3. Kuljetusastia pyyhitään 70 % Etax:illa laboratorioon siirrettäessä
4. Leikatut versot pestään pehmeällä hammasharjalla hanaveden alla. Harjaa silmuista pois päin yhdensuuntaisin harjauksin. Pese pois irtolika
5. Pitkistä versoista leikataan saksilla tai veitsellä sopivia aloituspalasia. Pala leikataan silmun kohdalta, silmun ylä- ja alapuolelle jätetään vartta, joka suojaa silmua. Jätettävän varren pituus riippuu kasvusta, mittaan täytyy varata tilaa leikata kuollutta solukkoa steriloinnin jälkeen. Tässä vaiheessa leikataan lehdet pois, ellei sitä ole tehty jo ennen laboratorioon viemistä
6. Aloituspalat laitetaan dekantterilasiin, johon laitetaan 100 ml ioninvaihtovettä ja 3 tippaa erisept- saippuaa. Vesi-saippuaseosta tulee laittaa niin paljon, että versot peittyvät.
7. Versonpalat siirretään dekantterilasissa magneettisekoittajalle, sekaan lisätään magneettisauva. Versoja sekoitetaan tasan 10 minuuttia.
8. Sekoitettut aloituspalat huuhdellaan siivilässä ioninvaihtovedellä.
9. Palat kaadetaan siivilästä petrimaljalle, johon kaadetaan ioninvaihtovettä ja kansi suljetaan.
10. Suljettu haihdutusmalja pyyhitään alkoholilla laminaarivirtauskaappiin. Samaan aikaan pyyhitään myös ajanottokello laminaariin.
11. Aloituspalat siirretään pinseteillä petrimaljalta pieneen dekantterilasiin, johon on kaadettu valmiiksi steriloitua ioninvaihtovettä siten, että versot peittyvät

12. Asetetaan ajanottokello ottamaan aikaa 30 sekuntia. Ison dekantterilasin pohjalle siirretään huuhdellut versot pinseteillä ja päälle kaadetaan 70 % alkoholi 150 ml. Versoja huljutellaan 30 sekuntia.
13. Versot siirretään pieneen dekantterilasiin, johon on kaadettu ioninvaihtovettä.
14. Ison dekantterilasin pohjalle tiputetaan Tween20:tä 3 tippaa /100 ml. Ajanottokello asetetaan mittaamaan aikaan 10 minuuttia.
15. Aloituspalat nostellaan Tween20:n päälle dekantterilasiin ja alkoholilla pyyhitty magneettisauva laitetaan niiden kanssa. Päälle kaadetaan natriumhypokloriittiliuos (1%) 150 ml. Suljetaan dekantterilasi foliokannella tiiviisti ja nostetaan astia magneettisekoittajalle ulos laminaarista. Palasia sekoitetaan 10 minuuttia.
16. Ajan kuluessa voidaan valmistella tarvittavia tavaroita valmiiksi laminaariin
17. Astia pyyhitään takaisin laminaariin ennen ajan loppumista ja ajan loputtua versot nostellaan pinseteillä pieneen dekantterilasiin, johon on kaadettu valmiiksi steriloitua ioninvaihtovettä. Suljetaan foliokansi ja asetetaan kello yhden minuutin päähän. Minuutin kuluttua aloituspalat siirretään pinseteillä seuraavaan pieneen dekantterilasiin, johon on valmiiksi kaadettu ioninvaihtovettä. Suljetaan foliokansi ja asetetaan kello kahden minuutin päähän.
18. Kahden minuutin kuluttua aloituspalat siirretään pinseteillä seuraavaan pieneen dekantterilasiin, johon on kaadettu ioninvaihtovettä. Suljetaan foliokansi ja asetetaan kello viiden minuutin päähän.
19. Viiden minuutin kuluttua aloituspalat siirretään pinseteillä seuraavaan pieneen dekantterilasiin, johon on valmiiksi kaadettu ioninvaihtovettä. Suljetaan foliokansi ja asetetaan kello 10 minuutin päähän.
20. 10 minuutin kuluttua sterilointi on valmis ja aloituspaloja aletaan siirrostaa petri-maljalla koeputkiin laitettavaksi.
21. Leikkaa aloituspaloista kuollut solukko pois ja pitkien pinsettien avulla siirrä aloituspala koeputkeen. Kuollut solukko näkyy harmahtavana leikkauspintojen läheisyydessä. Alapuolen tulee jäädä pidemmäksi kuin silmun yläpuolella olevan osan.
22. Ota pinseteillä foliotaitoksen reunasta kiinni ja liekitä keskikohta foliosta ja liekitä koeputken suu kauttaaltaan ympäri. Paina pinsettien avulla folion liekitetty osa suuaukon päälle ja paina kädellä edelleen pinseteillä kiinni pitäen folion reunat alas. Tätä työvaihetta helpottaa, kun koeputken liekittämisen jälkeen asettaa putken koeputkitelineen tyhjään nurkkaan ja asettaa sitten taitoksen paikalleen. TAI jos käytössä muovikorkit, liekitetään muovikorkin ja koeputken suut ja asetetaan sitten korkki paikalleen.
23. Foliotaitoksen paikallaan pitämisen varmistamiseksi folion ja koeputken liitoskohdan ympärille venytetään parafilmisuikale. Parafilmistä leikataan valmiiksi puolentoista sentin levyisiä ja noin kymmenen sentin pituisia suikaleita, jotka venytetään koeputken ympärille foliokorkin ja koeputken yhteen sitomiseksi ennen putkien ulos laminaarista siirtämistä.
24. Koeputket merkitään käyttäen tussia. Koeputken kylkeen kirjoitetaan aloituksen päivämäärä, kasvin koodi, alustan koodi ja alustan valmistuspäivämäärä. Merkitsemiseen voidaan käyttää myös tarroja.

## Aloitusmateriaalin leikkaaminen

- Aloituksen käytettävä kasvimateriaali ei saa olla liian puutunutta
- Sopivat palat löytyvät yleensä versojen kärjistä, missä solukko on iältään nuorinta
- Puutumisen voi tarkistaa versoa taivuttamalla
- Leikatessa tulee kiinnittää huomiota kasvin terveyteen ja valita vain parhaat kohdat aloitusmateriaaliksi
- Versojen kärjistä leikataan pätkiä riippuen kasvin kasvusta aina puutuneeseen osaan asti tai tarvittaessa lyhyemmältä
- Leikkauskohta on verson varressa ennen lehteä ja lehden hangassa olevaa silmua. Leikatessa pitää jättää välimatkaa silmuun, jotta se ei tuhoudu. Leikkaaminen voidaan suorittaa saksilla tai veitsellä, mahdollisimman siististi.
- Leikatut versot asetetaan astiaan imupinta veteen päin. Vetenä voidaan käyttää tavallista hanavettä.



## Sterilointi – versojen esipesu

Ulkoa sisälle tuodut lehdessä olevat leikatut versot pestään irtoliasta ja mahdollisten tuholaisten varalta hanavedessä ja kuljetukseen käytettävä astia huuhdellaan ja pyyhitään 70 % Etax:lla laboratorioon siirrettäessä

Leikatut versot pestään pehmeällä hammasharjalla hanaveden alla laboratorion puolella. Harjaa silmuista pois päin yhdensuuntaisin harjauksin. Pese pois irtolika

Tässä vaiheessa leikataan lehdet pois siten, että jäljelle jää lehtiruodista pätkä.

Materiaali siirretään laboratorion puolelle ja lehdet poistetaan leikkaamalla lapaosuus pois jättäen ruodit verson varteeseen pystyyn



## Sterilointi - saippuapesu

Aloitusversoja pestään saippuavedessä 10 minuutin ajan magneettisekoittajassa samalla pyörittäen.

Saippuaa laitetaan 3 tippaa / 100 ml ioninvaihtovettä leikattujen versonpalojen päälle isoon dekanterilasiiin

Vesi-saippuaseosta tulee laittaa niin paljon, että versot peittyvät.

Aloituspalat siirretään dekanterilasissa magneettisekoittajalle, sekaan lisätään magneettisauva. Palasia sekoitetaan 10 minuuttia, aikaa mitataan munakellolla.

Magneettisekoittajaa ei tule laittaa liian koville kierroksille pyörimään, sillä se saattaa vahingoittaa aloitusmateriaalia. Kierrosnopeus riippuu laitteesta, ohjenuorana voidaan pitää sitä, että versojen tulee olla kokoajan liikkeessä saippuavedessä ollessaan pesuvaiheessa.

## Sterilointi – esipesun jälkeinen leikkaus

Kun versot on harjattu vahingoittamatta niitä ja lehdet poistettu voidaan harjatut versot leikata sopiviin pätkiin ja pudottaa ioninvaihtoveteen isoon dekanterilasiin.

Sopivankokoinen pätkä saadaan kun pitkistä versoista leikataan saksilla tai leikkuulaudalla veitsellä sopivia aloituspalasia leikkaamalla silmun kohdalta silmun ylä- ja alapuolelle jätetään varrtta, joka suojaa silmua.

Jätettävän varren pituus riippuu kasvusta, mittaan täytyy varata tilaa leikata kuollutta solukkoa steriloinnin jälkeen - alapuolelta hieman pidemmältä varsi poikki kuin yläpuolelta.



## Saippuapesun huuhtelu

Magneettisekoittamisen jälkeen aloituspalat ja saippuavesi kaadetaan siivilään ja huuhdellaan siivilässä hyvin ioninvaihtovedellä

Saippua tulee huuhdella huolellisesti pois

Palat kaadetaan siivilästä haihdutusmaljalle



## Versojen siirto laminaariin

Versot kaadetaan siivilästä haihdutusmaljalle, magneettisauva saa kulkeutua mukana maljalle

Haihdutusmaljalle lisätään ioninvaihtovettä ja kansi suljetaan

Suljettu haihdutusmalja pyyhitään alkoholilla laminaariin. Samaan aikaan pyyhitään alkoholilla myös ajanottokello laminaariin.

Haihdutusmalja pidetään suljettuna, kunnes versot on saatu laminaarikaapiin sisäpuolelle

Viimeistään tässä vaiheessa pyyhitään myös muut tarvittavat välineet laminaariin sterilointia varten

Välineet ja tavarat voidaan järjestellä monella tavalla, pääasia järjestyksessä kuitenkin on se, että tekijä pysyy kartalla siitä mitä on tekemässä ja välttää turhia kosketuksia puhtauden säilyttämiseksi



## Sterilointikäsittely – Etax 70 %

- Versot nostellaan pinseteillä ison dekanterilasın pohjalle ja ajanotto kello asetetaan valmiiksi ottamaan aikaa 30 sekuntia
- Etaxia kaadetaan versojen päälle dekanterilasiin
- Foliokansi suljetaan ja ajanotto laitetaan päälle
- 30 sekunnin kuluttua versot nostellaan seuraavaan astiaan



## Sterilointikäsittely - hypokloriitti

- Hypokloriittikäsittely on steriloinnin voimakkain osuus
- Pyyhi magneettisauva laminaariin ja pudota se NaOCl merkinnällä varustettuun dekanterilasiin
- Versot nostellaan pinseteillä dekanterilasın pohjalle
- Versojen päälle tiputetaan pipetillä Tween20 3 tippaa / 100 ml
- Ajanottokello asetetaan ottamaan aikaa 10 minuuttia ja versojen päälle kaadetaan valmiiksi laimennettu 1%:nen natriumhypokloriittiliuos.
- Foliokansi suljetaan tiiviisti ja kello laitetaan päälle
- Dekanterilasi nostetaan ulos laminaarista magneettisekoittajan päälle ja versoja sekoitetaan rauhalliseen tahtiin, kuitenkin siten, että versot ovat liikkeessä
- Käsittelyajan loppupuolella sekoitus lopetetaan ja dekanterilasi pyyhitään takaisin laminaariin



### Huuhtelu

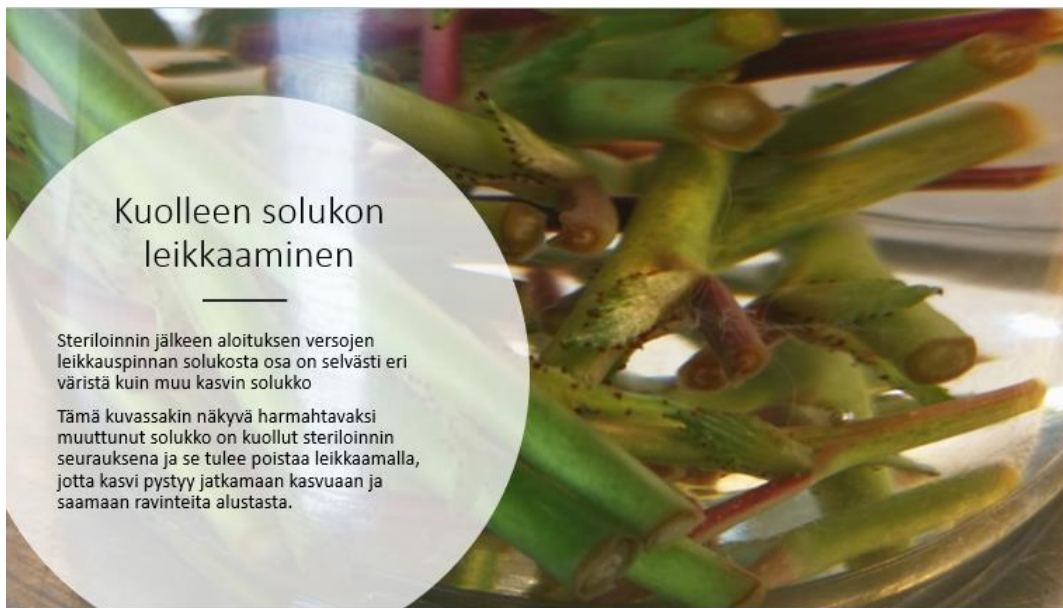
Natriumhypokloriittikäsittelyn jälkeen versot huuhdellaan neljään kertaan steriloidulla ioninvaihtovedellä

Versot siirretään pinseteillä hypokloriitista dekanterilasiin numero 1. Suljetaan foliokansi ja asetetaan kello yhden minuutin päähän.

Minuutin kuluttua aloituspalat siirretään pinseteillä dekanterilasiin numero 2, johon on valmiiksi kaadettu ioninvaihtovettä. Suljetaan foliokansi ja asetetaan kello kahden minuutin päähän.

Huuhtelut kolme ja neljä toistetaan samalla tavalla. Kolmannen huuhtelun pituus on 5 minuuttia ja neljännen huuhtelun pituus on 10 minuuttia.





## Kuolleen solukon leikkaaminen

Steriloinnin jälkeen aloituksen versojen leikkauspinnan solukosta osa on selvästi eri väristä kuin muu kasvin solukko

Tämä kuvassakin näkyvä harmahtavaksi muuttunut solukko on kuollut steriloinnin seurauksena ja se tulee poistaa leikkaamalla, jotta kasvi pystyy jatkamaan kasvuaan ja saamaan ravinteita alustasta.

## Siirrostus koeputkiin

Sterilointikäsitellyt ja huuhdellut aloituspalat siirrostetaan koeputkiin kasville sopivalle alustalle

Huuhteluviedestä otetusta verson palasta leikataan haihdutusmaljalla vaurioitunut solukko pois. Jokainen aloituspala leikataan omalla haihdutusmaljallaan ja välineet steriloidaan työn välissä.

Koeputken korkki nostetaan pöydälle suuaukko ylöspäin, verson pala asetetaan alustalle putkeen pitkällä pinseteillä. Putken suu liekitetään bunsenlampun liekissä liikuttaen kolmen sekunnin ajan, samoin tehdään korkille ennen paikalleen asettamista.



### 7.4 Raportointi, merkinnät ja muistiinpanot

Viljelmän perustamiseen oleellisesti kuuluu työn raportointi. Työ tulee raportoida, koska tulevaisuudessa samaa aloitusta tehdessä halutaan tietää, kuinka sterilointi on onnistunut, mitä sterilointia on käytetty tai miten ylipäätään koko työ on onnistunut.

Raportointiin voidaan rakentaa oma pohja, johon tiedot täytetään tai kirjoittaa sanallisesti, kuinka asiat on tehty ikään kuin muistiinpanoina.

## Muistiinpanot ja merkinnät

Jokaiseen koeputkeen tulee merkitä kyseessä oleva alusta joko tussilla tai Meto -hintalappulaitteella, lisäksi merkitään valmistuspäivämäärä.

Alustan tietojen ohteen merkitään aloitettavan kasvin tiedot lyhennetyksi numeron tai koodinimen taakse. Viljelmän perustamispäivämäärä tulee myös merkitä näkyviin. Jos tehdään useita eriä, voidaan seurannan helpottamiseksi lisätä eränumero.

Koeputket siirretään viljelyhuoneeseen koeputkelineissä.



## Raportointi

Viljelmää perustettaessa täytetään raporttilomake, johon merkitään kaikki olemassa olevat tiedot ylös.

Raportin ohteen on hyvä tehdä muistiinpanoja itseään varten ja myöhempiä aloituksia silmällä pitäen.

Ylös on hyödyllistä merkitä alustojen tietojen yhteyteen miksi kyseiset alustat on valittu

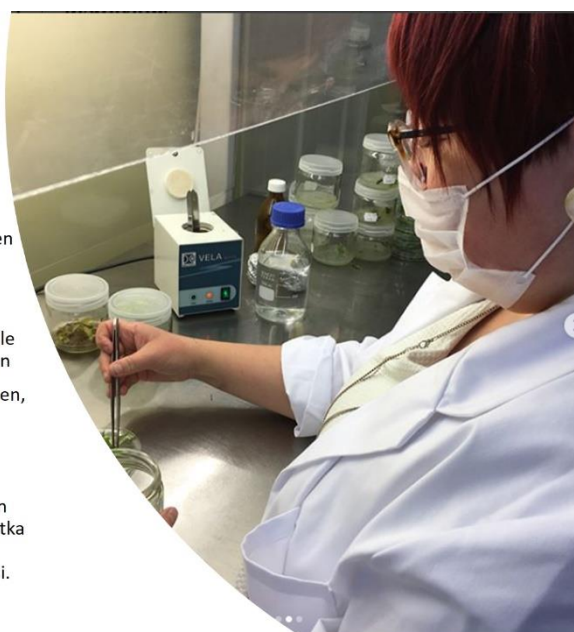
Muistiin kannattaa merkitä myös missä emo on kasvanut ja kuvailla yksilön ikä ja kasvun pääpiirteet

Kaikki epäonnistumisetkin kannattaa kirjata, niistä voidaan oppia myöhemmin!



## Hyvä muistaa

- Sterilointityö tulisi suorittaa kokonaan loppuun asti ennen keskeyttämistä. Varsinkin, kun asia on uusi ja työvaiheet eivät ole tuttuja, sillä tämä lisää varmuutta aloituksen onnistumiseen
- Sattuneet virheet tulee kirjata, jotta voidaan saada selville saastuntojen alkuperä ja tulkita tulevaa kasvua paremmin
- Korkitusvaihetta aloituksessa on hyvä harjoitella etukäteen, varsinkin jo käytössä on foliotaitoskorit
- Työvälineitä tulee muistaa steriloida, liian kuumilla työvälineillä työskentelyä tulee välttää
- Muistathan, että alkoholin ja tulen ollessa samaan aikaan laminaarissa, tulee noudattaa varovaisuutta. Välineet, jotka ovat olleet alkoholissa, on hyvä huuhtoa ennen lasihelmisterilaattoriin laittamista syttymisen estämiseksi. Lisäksi alkoholilla pyyhittyjä käsiä on syytä varoa liekityksessä syttymisvaaran takia



Kuva: Kaisu Avotie 2017

## 8 VIJELMÄN PERUSTAMISEN JÄLKEEN

### 8.1 Viljely lyhyesti

Aloituspaloja, jotka on asetettu kasvualustalle koeputkiin, kasvatetaan kolmesta kuu-teen viikkoa, kunnes kasvi aloittaa kasvunsa ja alkaa versomaan. Versoista voidaan ottaa monistuspaloja, jotka sitten jatkavat kasvuaan ja tuottavat lisää kasvimassaa. Tämä kasvanut kasvimassa otetaan uudelleen siirrostukseen kasvuajan jälkeen ja siitä saadaan leikkaamalla monistettua lisää versoja ja siten massa kasvaa. Kasvimassa lisääntyy, mikäli infektiota ei esiinny liikaa ja saadaan versot kasvamaan valituilla alustoilla. Isoiksi kasvaneet versot voidaan siirrostaa mikropistokkaina uudelle alustalle pois koeputkista viljelypurkkeihin. Tämä vaihe on arvioitava tilannekohtaisesti, koska versojen uskotaan kasvavan isossa purkissa. Tästä eteenpäin viljely tapahtuu kuten muillakin mikrolisäyskasveilla.

Kasvatuhuoneen olot pidetään jäähdytyksellä ja lämmityksellä tasaisina. Viljelyhuoneeseen ei päästetä luonnon valoa, vaan lamput valaistaan tarvittava määrä ja valot sammutetaan tietyksi ajaksi päivässä, jotta saadaan aikaan yö.

Kasvatuhuone pidetään siistinä ja pyritään, ettei tilaan pääse tuholaisia tai muita mikrolisäykselle haitallisia tekijöitä.

Mikrolisäysviljelmän aloitusta voidaan pitää onnistuneena, jos 10 % koeputkista pysyy puhtaina aloitettujen putkien kokonaismäärästä. 30 % puhtaina pysyneitä aloitettuja koeputkia kokonaismäärästä voidaan todeta onnistuneen erinomaisesti.

### Kasvuun lähtö



## Viljelmän monistaminen

Koeputkissa kasvuun lähteneet versot otetaan siirrostettavaksi ja kasvuista saadaan uutta kasvimateriaalia

Saadut versot siirretään aloitusalustalta kasvamaan monistusalustalle, jossa ne jatkavat kasvuaan kunnes seuraavan kerran siirrostetaan uutta kasvimateriaalia

Viereisessä kuvassa 3.8.2017 aloitettu *Prunus cerasus* 'Suklaakirsikka' 9.10.2017



### 8.2 Koeputket

Kun perustetaan viljelmiä, lähes poikkeuksetta aina osa kokeessa mukana olevista putkista saastuu tavalla tai toisella. Kontaminoituminen voi johtua ihmisen tekemästä virheestä, korkin kiinnittämisessä sattuneesta virheestä, lisäysmateriaali ei ole täysin puhdistunut ja saastuttaa siten itse kasvualustansa, lisäksi syynä voivat olla epäpuhtaat työvälineet, rikkonainen korkki tai korkin avautuminen huoneilmassa ja lukuisat muut asiat.

Saastunnat pystytään havaitsemaan silmämääräisesti yleensä agarin pinnalta tai versojen osissa kasvavista kasvustoista. Saastumisen syytä voi olla vaikeaa päätellä, mutta joi-takin viitteitä siihen mikä syy voi olla, pystytään katsomaan kirjallisuudesta, mikäli tarvetta selvittämiseksi ilmenee. Yleensä mikrolisäyspurkeista havaittuja kontaminoitumisia ei yritetä tunnistaa, sillä se vaatii harjaantunutta silmää ja bakteerien kasvun tunnistamista ja tuntemista. Infektiot näyttäytyvät erilaisina, jopa saman aloituksen sisällä. Lisäksi ei-haluttujen kasvustojen seuraaminen tunnistamisen helpottamiseksi veisi niin paljon aikaa, että siihen ei ole järkevää käyttää resursseja. Samaa sääntöä sovelletaan koeputkien kanssa, koska saastuntojen kasvustot ovat hyvin samantyyppisiä, vaikka aiheuttajat saattavatkin poiketa toisistaan.

Aina kun laboratoriossa tai viljelyhuoneessa havaitaan saastuminen, on tärkeää poistaa viljelypurkki tai koeputki viljelyhuoneesta ja merkitä saastuneen kasvin sekä alustan tiedot ylös kirjanpitoon. Näin pystytään seuraamaan mitä kasveja saastuu ja voidaan jopa päätellä, onko esimerkiksi alustan tekovaiheessa sattunut virhe, minkä johdosta saastumia esiintyy. Kirjanpidon tärkeys ilmenee, kun saman alustan tai saman kasvin osalta löytyy normaalia enemmän saastuntoja. Silloin pystytään päättelemään alustan tai siirrostuksen tiedoista mahdollisia viitteitä saastunnan aiheuttajaan. Esimerkiksi silloin, jos alustan tekovaiheessa on ilmennyt jokin virhe tai muu seikka, joka edesauttaa ei-haluttujen kasvustojen kasvamista.

Koeputket, jotka ovat saastuneet, tulee pitää suljettuina ja niitä ei saa tyhjentää. Koeputket autoklavoidaan sisältöineen, jotta autoklaavaus tappaisi infektiot. Autoklavointi tappaa kaiken muunkin elollisen putken sisällä, siitä syystä myös kasvi menetetään. Putkien autoklaavauksessa tulee noudattaa ohjeistusta. On tärkeää tyhjentää putkien sisältö heti autoklavoinnin jälkeen ja liottaa putkia desinfioivassa pesunesteessä ja veden seoksessa. Putkien huolellinen puhdistaminen edesauttaa puhtaiden aloitusten tekemisen jatkossa.

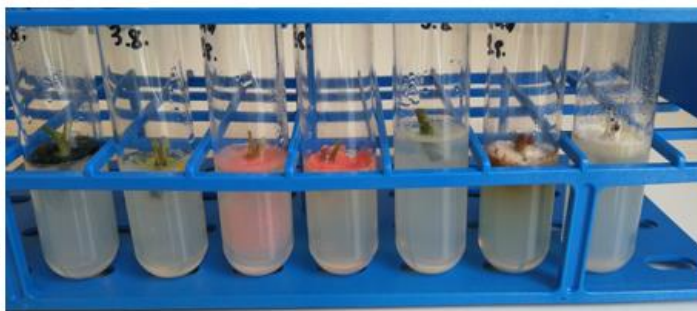
## Viljelmän seuranta

Koeputkia seurataan viikoittain ja tehdään muistiinpanot mahdollisista infektiosta ja kasvun alkamisesta.

Kun kasvu vakiintuu ja infektiota ei enää esiinny säännöllisesti, seuranta voidaan lopettaa.

Oheisesta kuvasta näkee kontaminaatioiden kirjoa. Koeputket tulee tarkistaa huolella, jotta leviämistä vältetään. Infektioputket poistetaan viljelyhuoneesta.

Infektiot aloituskoeputkissa voivat näyttää hyvinkin erilaisilta. Infektioiden löytämistä helpottaa, jos on aiemmin nähnyt kontaminoituneita putkia. Kuvaa varten on koottu erilaisia infektiota aloituksesta, ne näyttävät eri värein ja muodoin.



### 8.3 Infektoituneiden putkien poisto-ohjeet

1. Infektoitumisien varalta suoritetaan tarkkailua viljelyhuoneessa ja infektoituneet putket siirretään pois viljelytilasta ja merkitään muistiinpanot infektoitumisista.
2. Ennen autoklavointia putkista poistetaan parafilmit ja korkit jätetään raolleen auki. Jos kyseessä on muovikorkki (KIMKAP tai muu vastaava), nostetaan korkkia vain hieman ylöspäin. Mikäli korkkeina toimii foliotaitokset, nostetaan niitäkin hieman ylöspäin ja poistetaan parafilmit.
3. Koeputket voidaan laittaa autoklavointia kestävässä koeputkitelineissä autoklaaviin, mutta myös esimerkiksi lasipurkit toimivat hyvin pidikkeinä putkille. Autoklaavin tyyppistä riippuen tulee autoklaavin täyttäminen päättää tapauskohtaisesti.
4. Autoklaavin tyyppistä riippuen valitaan infektioiden puhdistusohjelma tai asetetaan autoklaaviin sterilointiajaksi 21 minuuttia ja 120 °C.
5. Autoklaaviohjelman suoritettua tehtävänsä putket poistetaan laitteesta ja putkien sisältö tyhjennetään kuumana biojätteeseen.
6. Tyhjät putket laitetaan korkkien kanssa likoamaan saippuaveteen ja pestään huolellisesti pulloharjalla. Pestyt putket käännetään väärinpäin koeputkitelineeseen ja tarkistetaan huolellisesti pesutulos saippuakuplien hävittyä. Varo laittamasta kuumia putkia kylmään veteen, ne saattavat rikkoutua lämpötilan vaihtumisen seurauksena.
7. Putket huuhdellaan normaalien pesuohjeiden mukaan, jonka jälkeen huolellinen kuivatus ja varastointi.
8. Jos käytössä on tiskikone, voidaan koeputket esipesun jälkeen pestä koneeseen sopivassa piikkikorissa.

