



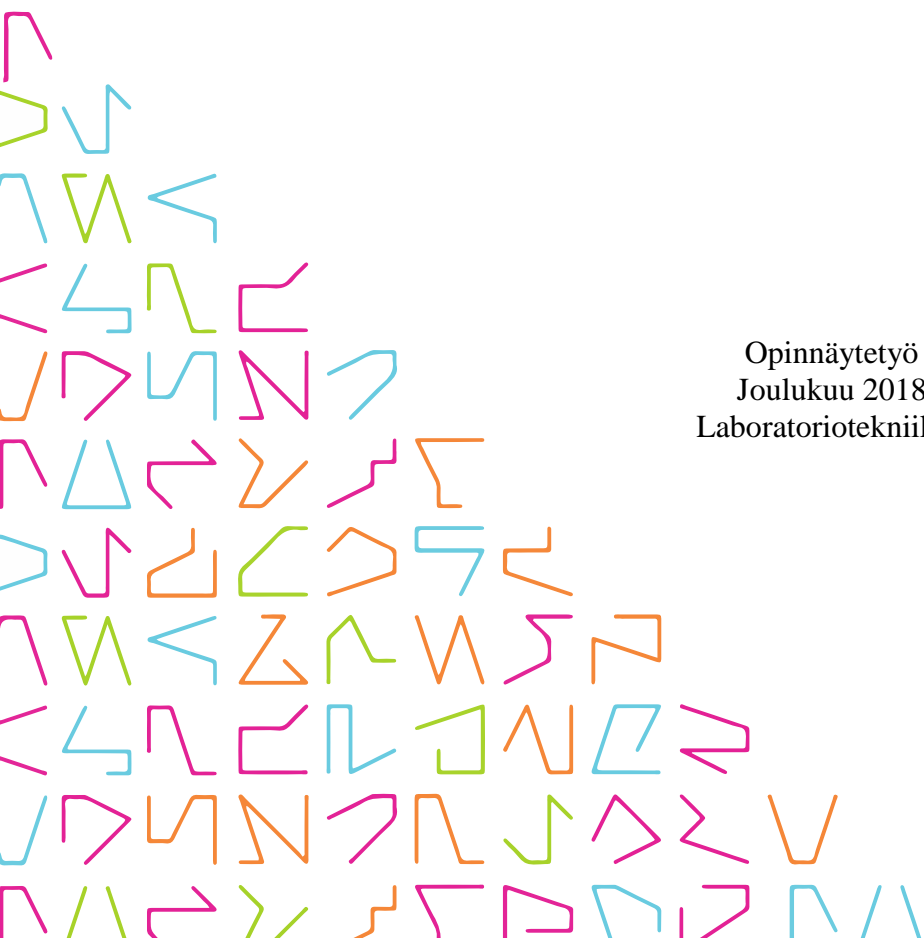
TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KEVÄTVEHNÄN PONSIVILJELY

Menetelmän optimointi

Sonja Pekkarinen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2018
Laboratoriotekniikka



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikka

PEKKARINEN, SONJA:
Kevätvehnän ponsiviljely
Menetelmän optimointi

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 4 sivua
Joulukuu 2018

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Boreal Kasvinjalostus Oy. Työn käytännön osuus suoritettiin Borealin Jokioisissa sijaitsevassa solukkolaboratoriossa. Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia yrityksellä käytössä olevaa kevätvehnän ponsiviljelymenetelmää ja kehittää saatujen tulosten perusteella vähävaiheinen sekä nopea viljelymenetelmä, joka tuottaa hyvin kaksoishaploideja kasveja. Tarkoituksena oli verrata ponsiviljelymenetelmässä käytettäviä kasvualustoja ja vaihtoehtoisia suoritustapoja sekä arvioida niiden vaikutusta menetelmän käytettävyyteen sekä alkioiden ja vihreiden versojen saantoon. Opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin kuuden tutkimustehtävän avulla. Työssä käytetty aineisto koostui kahdesta Borealin kevätvehnälajikkeesta sekä seitsemästä jalostusohjelman linjasta. Opinnäytetyö on osittain salassa pidettävä ja luottamuksellinen aineisto on poistettu julkisesta raportista.

Käytännön osuudesta saadut tulokset jäivät vähäisiksi. Optimointiin käytetty aineisto tuotti huonosti sekä alkioita, että vihreitä versoja. Tämän lisäksi suurin osa kehittyneistä alkiosta ja aikaisessa kehitysvaiheessa olleista versoista kuivuivat kasvatusalustalle. Tästä johtuen potentiaalisten alkioiden kehitys ei edennyt versovaiheeseen, joka vaikutti osaltaan tulosten vähyyteen.

Opinnäytetyön optimaalista tavoitetta ei saavutettu. Vihreiden versojen saanto jäi liian alhaiseksi luotettavien ja perusteltujen johtopäätösten tekemistä varten. Kaikki opinnäytetyössä määritellyt tutkimustehtävät vaativat lisätutkimusten suorittamista. Lisätutkimuksia suoritettaessa tulee kiinnittää erityistä huomiota käytettävään aineistoon. Aineiston tulee olla tämän opinnäytetyön aineistoa laajempi ja sen tulee koostua lajikkeista, joiden tuottavuus on tunnetusti hyvä. Tällöin todennäköisyys riittävien tulosten saantiin kasvaa huomattavasti.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

PEKKARINEN, SONJA:
Spring Wheat Anther Culture
Method Optimization

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 4 pages
December 2018

The thesis was conducted for Boreal Kasvinjalostus Oy`'s cell culture laboratory. The aim of this thesis was to study the anther culture method used at Boreal and to develop a simple and quick cultivation method with good yield based on the results. The purpose was to test alternative methods of execution and to compare three different culture mediums as well as to evaluate their impact on the usability and yield of the method. The thesis is partly confidential. All the confidential material has been removed from the published version of the report.

The practical part of the thesis was carried out with six different research tasks. Two official spring wheat cultivars and seven different crossovers were used as the research material in this thesis.

The aim of the thesis was not achieved. The results gained from the research tasks were low since the number of green sprouts remained low. As a result, reliable conclusions could not be drawn. All the research tasks require further studies. Special attention should be paid to the quality and the amount of the material used. The number of anthers insulated should be higher and only cultivars with a good ability to produce sprouts should be used.

Key words: spring wheat, anther culture, double haploid, androgenesis

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	SIEMENKASVIEN ELINKAARI.....	7
2.1	Siemenkasvin rakenne	7
2.2	Siemenkasvin sykli ja suvullinen lisääntyminen	8
2.3	Mikrosporien ja siitepölyhiukkasten kehitys	9
2.4	Kaksoishaploidia kasvinjalostuksessa	10
3	KEVÄTVEHNÄN PONSIVILJELYMENETELMÄ	12
3.1	Emokasvien keräys ja esikäsittely	12
3.2	Kasvatusalustat	14
3.3	Ponsien eristys induktiovaihetta varten	14
3.4	Alkioiden siirto regeneraatiovaihetta varten	15
3.5	Juurtumisvaihe ja versojen siirto kasvihuoneelle	16
3.6	Kromosomiston kahdentuminen ja tuleentuminen	17
4	TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT.....	18
5	PONSIVILJELYMENETELMÄN OPTIMOINTI	19
5.1	Esivalmistelut.....	19
5.2	Ponsien eristys	20
5.3	Alkioiden siirto ja tarkastukset	21
6	OPTIMOINNIN TULOKSET.....	24
6.1	Tulosten käsittely.....	24
6.2	Induktioalustan vanheneminen	24
6.3	Induktioalustan vähentäminen	26
6.4	Regeneraatioalustojen X ja Y vertailu	28
6.5	Regeneraatioalustojen Y ja Z vertailu	29
6.6	Ruokinnan tarve.....	31
6.7	Alkioiden siirtokoko	33
6.8	Maljaus.....	35
7	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	37
	LÄHTEET.....	40
	LIITTEET	42
	Liite 1. Alustoille X ja Y siirrettyjen alkioiden lukumäärät.....	42
	Liite 2. Versojen saanto X ja Y -alustojen vertailussa	44

1 JOHDANTO

Kasvinjalostuksella tarkoitetaan kasvien ominaisuuksien muokkaamista käyttötarkoitukseen sopivammiksi. Jalostuksen lähtökohtana on kasvien geneettinen monimuotoisuus (Puolimatka & Pauk 1998, 7.) sekä haluttuja ominaisuuksia ilmentävien yksilöiden valinta. Tavoiteltavia ominaisuuksia voivat olla esimerkiksi satoisuus, aikaisuus ja hyvät korsiominaisuudet. Luonnossa esiintyvän vaihtelun ja valintajalostuksen lisäksi nykyaikaisessa jalostuksessa on otettu avuksi risteyttäminen. Haluttuja ominaisuuksia ilmentäviä yksilöitä risteyttämällä saadaan luotua tehokkaasti uusia perintötekijäyhdistelmiä ja edelleen uusia lajikkeita eri käyttötarkoituksiin. (Luonnonvarakeskus 2016.)

Risteyttäminen alkaa valitsemalla sopivat risteytysvanhemmat. Valinta tehdään kasvien ilmentämien ominaisuuksien perusteella. Risteyttäminen tapahtuu pölyttämällä emokasvi toisesta kasvista kerätyllä siitepölyllä. Risteytyksestä saatavista risteytysjälkeläisistä valitaan parhaiten haluttuja ominaisuuksia ilmentävät yksilöt, jotka jatkavat jalostusprosessissa. Uuden lajikkeen jalostusprosessi kestää 10 – 15 vuotta. (Boreal Kasvinjalostus Oy n.d.)

Vehnä (*Triticum aestivum*) on yksi yleisimmistä Suomessa sekä maailmalla viljeltävistä viljoista. Kyseessä on itsepölytteinen viljelykasvi, joka jaetaan lajikkeen kasvumuodon perusteella syys- ja kevätvehnään. Syysvehnä kylvetään maahan syksyllä ja se talvehtii pellossa oraana ennen keväällä alkavaa kasvukautta. Kevätvehnä on kasvumuodoltaan yksivuotinen ja se kylvetään peltoon keväällä kasvukauden alkaessa.

Opinnäytetyö tehdään Jokioisissa sijaitsevan Boreal Kasvinjalostus Oy:n solukkolaboratoriolle. Boreal on vuonna 1994 perustettu yritys, joka syntyi Maatalouden Tutkimuskeskuksen ja Hankkijan kasvinjalostuslaitosten yhdistyessä. Boreal jalostaa peltokasvilajikkeita pohjoisiin kasvuolosuhteisiin. Tärkeimpiä jalostettavia kasveja ovat viljat, härkäpapu, herne sekä nurmi- ja öljykasvit. (Boreal Kasvinjalostus Oy n.d.) Yrityksen solukkolaboratoriossa suoritetaan sekä ponsi- että mikrosporiviljelyä. Tässä opinnäytetyössä käsitellään kevätvehnän ponsiviljelymenetelmää.

Ponsiviljelyllä tarkoitetaan laboratorio-olosuhteissa suoritettavaa viljelyä, jossa kasvin ponnet kerätään emokasvien tähkistä. Ponsi on kasvin siitepölyn sisältävä osa. Verso on

yleisnimitys kasvin maanpäälliselle osalle, johon kuuluvat varsi, lehdet ja kasvin lisääntymiseen liittyvät rakenteet. Kasvatusalustalla eristetyt ponnet muodostavat alkiorakenteita. Kehittyneet alkiorakenteet siirretään sopivan kokoisina uudelle alustalle, jossa ne kehittyvät edelleen versoiksi.

Opinnäytetyön tavoitteena on tutkia käytössä olevaa ponsiviljelymenetelmää ja kehittää uusi, tehokkaampi menetelmä. Tarkoituksena on verrata ponsiviljelymenetelmässä käytettäviä kasvatusalustoja ja suoritustapoja, sekä arvioida niiden vaikutusta menetelmän käytettävyyteen ja saantoon. Opinnäytetyötä varten suunniteltiin kuusi erillistä tutkimustehtävää.

Opinnäytetyö on osittain salassa pidettävä ja siitä laaditaan kaksi erillistä kirjallista versiota. Opinnäytetyön julkaistavasta versiosta jätetään pois menetelmää sekä siinä käytettäviä materiaaleja koskevat yksityiskohdat.

2 SIEMENKASVIEN ELINKAARI

2.1 Siemenkasvin rakenne

Siemenkasvit ovat sammaleiden ja sanikkaisten kanssa versokasveihin kuuluvia, siemenien avulla lisääntyviä kasveja. Siemenkasvit jaetaan paljas- ja koppisiemenisiin kasveihin hedelmän rakenteen perusteella. Vehnä kuuluu koppisiemenisiin, yksisirkkaisiin kasveihin. Yksisirkkaisen kasvin taimelle kehittyy vain yksi alkeislehti. (Fagerstedt, Lindèn, Santanen & Väinölä 2008, 9.)

Siemenkasvin rakenne jaetaan sisäiseen eli anatomiseen ja ulkoiseen eli organologiseen rakenteeseen. Kaikkien kasvien rakenteiden taustalla ovat solut. Kasvisolut kuuluvat aiotumallisiin, eli eukaryootteihin soluihin, jotka ovat kooltaan 5 – 300 µm (Nabors 2004, 29). Kasvisolut ovat kooltaan keskimäärin 10 – 100 µm. Kasvisolujen rakenne koostuu soluseinästä ja protoplastista. Protoplasti on yhteisnimitys solun sisällölle ja siihen lukeutuvat solukalvo, solulima sekä solunesteontelo eli vakuoli. Soluelimet, kuten mitokondriot ja plastidit sekä tuma sijaitsevat solulimassa. (Nabors 2004, 30 – 35, Fagerstedt ym. 2008, 13.) Keskenään samanlaiset kasvisolut muodostavat solukoita, jotka toimivat kasvien rakenteiden perustana (Fagerstedt ym. 2008, 35).

Solun tuma on yksi solun tärkeimmistä osista, sillä se sisältää solun geneettisen tiedon. Tuman ympärillä on kaksinkertainen tumakalvo, jolla on kyky läpäistä molekyylejä. Tumakalvon sisällä on tumalima, jossa tuman kromosomit ja tumajyvänen sijaitsevat. (Fagerstedt ym. 2008, 16.) Kromosomit sisältävät kasvin geenit, jotka koostuvat DNA:sta eli deoksiribonukleiinihaposta. DNA on kiertynyttä molekyyliä, joka koostuu kahdesta rinnakkain toisiinsa sitoutuneesta juosteesta. (Nabors 2004, 31.)

Ulkorakenteeltaan siemenkasvi jaetaan juuriin, varteen ja lehtiin. Loput kasvien tarvitsemat elimet kuten kukat, kehittyvät peruselinten aiheista. Juuret, varsi, johtosolukko ja lehdet vastaavat kasvin veden- ja ravinteiden saannista, niiden kuljetuksesta ja varastoinnista sekä yhteyttämisestä. (Fagerstedt ym. 2008, 35; 61.) Kasvin yhteyttämiskyvystä kertoo lehtien ja varren vihreä väri, joka on peräisin kasviyksilön viherhiukkasista. Kasviyksilö, joka ei kykene yhteyttämään on väriltään valkoinen viherhiukkasten puuttumisen

seurauksena. Tällaista yhteyttämiskyvyttöä kasviyksilöä kutsutaan albiinoksi. Viherhiukkasten puutteen seurauksena yksilö on elinkykyinen vain keinotekoisissa kasvuolosuhteissa, jossa se saa ravintonsa ravinneliuoksesta. (Makowska & Oleszczuk 2013, 386.)

Siemenkasveihin luettavilla viljakasveilla, kuten vehnällä kukinto kehittyy varren yläosassa sijaitsevaan tähkään. Kukinto koostuu verho-, emi- ja hedelehdistä. (Fagerstedt ym. 2008, 35; 61.) Vehnä on kaksineuvoinen kasvi, sillä samassa kukassa on sekä heteitä, että emejä (Väänänen 1967, 38).

Emi on kukan munasolut tuottava naaraspuolinen siitoslehti, joka sijaitsee kukan keskellä. Emin alemmaa, siemenaiheet sisältävää tyviosaa kutsutaan sikiäimeksi. Siitepölyn vastaanottavaa yläosaa kutsutaan luotiksi. Emiä vastaava, kasvin koiraspuolinen siitoslehti on hede. Hede koostuu heteen varresta palhosta sekä ponnesta. Ponsi on kiinni palhon päässä ja se sisältää kasvin siitepölyn. (Fagerstedt ym. 2008, 63.)

2.2 Siemenkasvin sykli ja suvullinen lisääntyminen

Kasvin lisääntyminen voi tapahtua suvullisesti hedelmöitymällä tai suvuttomasti kasvullisten osien avulla kloonautumalla. Siemenkasvien lisääntyminen on suvullista lisääntymistä. Suvullisen lisääntymisen etuna on uusien perintötekijäyhdistelmien jatkuva syntyminen. Sen seurauksena kasvilajin geneettinen monimuotoisuus lisääntyy johtaen kasvilajin jatkuvaan kehitykseen. (Fagerstedt ym. 2008, 123.)

Kasvin luontainen elinkaari jaetaan kahteen vaiheeseen, sporofyyttiseen ja gametofyyttiseen. Sporofyyttisellä vaiheella tarkoitetaan suvullisen lisääntymisen vaihetta. Suvullisessa lisääntymisessä kasvit saavat alkunsa tsygootista, kasvin hedelmöittyneestä munasolusta. (Opetushallitus n.d.) Munasolun hedelmöitys tapahtuu, kun koiraspuolisen kasvin heteiden ponsissa kehittynyt siitepöly kulkeutuu naaraspuolisen kasvin emin luotille. Luotti vastaanottaa siitepölyn ja sen sisältämät gameetit eli sukusolut. (Schwartz, DeBuhr & Addelson 2009.) Hedelmöityksen jälkeen tsygootin kehitys jatkuu ja siitä kehittyy alkio. Alkion kehitys johtaa siemenen itämisen jälkeen uuden kasviyksilön kehitykseen. (Fagerstedt ym. 2008, 123.)

Kasvien sukusolut, gameetit ja munasolut sisältävät yksinkertaisen kromosomiston eli ne ovat haploideja (n). Niiden yhdistyessä hedelmöityksessä syntyvä tsygootti on kromosomistoltaan kaksinkertainen eli diploidi ($n + n = 2n$). (Väänänen 1967, 36.)

Sporofyyttistä vaihetta seuraa gametofyyttinen vaihe, jossa muodostuu sukusoluja. Gametofyyttinen vaihe alkaa reduktiojaosta eli meioosista. Meioosissa tuma jakautuu ja sukusolujen kromosomisto puolittuu haploidiksi kromosomiluvuksi. (Puolimatka & Pauk 1998, 7.) Meioosin ensimmäisessä jakautumisessa vastinkromosomit eli diploidisen solun toisiaan vastaavat kromosomit eroavat toisistaan ja kromosomiluku puolittuu. Meioosin toinen jakautuminen on mitoosin kaltainen. Siinä yksilön solut jakautuvat ja jatkavat kehitystä ilman, että kromosomiluku muuttuu. Kehitys etenee kypsiksi sukusoluiksi. (Halkka 2001.)

2.3 Mikrosporien ja siitepölyhiukkasten kehitys

Mikrosporilla tarkoitetaan kasvin siitepölyhiukkasen esiastetta, joka kehittyy meioosin jälkeen gametofyyttivaiheessa. Mikrosporit syntyvät ponnien sporogeenisestä diploidista solukosta ja niiden kehittymistä kutsutaan mikrosporogeneesiksi. (Puolimatka & Pauk 1998, 8.) Mikrosporogeneesissä diploidiset sporogeeniset solut jakautuvat meioosin seurauksena ja tuottavat haploideja siitepölyhiukkasten emosoluja. Emosolut eli mikrosporit jakautuvat meioosin seurauksena neljäksi haploidiseksi mikrosporiksi. Mikrosporogeneesi päättyy yksisoluisten haploidien mikrosporien muodostumiseen. (University of Leicester n.d.)

Mikrosporien gametogeneesissä eli sukusolujen muodostumisessa yksisoluinen mikrospori kehittyy kypsäksi, sukusolut sisältäväksi gametofyytiksi (University of Leicester n.d.). Yksitumaisen mikrosporin tuma siirtyy mikrosporin seinämää vasten ja jakautuu mitoosissa. Jakautumisen seurauksena syntyy suuri vegetatiivinen ja pienempi generatiivinen tuma. (Puolimatka & Pauk 1998, 9.) Vegetatiivinen tuma ohjaa siiteputken kasvua siitepölyn itäessä (Fagerstedt ym. 2008, 128 – 129). Ensimmäisen jakautumisen jälkeen generatiivinen tuma irrottautuu siitepölyhiukkasen seinämästä ja jakautuu edelleen kahdeksi uudeksi generatiiviseksi tumaksi. Tällöin siitepölyhiukkasen sisään syntyy kaksi sukusolua. (University of Leicester n.d.)

Hedelmöityksessä vegetatiivinen tuma kasvattaa siiteputken, jonka seurauksena generatiiviset tumat pääsevät tekemään hedelmöityksen. Hedelmöityksessä toinen generatiivinen tuma yhdistyy alkiorakossa diploidiseen tumaan, johtaen endospermin eli ravintosolukon kehittymiseen. Toinen tuma yhdistyy munasoluun muodostaen diploidisen tsygootin. (Puolimatka & Pauk 1998, 9.)

Solukkoviljelyllä tarkoitetaan keinotekoisella kasvualustalla suoritettavaa viljelyä, joka perustuu totipotentteihin kasvisoluihin. Totipotentilla kasvisolulla on kyky erilaistua miksi tahansa kasvin soluksi. (Lappalainen 2016.) Solukkoviljelyn avulla mikrosporien luonnollista kehitysreittiä voidaan muuttaa gametofyyttisestä sporofyyttiseen kehitykseen, jolloin siitepölyn sijasta mikrosporit saadaan erilaistumaan kalluksen tai alkiorakenteen kautta haploidiksi kasviksi (Raj n.d.). Kalluksella tarkoitetaan kasvin erilaistumaton ja jakautumiskykyistä haavasolukkoa. Tapahtumaketjua kutsutaan androgeneesiksi. (Puolimatka & Pauk 1998, 9.)

Androgeneesissä mikrosporien kehitys voi kulkea kahta eri reittiä. Ensimmäisessä reitissä tumanjakautuminen tapahtuu kuten luonnollisessa mikrosporin kehityksessä ja alkiorakenne voi lähteä kehittymään joko generatiivisesta tai vegetatiivisesta tumasta. Toisen tuman kehityksen alkaessa toinen tuma surkastuu pois. Toisessa kehitysreitissä ensimmäisessä jakautumisessa muodostuu kaksi solua, jotka molemmat kykenevät toimimaan alkiorakenteen kehityksessä. (Puolimatka & Pauk 1998, 9.)

2.4 Kaksoishaploidia kasvinjalostuksessa

Kasvinjalostuksessa käytetään apuna haploidiaa. Kaksoishaploidilla kasvilla tarkoitetaan kasviyksilöä, jonka yksinkertainen perimä on kahdentunut. Kahdentuminen voi tapahtua itsestään spontaanisti tai kemiallisen käsittelyn seurauksena. (Puolimatka & Pauk 1998, 7.) Kaksoishaploidijalostus alkaa haploideista kasveista. Haploidit kasvit eivät ole tavallisesti elinkykyisiä luonnossa, mutta niitä voidaan kasvattaa solukkoviljelyllä laboratorioolosuhteissa. (Fagerstedt ym. 2008, 186.)

Kaksoishaploidi kasvi on homotsygootti (Puolimatka & Pauk 1998, 7). Homotsygootti kasviyksilö perii molemmilta emokasveiltaan saman alleelin. Alleelilla tarkoitetaan tietyn geenin vaihtoehtoista muotoa eli vastintekijää. Tällöin kasviyksilöllä on identtiset alleelit

parillisen kromosomiston jokaisessa geenissä ja yksilö on kyseisen ominaisuuden suhteen samaperintäinen. (Fagerstedt ym. 2008, 166.)

Kasvinjalostuksessa homotsygoottien yksilöiden kohdalla puhutaan perimältään yhtenäisestä, puhtaasta linjasta. Kaksoishaploidiaa hyödynnetään kasvinjalostuksessa sillä se nopeuttaa ja tehostaa jalostusprosessia huomattavasti. Kaksoishaploidimenetelmän avulla puhdas linja saadaan luotua jo risteytyksen jälkeisessä sukupolvessa. (Peltoniemi 2018.) Ilman kaksoishaploidimenetelmää puhdas linja saavutetaan 5 – 6 itsepölytyssukupolven kohdalla (Puolimatka & Pauk 1998, 8).

3 KEVÄTVEHNÄN PONSIVILJELYMENETELMÄ

Kaksoishaploideja kasveja voidaan tuottaa useilla eri menetelmillä. Yksi niistä on ponsiviljely. Ponsiviljelyllä tarkoitetaan menetelmää, jossa heteen ponnet eristetään emokasvien tähkistä ravintoalustalle. Ravintoalustalla ponsien sisältämät mikrosporit alkavat kehittyä eri vaiheiden kautta uusiksi kasveiksi. Ponsiviljelyssä käytettävät emokasvit kasvatetaan kasvihuoneolosuhteissa. Jotta kasveista saadaan mahdollisimman laadukkaita, käytetään kasvatuksen aikana lannoitetta ja tarvittaessa torjunta-aineita parhaan mahdollisen tuloksen takaamiseksi. (Koskinen 2018.)

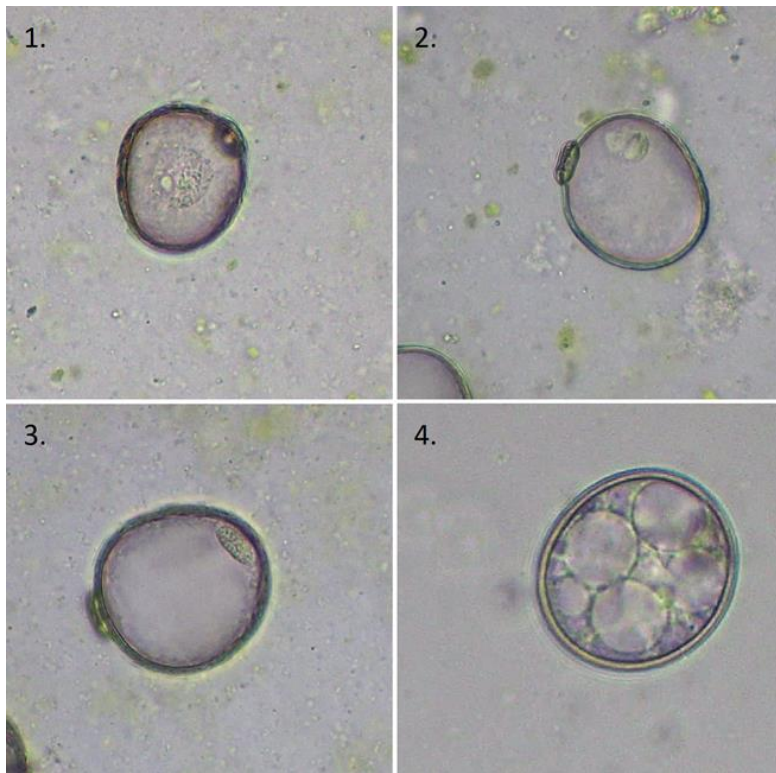
Solukkoviljelyssä riskinä on aina kontaminaatio. Kontaminaatiolla tarkoitetaan ei-toivotun sienen, bakteerin tai muun ei-toivotun tekijän läsnäoloa viljelyksessä. Kontaminaation tapahtumisen estää parhaiten hyvä laboratoriotyöskentelytekniikka ja aktiivinen havainnointi. Tällöin saastuneet yksilöt voidaan poistaa viljelystä ajoissa varmistuen samalla, että kontaminaatio ei leviä eteenpäin. (Uosukainen 1996, 9.)

Steriilissä työskentelyssä tapahtuvan saastumisen lisäksi kontaminaatio on yhteydessä emokasvien kasvatuksen aikana kasveissa vaikuttaviin tauteihin ja tuholaisiin. Yksi yleisimmistä taudeista vehniä viljeltäessä on härmän muodostuminen. Härmän aiheuttaa sieni, joka muodostaa kasvin lehden pinnalle rihmastopesäkkeitä. Härmä viihtyy eritoten tiheässä viljakasvustossa ja leviää itiöinä tuulen mukana. Härmää torjutaan rikittämällä kasvustoa kemiallisen torjunta-aineen avulla. (Farmit Website Oy n.d.)

3.1 Emokasvien keräys ja esikäsittely

Ennen ponsien eristämistä emokasveista kerätään versot. Versojen keräys suoritetaan tarkastelemalla jokainen verso yksitellen ja valitsemalla keräysvalmiit yksilöt. Verson ulkoisista merkeistä keräyksen yhteydessä tarkastellaan tähkän kokoa ja väriä. Selkeän vihreä sekä pullistunut verso antaa viitteitä sopivassa kasvuvaiheessa olevista mikrosporeista. (Koskinen 2018.) Ulkoisten merkkien lisäksi versojen keräysvalmius voidaan määrittää tutkimalla ponsien solujen tumavaiheita mikroskoopin avulla. Sopivana tumavaiheena pidetään myöhäistä yksitumavaihetta (Puolimatka & Pauk 1998, 13).

Ituaukko sijaitsee mikrosporin seinämällä. Sillä tarkoitetaan siitepölyhiukkasen seinämän ohentunutta kohtaa, josta siiteputki kasvaa. Erittäin aikaisessa tumavaiheessa olevan solun tuma on sijoittuneena keskelle (kuvio 1, kuva 1). Kehityksen edetessä aikaiseen tumavaiheeseen, tuma siirtyy seinämää kohti ja lähtee kiertämään sitä myöten pois päin ituaukosta (kuvio 1, kuva 2). Yksitumavaiheen ollessa puolivälissä tuma on siirtynyt seinämää pitkin neljäsosan päähän ituaukosta. Kehityksen edetessä myöhäiseen yksitumavaiheeseen tuma siirtyy ituaukkoon nähden mikrosporin toiselle puolelle (kuvio 1, kuva 3). myöhäisen yksitumavaiheen jälkeen tuma alkaa jakautua (kuvio 1, kuva 4). Tuman sijainnin lisäksi tumavaiheen määrittämisessä hyödynnetään vakuolin kokoa. (Kasha, Simion, Oro, Yao, Hu, & Carlson 2000).



KUVIO 1. Kuvattuna tuman liikkeet ituaukkoon nähden aikaisesta yksitumavaiheesta myöhäiseen yksitumavaiheeseen ja lopulta solunjakautumiseen (kuvat 1 – 4)

Keräyksen jälkeen versoille tehdään kylmäkäsitely. Kylmäkäsitelyn tavoitteena on toimia yhtenä stressitekijänä ja muuttaa mikrosporien luonnollinen kehitysreitti gametofyyttisestä sporofyyttiseen kehitykseen. (Tenhola-Roininen, Tanhuanpää & Immonen 2005.) Kylmäkäsitelyn kesto on vähintään 2 ja enintään 4 viikkoa. (Puolimatka & Pauk 1998, 13).

3.2 Kasvatusalustat

Kasvatusalustojen koostumus vaihtelee kyseessä olevan alustan mukaan. Induktio- ja regeneraatioalustat valmistetaan punnitsemalla alustaa varten tarvittavat aineet, tekemällä niistä liuos ja steriloidamalla se autoklavoimalla tai steriilisuodatuksella. Regeneraatioalustaa varten tehtyyn liuokseen lisätään agaria alustan kiinteyttämiseksi. Steriloinnin jälkeen induktioalusta jaetaan pulloihin ja siirretään kylmään parhaan säilyvyyden takaamiseksi. 90 ml regeneraatiomaljat valetaan pumppuannostelijalla ja jäädytetään. Valmiit regeneraatiomaljat pakataan muoviin saastumisen estämiseksi ja säilötään huoneenlämmössä. (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015.)

Juurtumisvaiheessa käytettävää juurtumisalusta valmistetaan induktio- ja regeneraatioalustojen tavoin punnitsemalla tarvittavat aineet ja liuottamalla ne. Juurtumisalusta steriloidaan ja valetaan muovisiin, kannellisiin rasioihin. Juurtumisalustan jäähdettyä rasiat säilytetään huoneenlämmössä. Juurtumisvaiheessa käytetään rasioita, jotta versoilla on riittävästi tilaa kasvaa. (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015.)

Kasvatusalustojen käyttöikä vaihtelee sen mukaan, mikä alusta on kyseessä. Induktioalustan käyttöikä on pidetty noin 2 viikkoa. Regeneraatio- ja juurtumisalustat säilyvät pidempään. (Koskinen 2018.)

3.3 Ponsien eristys induktiovaihetta varten

Ponsien eristyksessä kukasta poistetaan kaksi ulointa kaletta kukan kummaltakin puolelta. Ponnet sijaitsevat kaleiden alla ja yhdessä kukassa niitä on yhteensä 6, 3 kummallakin puolella (kuvio 2). Kukkia yhdessä tähkässä on vaihteleva määrä, keskimäärin 14 kappaletta. Ponnet irrotetaan kukasta nyppämällä ne kevyesti pinsettien kärkien avulla ja ne siirretään nestemäistä induktioalustaa sisältävälle maljalle. Nypinnän jälkeen induktiomaljat siirretään lämpökäsittelyyn. (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015.)



KUVIO 2. Ponsien sijainti tähkässä

Lämpökäsittelyn jälkeen induktiomaljat siirretään matalampaan lämpötilaan (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015). Ensimmäiset induktiomaljalle kehittyvät alkiorakenteet muodostuvat yleensä noin kolmen viikon kuluttua lämpökäsittelyn loppumisesta. Noin kahdeksan viikon kuluttua kaikki alkiorakenteet ovat muodostuneet ja induktiomaljat voidaan hävittää, sillä uusia alkioita ei enää kehity. (Puolimatka & Pauk 1998, 13.)

3.4 Alkioiden siirto regeneraatiovaihetta varten

Kaikki alkioiden siirron vaiheet suoritetaan ponsien nypinnän tavoin aseptisesti laminaarikaapissa. Ensimmäinen alkioiden tarkastus tehdään kuukauden (± 2 päivää) kuluttua nypinnästä. Yleensä ensimmäisessä tarkastuksessa siirrettäviä alkioita on vähän, sillä ne eivät ole kehittyneet vielä tarpeeksi suuriksi. Toinen tarkastus suoritetaan viikon kuluttua ensimmäisestä. Siinä sopivan kokoiset alkiot siirretään ensimmäisen tarkastuksen kaltoin regeneraatioalustalle ja siirtokoon alle jäävät alkiot jätetään kasvamaan. Induktiomaljoille tehtävä viimeinen tarkastus on poisheitto. Poisheiton yhteydessä suoritetaan maljaus. (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015.)

Edellä mainittujen vaiheiden lisäksi jokaisen tarkastuksen yhteydessä suoritetaan alkioiden ruokinta. Ruokinta suoritetaan poistamalla induktiomaljalta automaattipipetin avulla 1 ml nestettä ja lisäämällä tämän jälkeen uutta ravintoliuosta 1 ml. Ruokinta suoritetaan muiden työvaiheiden tapaan aseptisesti välttämällä maljojen saastumista. Alkioiden siirtämisen jälkeen induktioalustat siirretään takaisin pimeään lämpökaappiin. Regeneraatioalustat puolestaan siirretään valolliseen lämpökaappiin. (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015.)

3.5 Juurtumisvaihe ja versojen siirto kasvihuoneelle

Juurtumisvaiheessa regeneraatiomaljalle kehittyneet vihreät versot siirretään juurtumisalustaa sisältäviin rasioihin (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015). Siirrettävien versojen tulee olla kooltaan riittävän suuria, jotta niiden kehitys jatkuu uudelle alustalle siirrettäessä. Vihreiksi versoiksi luetaan sellaiset versot, jotka ovat kokonaan vihreitä ja joilla on selkeästi erotettava varsi ja lehti (kuvio 3). (Ulvinen 2018.)



KUVIO 3. Vihreitä versoja regeneraatiomaljalla

Rasiassa siirrettyjen versojen kasvu jatkuu ja niiden juuret alkavat kehittyä. Riittävän suuriksi kehittyneet versot siirretään kasvihuoneella multaan. Multaan siirto tapahtuu valitsemalla sopivat yksilöt versojen joukosta ja istuttamalla ne tukevasti taimiruukkuihin. Istutusvaiheessa verson juuret huuhdellaan huolellisesti jäljelle jääneestä juurtumisalustasta. (Boreal Kasvinjalostus Oy 2015.) Kasvihuoneella ruokut peitetään muutamaksi viikoksi muovihupulla, jotta versot tottuvat kasvihuoneen ilmankosteuteen. Tämä vaihe on tärkeä, koska juurtumisrasiassa vallitsevan suuren ilmankosteuden takia versot eivät ole tottuneet säätelemään ilmarakojansa. Totuttamisjakson aikana kasveja suihkutetaan vedellä, jotta liialta kuivumiselta vältytään. (Puolimatka & Pauk 1998, 13 – 14.)

3.6 Kromosomiston kahdentuminen ja tuleentuminen

Kromosomiston kahdentuminen voi tapahtua spontaanisti tai se voidaan aikaansaada kemiallisen käsittelyn seurauksena. Useilla viljoilla spontaani kromosomiston kahdentuminen on riittävää ja kemialliselle käsittelylle ei ole tarvetta. (Koskinen 2018.) Kemiallista käsittelyä käytetään, kun spontaani kahdentuminen on vähäistä. Kemiallisessa käsittelyssä voidaan käyttää kemikaalina esimerkiksi kolkisiinia, asenaftenia, trifluraliinia tai oryzaliinia (Klima, Vyvadilov & Kucera 2008, 31). Kemikaalin läsnäolo estää mitoosissa tumasukkulan muodostumisen kokonaan tai aiheuttaa tumasukkulan purkautumisen. Tämän seurauksena vastinkromosomit eivät erkane, vaan jäävät samaan tumaan. (Halkka 2003.) Tällöin syntyy solu, jonka kromosomiluku on kaksinkertainen (Fagerstedt ym. 2008, 186).

Versojen kypsiksi kasvattaminen suoritetaan kromosomiston kahdentumisen jälkeen. Onnistuneesti kaksinkertaistuneen kromosomiston seurauksena versoihin kehittyä pääversojen lisäksi lisääntymiskykyisiä, siemeniä tuottavia sivuversoja (Puolimatka & Pauk 1998, 14). Viljojen kypsymisestä puhuttaessa käytetään käsitettä tuleentuminen. Tuleentumisen yhteydessä viljat saavat niille ominaisen ruskean värin. Samalla viljan jyvät kypsyvät niiden sisuksien jähmettyessä. (Ruokatieto Yhdistys ry 2018.)

4 TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tavoitteena on tutkia käytössä olevaa kevätvehnän ponsiviljelymenetelmää ja kehittää saatujen tulosten perusteella vähävaiheinen sekä nopea viljelymenetelmä, joka tuottaa hyvin kaksoishaploideja kasveja. Hyvän saannon omaavalla menetelmällä ponsiviljelyn tehokkuus kasvaa huomattavasti vihreiden versojen määrän kasvaessa. Tarkoituksena opinnäytetyössä on verrata ponsiviljelymenetelmässä käytettäviä kasvatusalustoja ja vaihtoehtoisia suoritustapoja sekä arvioida niiden vaikutusta menetelmän käytettävyyteen ja saantoon.

Opinnäytetyötä varten suunniteltiin kuusi erillistä tutkimustehtävää, jotka ovat

- 1) tutkia induktioalustan vanhenemista ja käyttöikä
- 2) tutkia induktioalustan vähentämisen vaikutusta saantoon
- 3) vertailla kolmea eri regeneraatioalustaa
- 4) tutkia alkioden ruokinnan vaikutusta saantoon
- 5) määrittää alkioden optimaalinen siirtokoko
- 6) selvittää maljauksen optimaalinen ajankohta.

5 PONSIVILJELYMENETELMÄN OPTIMOINTI

5.1 Esivalmistelut

Opinnäytetyötä varten tarvittavat emokasvit kylvettiin viikolla 25. Työssä käytetty aineisto sisälsi kahta varsinaista Borealin kevätvehnälajiketta, Bor A ja Bor B. Varsinaisten lajikkeiden lisäksi käytetyssä aineistossa oli mukana seitsemästä eri risteytyksestä peräisin olevia kasveja. Kyseiset kasvit on numeroitu niiden risteytysnumeron mukaan. Kyseiset risteytykset kuuluvat Borealin kevätvehnän jalostusohjelmaan. Kaikkiaan eri risteytyksiä oli yhteensä yhdeksän. Yhteen muoviruukkuun kylvettiin 3 siementä. Kasvualustana ruukuissa käytettiin Kekkilän Professional Substrate W HS R8030 taimiseosta. Taimiseos sisältää vaaleaa rahkaturvetta, hietasavea sekä hiekkaa ja sen pH-arvo on 5,9 (Kekkilä Professional n.d.) Ensimmäiset viikot kastelu suoritettiin kastelukannulla ja kun juuret ylsivät ruukun pohjalle saakka, siirryttiin altakasteluun. Kasveja lannoitettiin Kekkilän Professional Superex NPK 19-4-20 taimilannoitteella.

Kasvatuksen aikana kasveille annettiin lannoituslisä 15. elokuuta. Kasvihuoneessa havaittuja kirvoja varten tehtiin kaksi erillistä torjuntaa 6. ja 21. elokuuta. Ensimmäisessä torjunnassa käytettiin deltametriiniä sisältävää Bayerin Decis Mega EW 50 -torjunta-ainetta ja toisessa tau-fluvalinaattia sisältävää Adaman Mavrik 2 F -torjunta-ainetta. Edellä mainittujen tuholaistorjunta-aineiden lisäksi kasvihuoneessa käytettiin rikitystä härmän torjuntaan.

Versojen keräys aloitettiin viikolla 30 ja se suoritettiin yrityksen laatiman työohjeen mukaisesti (Boreal Kasvinjalostus Oy n.d). Keräyksen jälkeen versoille tehtiin kylmäkäsittely, jonka pituus vaihteli noin 2 – 4 viikon välillä. Kylmäkäsittelyn kesto täytti aina vaadittavan minimipituuden. Joidenkin versojen kohdalla nypintää ei ehditty suorittaa laaditussa aikataulussa, jolloin versot olivat kylmässä noin neljä viikkoa. Liian kauan kylmässä olleet versot olivat näivettyneitä ja osaan versojen lehdistä oli muodostunut näkyvää hometta.

Opinnäytetyössä käytettävän induktio- ja regeneraatioalustat valmisti Borealin vakituinen työntekijä. Opinnäytetyössä tarvittiin yhtä induktioalustaa, sekä kolmea erilaista regeneraatioalustaa. Regeneraatioalustat nimettiin tätä opinnäytetyötä varten kirjaimilla X,

Y ja Z. Alustat valmistettiin yrityksen alustanvalmistusohjeiden mukaisesti (Boreal Kasvinjalostus Oy n.d). Induktioalusta siirrettiin steriloinnin jälkeen kylmään ja regeneraatioalustat valettiin Systec Mediaprep -laitteistolla halkaisijaltaan 14 cm:n petrialjoille.

5.2 Ponsien eristys

Ennen ponsien eristystä eli nypintää valettiin induktiomaljat. Induktiomaljoja valettiin kerralla vain tarvittava määrä, jotta induktioalustaa ei menisi hukkaan ja saastumisriski saataisiin minimoitua. Yhdelle halkaisijaltaan 6 cm:n petrialjalle kaadettiin steriilisti 7 ml induktioalustaa. Induktioalustan määrä mitattiin 15 ml:n Falcon-putkella. Poikkeus ohjeiden mukaiseen induktiomaljojen valamiseen tehtiin toisen tutkimustehtävän kohdalla, jolloin 7 ml:n induktiomaljojen lisäksi valettiin 6 ml:n induktiomaljoja.

Opinnäytetyötä varten nypittiin yhteensä 31 080 pontta. Mitä suurempi nypittyjen ponsien lukumäärä on, sitä luotettavampia tulokset ja niistä tehdyt johtopäätökset ovat. Opinnäytetyötä varten pystyttiin kuitenkin tiukan aikataulun seurauksena nyppimään vain hyvin rajallinen määrä ponsia. Nypityt ponnet jaettiin tutkimustehtävien kesken niin, että jokaisen tutkimustehtävän ponsimäärästä voidaan tehdä tarvittavat johtopäätökset (taulukko 1). Esimerkiksi ensimmäistä tutkimustehtävää varten nypittiin keskimääräistä vähemmän ponsia, koska jo pienemmästä määrästä arveltiin saatavan riittävä tieto tarvittavien johtopäätösten tekemiseen.

TAULUKKO 1. Nypittyjen ponsien lukumäärät.

Tutkimustehtävä	Risteytys/lajike	Ponsien lukumäärä	Yhteensä
1.	Bor A	1 200	
	Bor B	1 440	2 640
2.	20.	2 880	
	21.	2 160	5 040
3. (X vs. Y)	Bor B	1 080	
	18.	2 520	
	20.	960	
	21.	1 320	5 880
3. (Y vs. Z)	Bor A	2 160	
	Bor B	720	
	20.	1 920	4 800
4.	Bor B	720	
	8.	1 440	
	10.	1 680	
	20.	960	4 800
5.	4.	240	
	8.	960	
	10.	1200	
	18.	240	
	21.	720	
	24.	240	3 600
6.	20.	2 640	
	21.	1 680	4 320
			31 080

Ponsien nypintä suoritettiin Borealin eristysohjeen mukaisesti (Boreal Kasvinjalostus Oy n.d). Tutkimustehtäviä varten tehtiin vertailumaljat eli kahdelle eri petrimaljalle nypittiin saman verson ponsia. Nypittäessä verson toisen puolen ponnet nypittiin toiselle maljalle ja toinen puoli edellisen maljan parille. Näin maljoista saatiin vertailukelpoisia. Kahden petrimaljan täyttämiseen tarvittiin keskimäärin 3 – 4 versoa. Versojen laatu ja koko vaihteli, mutta keskimäärin ne olivat ihanteellista versoa pienempiä. Ponsien nypinnän yhteydessä maljoille siirrettiin ohjeiden mukaisesti emejä. Yhdelle maljalle siirrettiin 8 emiä. Ponsien nypinnän jälkeen induktiomaljat nimettiin kirjaamalla tarvittavat tiedot petrimaljojen kansiin. Tunnistuksessa tarvittavat tiedot olivat risteytyksen nimi, kevätvehnän tunnus sekä nypintäpäivämäärä.

5.3 Alkioiden siirto ja tarkastukset

Tässä opinnäytetyössä induktiomaljojen kolmas tarkastus ei ollut poisheitto, vaan tarkastuksia tehtiin yhteensä neljä. Alkioiden siirto ja tarkastukset toteutettiin sen mukaan,

minkä tutkimustehtävän alkioita siirrettiin. Vertailumaljoista toisen alkiot siirrettiin ja tarkastettiin tutkimustehtävän vaatimalla tavalla ja toisen vertailumaljan alkiot Borealin alkioiden siirto-ohjeiden mukaisesti (Boreal Kasvinjalostus Oy n.d). Tutkimustehtävissä käytettiin regeneraatioalustaa Y. Ainoastaan kolmannen tutkimustehtävän kohdalla tässä oli poikkeus, sillä tutkimustehtävässä käytettiin kaikkia kolmea eri regeneraatioalustaa. Regeneraatiomaljat merkittiin kaikkien tutkimustehtävien kohdalla siten, että jokaisen alkioiden alkuperä ja siirtopäivä olivat tiedossa.

Ensimmäisen ja toisen tutkimustehtävän kohdalla alkioiden siirto suoritettiin niin, että regeneraatiomalja jaettiin kahteen osaan. Toiselle puolelle siirrettiin ensimmäiseltä vertailumaljalta peräisin olevat alkiot ja toiselle puolelle toiselta peräisin olevat. Puolien lisäksi maljat jaettiin niin, että jokaisen alkioiden alkuperä eli induktiomalja oli selvillä. Tarkastuksissa alkioiden siirron yhteydessä induktiomaljat ruokittiin Borealin ohjeen mukaisesti.

Kolmatta tutkimustehtävää varten ei tehty vertailumaljoja. Alkioiden siirto suoritettiin niin, että induktiomaljan siirtokokoiset alkiot jaettiin tasan regeneraatioalustojen välillä. Jos kyseessä oli tutkimustehtävän a-osuus, jaettiin alkiot X- ja Y-alustojen kesken. B-osuudessa alkiot jaettiin Y- ja Z -alustojen välillä. Alkioiden lukumäärän lisäksi siirtäessä tarkkailtiin alkioiden kokoa ja siirto pyrittiin suorittamaan niin, että kummallekin regeneraatiomaljalle tulisi saman kokoisia alkiota. Induktiomaljat ruokittiin tarkastusten yhteydessä Borealin ohjeen mukaisesti.

Neljännessä tutkimustehtävässä alkioiden siirto suoritettiin ensimmäisen ja toisen tutkimustehtävän kaltaisesti. Induktiomaljojen tarkastuksen yhteydessä tehtävä ruokinta suoritettiin poikkeuksellisesti niin, että keskinäisistä vertailumaljoista vain toinen ruokittiin ohjeen mukaisesti. Vertailumaljoista toista ei ruokittu kertaakaan.

Viidennessä tutkimustehtävässä induktiomaljojen alkiot jaettiin siirtämistä varten kolmeen ryhmään koon perusteella. Alkioiden kokoryhmät olivat alle 1 mm, 1 – 2 mm ja yli 2 mm. Vertailumaljojen alkiot siirrettiin Borealin siirto-ohjeen mukaisesti niin, että siirrettävät alkiot olivat kooltaan 1 – 2 mm. Siirrettävien alkioiden koko arvioitiin millimetripaperin avulla. Induktiomaljat ruokittiin tarkastusten yhteydessä Borealin ohjeen mukaisesti.

Kuudetta tutkimustehtävää varten induktiomaljat jaettiin kolmeen ryhmään. Ensimmäiseen ryhmään kuuluvien induktiomaljojen alkiot maljattiin toisessa tarkastuksessa. Toisen ryhmän alkioiden maljaus suoritettiin kolmannessa tarkastuksessa ja kolmannen ryhmän alkioiden maljaus neljännessä tarkastuksessa. Ensimmäisessä tarkastuksessa kaikkien alkioiden siirto tehtiin Borealin siirto-ohjeen mukaisesti. Vertailumaljoille suoritettiin kaikissa tarkastuksissa ohjeen mukainen alkioiden siirto.

6 OPTIMOINNIN TULOKSET

6.1 Tulosten käsittely

Opinnäytetyön tulokset muodostuvat kahdesta osasta, alkioden sekä vihreiden versojen saannosta. Tärkein edellä mainituista kahdesta on vihreiden versojen saanto, sillä jalostuksen jatko perustuu siihen. Saannolla tarkoitetaan viljelyn tuloksena saatujen vihreiden versojen lukumäärää. Alkioden määrää voidaan käyttää hyödyksi pohtiessa sitä, kuinka tutkimustehtävissä määritellyt muutokset ovat vaikuttaneet niiden kehittymiseen.

Saannon yhteydessä käytetään termiä responsio. Responsiolla kuvataan tietyn risteytyksen tai lajikkeen tuottavuutta ja se voi vaihdella viljelykerran mukaan. Responsiolukuun vaikuttavat esimerkiksi emokasvin genotyyppi, kasvuolosuhteet, mikrosporien kehitysvaihe, solukkoviljelyalustan koostumus ja viljelyolosuhteet. Responsioluku kertoo vihreiden versojen määrän 100 nypittyä ponna kohden. (Peltoniemi 2018.)

Tuloksia tarkastellessa on huomioitava, että kaikista alkioista ei kehity vihreitä versoja. Regeneraatiomaljoja säilytettiin niin kauan, kunnes voitiin olla varmoja, että uusia vihreitä versoja ei enää kehittynyt. Opinnäytetyön tulosten käsittelyä varten laskettiin myös albiinot versot. Albiinoiden versojen laskennassa käytettiin samoja periaatteita kuin vihreiden versojen kohdalla.

6.2 Induktioalustan vanheneminen

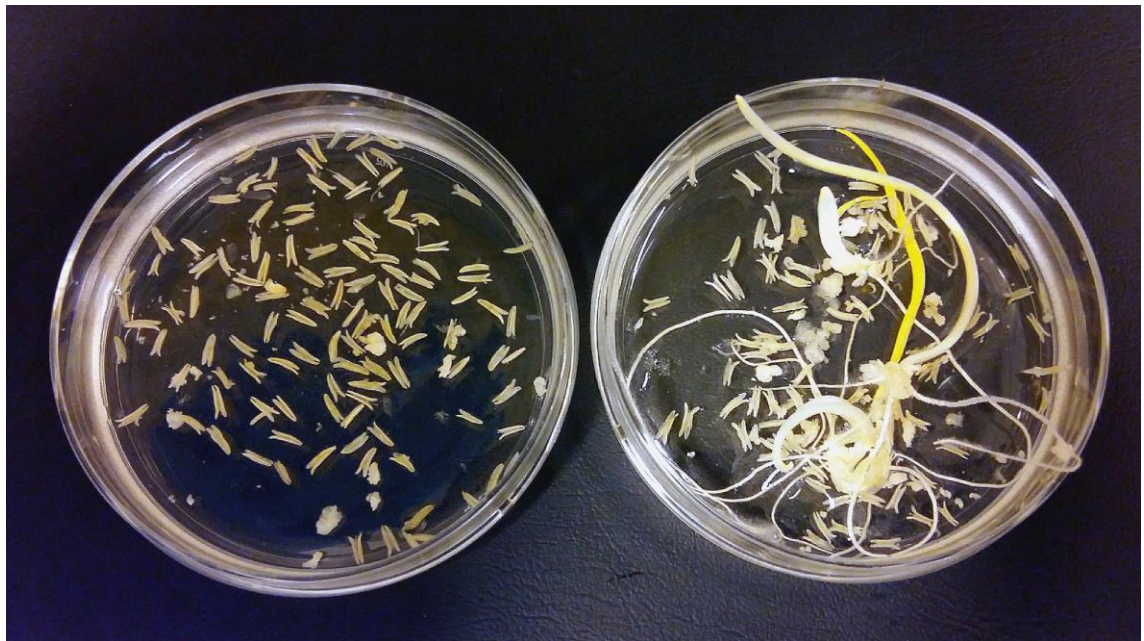
Ensimmäisessä tutkimustehtävässä alkioita kehittyi vaihteleva määrä riippuen lajikkeesta. Tuloksista nähdään, että Bor A tuotti heti ensimmäisestä tarkastuksesta lähtien enemmän alkioita kuin Bor B (taulukko 2). Bor A:n kohdalla siirrettyjen alkioden lukumäärät ovat moninkertaisia Bor B:n verrattuna. Bor A:ta sisältäville induktioaljoille kehittyi alkioden lisäksi myös selkeitä versoja (kuvio 4).

Tuloksissa on havaittavissa selkeä ero myös eri tarkastusten välille siirrettyjen alkioden lukumäärissä. Ensimmäisessä tarkastuksessa molempien lajikkeiden kohdalla siirrettäviä alkioita on ollut kaikista vähiten. Toisen tarkastuksen kohdalla määrä kasvaa edelleen ja

kolmannessa tarkastuksessa saavutettiin lukumäärällinen huippu molempien lajikkeiden kohdalla. Neljännessä tarkastuksessa alkioiden määrä laski huomattavasti.

TAULUKKO 2. Ensimmäisestä tutkimustehtävästä saatujen alkioiden lukumäärät

		1. tarkastus		2. tarkastus		3. tarkastus		4. tarkastus	
		Vanha	Tuore	Vanha	Tuore	Vanha	Tuore	Vanha	Tuore
Bor A	A	3	1	8	8	12	13	3	5
	B	3	3	12	6	24	10	6	4
	C	3	6	12	18	25	23	8	8
	D	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	6	1	11	3	27	4	0	0
			15	11	43	27	88	50	17
Bor B	A	0	0	0	0	5	7	1	1
	B	0	0	0	0	5	5	1	2
	C	0	0	2	0	5	0	2	2
	D	0	0	0	0	7	7	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	0
	F	0	0	0	0	9	1	2	0
			0	0	2	0	31	20	6



KUVIO 4. Bor B:n ja Bor A:n ero alkioiden tuotossa. Bor A:n ponsia sisältävälle induktiomaljalle (oikealla) on kehittynyt alkioiden lisäksi versoja

Kehittyneiden versojen lukumäärät poikkeavat alkioiden saannon tavoin toisistaan lajikkeiden välillä (taulukko 3). Bor A tuotti huomattavasti enemmän versoja Bor B:n verrat-

tuna. Bor B:n kohdalla sekä vihreiden, että albiinoiden versojen saanto jäi huonoksi. Tuloksista nähdään, että molempia kehittyi vain muutama kappale. Bor A:n kohdalla vihreitä versoja kehittyi enemmän kuin albiinoita. Suuruusluokaltaan lukumäärät ovat kuitenkin samat.

TAULUKKO 3. Versojen saanto ensimmäisessä tutkimustehtävässä

		Vihreät		Albiinot	
		Vanha	Tuore	Vanha	Tuore
Bor A	A	1	3	3	6
	B	8	4	6	7
	C	17	18	8	8
	D	0	0	0	0
	E	6	10	7	1
			32	35	24
Bor B	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	1	0
	D	1	2	0	0
	E	0	0	0	0
	F	0	0	1	0
			1	2	2

Lajikkeiden välillä on havaittavissa selkeä ero sekä alkioden, että versojen kehitymisessä. Bor A:n responsio on huomattavasti Bor B:n responsiota parempi. Bor B:n kohdalla responsio jää aivan nollan tuntumaan.

Vanhan ja tuoreen alustan välillä ei ole havaittavissa suurta eroa alkioden eikä versojen kehityksessä. Alkioita muodostui enemmän vanhalla alustalla (taulukko 2). Versojen kohdalla tilanne vaihteli riippuen siitä, oliko kyse albiinoista vai vihreistä versoista (taulukko 3). Vihreiden versojen kohdalla tuoreen alustan saanto on hieman parempi. Tuoreella alustalla vihreiden versojen määrä on hieman parempi kuin vanhalla, vastaavasti albiinoiden versojen määrä on hieman alhaisempi.

6.3 Induktioalustan vähentäminen

Toisessa tutkimustehtävässä alkioden saannon kohdalla oli havaittava ero tutkittujen risteytysnumeroiden välillä (taulukko 4). Risteytysnumeron 20 kohdalla alkioden saanto oli kaksinkertainen verrattuna numeroon 21. Ensimmäisestä ja neljännestä tarkastuksesta saatujen alkioden lukumäärät jäivät ensimmäisen tutkimustehtävän tulosten tavoin toista

ja kolmatta tarkastusta alhaisemmiksi. Toisen ja kolmannen tarkastuksen välillä alkioiden lukumäärässä ei ole merkittävää eroa.

TAULUKKO 4. Toisesta tutkimustehtävästä saatujen alkioiden lukumäärät

		1. tarkastus		2. tarkastus		3. tarkastus		4. tarkastus	
		6 ml	7 ml	6 ml	7 ml	6 ml	7 ml	6 ml	7 ml
20.	A	0	0	0	0	0	0	4	2
	B	0	0	20	12	17	16	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	3	3
	D	0	1	5	2	4	5	4	4
	E	0	1	3	7	5	5	4	4
	F	0	0	6	11	4	7	0	1
	G	3	1	4	5	4	6	1	2
	H	0	0	7	7	6	8	0	1
	I	0	0	8	9	7	5	1	0
	J	2	2	7	5	7	6	0	0
	K	2	0	6	4	3	8	2	1
	L	1	0	2	9	5	7	0	1
			8	5	68	71	62	73	19
21.	A	0	0	5	3	4	5	2	3
	B	0	0	0	3	0	7	1	6
	C	0	0	1	2	4	3	0	3
	D	0	0	3	0	4	1	4	1
	E	0	0	4	2	5	3	0	0
	F	1	2	3	5	3	4	0	0
	G	0	0	3	0	0	3	0	0
	H	2	0	8	5	4	3	0	0
	I	0	0	0	3	1	2	0	0
			3	2	27	23	25	31	7

Versojen saanto jäi toisessa tutkimustehtävässä alhaiseksi versojen saannon ollessa vain muutamia yksilöitä (taulukko 5). Eri risteytysnumeroiden responsioiden voidaan tulosten perusteella todeta olevan alhaisia. Risteytysaineiston välillä on selkeästi havaittava ero versojen kehittämisessä. Numero 20 tuotti alkioiden tavoin enemmän versoja, kuin numero 21.

6 ja 7 ml:n induktiomaljoilta kehittyneiden versojen lukumäärissä ei ole havaittavissa merkittävää eroa. Ainut huomattava ero havaitaan risteytysnumero 20 kohdalla albiinoiden tuotossa. 7 ml:n maljalla albiinoiden versojen kohdalla on selkeä piikki (taulukko 5). Luku on kolminkertainen verrattuna 6 ml maljaloilta peräisin olevien albiinoiden lukumäärään.

TAULUKKO 5. Versojen saanto toisessa tutkimustehtävässä

		Vihreät		Albiinot	
		6 ml	7 ml	6 ml	7 ml
20.	A	0	0	0	0
	B	1	0	2	6
	C	0	0	0	0
	D	1	0	0	1
	E	0	0	0	0
	F	1	0	0	1
	G	0	0	0	2
	H	0	0	0	2
	I	0	3	1	2
	J	0	0	1	1
	K	0	0	0	2
	L	0	0	1	0
			3	3	5
21.	A	0	0	1	0
	B	0	0	0	0
	C	0	1	0	0
	D	0	0	0	0
	E	0	0	0	0
	F	0	0	0	0
	G	0	0	0	0
	H	0	0	0	0
	I	0	0	0	0
			0	1	1

6.4 Regeneraatioalustojen X ja Y vertailu

Siirrettyjen alkioden lukumäärät ovat samat molempien regeneraatiomaljojen kohdalla, koska siirrettävät alkiot jaettiin tasan maljojen kesken (taulukko 6, liite 2) Maljoille siirrettyjen alkioden summa on kussakin tarkastuksessa siirrettyjen alkioden yhteenlaskettu lukumäärä. Tämän takia siirrettyjen alkioden määristä ei voida tehdä alustojen välistä vertailua.

Siirrettyjen alkioden lukumäärästä nähdään, että tutkimustehtävässä käytettyjen risteytysnumeroiden alkioden tuottavuuden välillä on havaittavissa pieniä eroja. Merkittäviä eroja ei syntynyt. Minkään risteytysnumeron kohdalla alkiota ei kehittynyt suurta määrää, vaan alkioden saanto jäi pieneksi.

TAULUKKO 6. Tiivistelmä alustoille X ja Y siirrettyjen alkioiden lukumääristä

	1. tarkastus		2. tarkastus		3. tarkastus		4. tarkastus	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Bor B	0	0	0	0	32	32	16	16
18.	6	6	54	54	69	69	43	43
20.	4	4	9	9	12	12	11	11
21.	0	0	14	14	21	21	1	1

Alkioiden vähäisen kehittymisen ja pieneksi jääneen saannon seurauksena odotettavissa oli, että myös versojen saanto jäisi alhaiseksi. Tulos oli odotetun kaltainen ja versoja kehittyi vain muutamia yksilöitä kunkin risteytysnumeron kohdalla (taulukko 7, liite 3). Numero 20 kohdalla kummankaan tyyppisiä versoja ei kehittynyt lainkaan.

X-alustan saanto oli kaikkien numeroiden kohdalla suurempi (taulukko 7, liite 3). Alustojen keskinäiset erot jäivät kuitenkin mitättömän pieniksi erojen ollessa keskimäärin 2 versoa/risteytysnumero. Y-alusta tuotti enemmän versoja ainoastaan Bor B:llä albiinujen kohdalla, jolloin eroa muodostui 5 verson verran.

TAULUKKO 7. Tiivistelmä versojen saannosta X ja Y -alustojen vertailussa

	Vihreät		Albiinot	
	X	Y	X	Y
Bor B	3	1	2	7
18.	2	0	4	4
20.	2	0	2	0
21.	0	0	0	0

6.5 Regeneraatioalustojen Y ja Z vertailu

Alustojen X ja Y vertailun tavoin alustojen Y ja Z kohdalla siirrettyjen alkioiden lukumäärät ovat samat molempien regeneraatiomaljojen kohdalla (taulukko 8). Maljoille siirrettyjen alkioiden summa on kussakin tarkastuksessa siirrettyjen alkioiden yhteenlaskettu lukumäärä. Risteytysnumeroiden välillä on havaittavissa selkeitä eroja. Lajikkeista Bor A tuotti ehdottomasti eniten alkioita. Bor B:n kohdalla alkioiden tuotto jäi kaikista alhaisimmaksi. Alkioiden lukumäärissä tarkastusten välillä oli edellisten tutkimustehtävien tulosten tavoin eroja. Toisessa ja kolmannessa tarkastuksessa alkioita siirrettiin eniten. Neljännessä tarkastuksessa maljat olivat tyhjiä, joten alkioita ei siirretty yhtään.

TAULUKKO 8. Alustoille Y ja Z siirrettyjen alkioiden lukumäärät

		1. tarkastus		2. tarkastus		3. tarkastus		4. tarkastus	
		Y	Z	Y	Z	Y	Z	Y	Z
Bor B	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	3	3	9	9	0	0
	C	0	0	6	6	7	7	0	0
		0	0	9	9	16	16	0	0
Bor A	A	0	0	13	13	16	16	0	0
	B	0	0	15	15	21	21	0	0
	C	0	0	10	10	14	14	0	0
	D	0	0	18	18	21	21	0	0
	E	0	0	17	17	22	22	0	0
	F	0	0	15	15	21	21	0	0
	G	0	0	16	16	18	18	0	0
	H	0	0	19	19	19	19	0	0
	I	0	0	16	16	14	14	0	0
		0	0	139	139	166	166	0	0
20.	A	0	0	1	1	0	0	0	0
	B	0	0	2	2	4	4	0	0
	C	0	0	2	2	1	1	0	0
	D	0	0	6	6	7	7	0	0
	E	3	3	9	9	9	9	0	0
	F	2	2	6	6	7	7	0	0
	G	2	2	3	3	3	3	0	0
	H	0	0	9	9	11	11	0	0
		7	7	38	38	42	42	0	0

Versojen saanto vaihteli alkioiden saannon tavoin riippuen siitä, mikä risteytysnumero oli kyseessä. Bor A tuotti runsaasti sekä vihreitä, että albiinoja versoja (taulukko 9). Bor B:n ja risteytysnumero 20 välillä versojen saannossa ei ollut havaittavissa selkeää eroa. Molempien kohdalla tulos jäi huomattavasti pienemmäksi kuin Bor A:lla.

Versojen kehittymiseen alustoilla oli vain vähäistä vaikutusta. Vihreiden versojen kohdalla Z-alusta tuotti paremman saannon. Erot ovat kuitenkin hyvin pieniä, 1 – 3 verson eroja. Albiinoiden versojen kohdalla alustojen keskinäiset erot olivat hieman suurempia, mutta jäivät kuitenkin merkitykseltään mitättömiksi. Z-alusta tuotti 2/3 tapauksessa enemmän albiinoja versoja.

TAULUKKO 9. Versojen saanto Y ja Z -alustojen vertailussa.

		Vihreät		Albiinot	
		Y	Z	Y	Z
Bor B	A	0	0	0	0
	B	0	1	4	2
	C	2	2	3	0
		2	3	7	2
Bor A	A	3	6	3	6
	B	4	5	4	4
	C	2	6	3	5
	D	2	9	5	6
	E	7	5	4	12
	F	4	7	4	11
	G	7	7	5	2
	H	13	7	2	2
	I	12	5	4	2
		54	57	34	50
20.	A	0	0	0	0
	B	1	2	0	0
	C	0	0	0	0
	D	1	0	0	1
	E	0	1	0	3
	F	1	2	0	0
	G	0	0	0	0
	H	1	0	1	2
		4	5	1	6

6.6 Ruokinnan tarve

Ruokinnan tarvetta testattaessa käytetyt risteytysnumerot tuottivat alhaisen määrän alkioita (taulukko 10). Ensimmäisessä tarkastuksessa kummallakaan vertailumaljaparin maljalla ei ollut siirtokokoisia alkioita. Neljännen tarkastuksen kohdalla tilanne oli sama. Toisessa ja kolmannessa tarkastuksessa siirrettyjen alkioiden suuruusluokat ovat samat. Toisessa tarkastuksessa ruokkimattomilta maljoilta saatiin enemmän alkioita. Erojen keskinäiset suuruudet vaihtelivat risteytysnumeroiden välillä eron keskiarvon ollessa 5,25 versoa. Kolmannen tarkastuksen kohdalla ruokituille maljoille kehittyi enemmän alkioita eron keskiarvon ollessa 6,25 versoa. Molempien tarkastusten kohdalla erot ovat selvästi havaittavia, mutta jäävät alhaisiksi. Tämän seurauksena tulosten ei voida olettaa johtuvan ruokinnan vaikutuksesta vaan kyse voi olla sattumasta.

TAULUKKO 10. Neljännestä tutkimustehtävästä saatujen alkioiden lukumäärät

		1. tarkastus		2. tarkastus		3. tarkastus		4. tarkastus	
		Ruok.	Ei	Ruok.	Ei	Ruok.	Ei	Ruok.	Ei
Bor B	A	0	0	3	6	6	4	0	0
	B	0	0	5	4	9	9	0	0
	C	0	0	3	1	6	2	0	0
		0	0	11	11	21	15	0	0
8.	A	0	0	4	3	5	4	0	0
	B	0	0	2	6	4	1	0	0
	C	0	0	0	7	1	3	0	0
	D	0	0	2	0	4	4	0	0
	E	0	0	3	6	6	3	0	0
	F	0	0	3	4	7	2	0	0
		0	0	14	26	27	17	0	0
10.	A	0	0	5	3	5	3	0	0
	B	0	0	3	2	4	0	0	0
	C	0	0	1	4	0	3	0	0
	D	0	0	2	5	3	6	0	0
	E	0	0	1	5	6	5	0	0
	F	0	0	3	1	6	2	0	0
	G	0	0	6	6	4	6	0	0
		0	0	21	26	28	25	0	0
20.	A	0	0	0	2	4	2	0	0
	B	0	0	0	1	2	0	0	0
	C	0	0	2	3	2	1	0	0
	D	0	0	2	2	1	0	0	0
		0	0	4	8	9	3	0	0

Ruokitulle maljalle kehittyi ruokkimatonta maljaa enemmän albiinoita versoja (taulukko 11). Versoja kehittyi keskimäärin 2,25 versoa enemmän. Ruokitulle maljalle kehittyi albiinoiden versojen tavoin enemmän vihreitä versoja. Erot jäivät kuitenkin alhaisiksi ja tämän seurauksena syntyneitä eroja voidaan pitää sattumana ja niistä ei voida tehdä johtopäätöksiä. Eri risteytysnumeroiden väleille ei syntynyt merkittäviä eroja versojen tuotossa kehittyneiden versojen lukumäärien ollessa muutaman verson luokkaa.

TAULUKKO 11. Versojen saanto neljännessä tutkimustehtävässä

		Vihreät		Albiinot	
		Ruok.	Ei	Ruok.	Ei
Bor B	A	1	0	0	0
	B	1	2	0	0
	C	1	0	1	0
		3	2	1	0
8.	A	1	0	1	0
	B	0	0	1	1
	C	0	0	0	1
	D	0	0	0	0
	E	0	0	1	0
	F	1	0	1	0
		2	0	4	2
10.	A	0	0	1	0
	B	0	0	3	0
	C	0	0	0	0
	D	0	0	2	0
	E	0	1	0	0
	F	0	1	0	0
	G	1	0	0	0
		1	2	6	0
20.	A	0	1	0	0
	B	1	0	0	0
	C	1	1	0	0
	D	0	0	0	0
		2	2	0	0

6.7 Alkioiden siirtokoko

Ensimmäisessä maljoille tehdyssä tarkastuksessa yhdellekään maljalle ei ollut kehittynyt alkioita (taulukko 12). Toisessa ja kolmannessa tarkastuksessa alkioita siirrettiin muutamia. Alkioiden kehitys oli kokonaisuudessaan vähäistä ja esimerkiksi risteytysnumero 4 kohdalla alkioita ei muodostunut yhtään koko viljelyn aikana. Ensimmäisen tutkimustehtävän tavoin neljännessä tarkastuksessa alkioita ei siirretty yhtään.

Tavallisesti, alkioiden siirto-ohjetta (Boreal Kasvinjalostus Oy n.d.) noudattaen siirrettyjen alkioiden määrät ovat keskimäärin pienempiä, kuin kolmeen ryhmään jaettujen alki-

oiden yhteenlasketut lukumäärät. Tämä on seurausta siitä, että tutkimustehtävässä tutkittiin myös alle 1 mm:n kokoisten alkioiden siirtämistä, joita tavallisesti tehtävässä tarkastuksessa ei oltaisi vielä siirretty.

TAULUKKO 12. Viidennestä tutkimustehtävästä saatujen alkioiden lukumäärät

		1. tarkastus			2. tarkastus			3. tarkastus					
		tav.	<1	1-2	>2	tav.	<1	1-2	>2	tav.	<1	1-2	>2
4.	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.	A	0	0	0	0	6	5	6	2	10	0	4	0
	B	0	0	0	0	3	1	5	1	9	0	0	2
	C	0	0	0	0	3	2	1	1	2	0	3	2
	D	0	0	0	0	1	8	2	2	5	0	0	0
		0	0	0	0	13	16	14	6	26	0	7	4
10.	A	0	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	1
	B	0	0	0	0	2	3	3	1	2	0	0	0
	C	0	0	0	0	1	0	1	1	4	0	0	1
	D	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1
	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	3	3	7	4	11	0	0	3
18.	A	0	0	0	0	9	0	1	0	4	0	0	0
		0	0	0	0	9	0	1	0	4	0	0	0
21.	A	0	0	0	0	2	4	4	0	4	0	0	0
	B	0	0	0	0	3	2	1	0	5	0	1	0
	C	0	0	0	0	6	2	5	1	12	0	2	2
		0	0	0	0	11	8	10	1	21	0	3	2
24.	A	0	0	0	0	3	1	3	0	3	0	0	0
		0	0	0	0	3	1	3	0	3	0	0	0

Sekä vihreiden, että albiinoiden versojen saanto jäi todella vähäiseksi kaikkien risteytysnumeroiden kohdalla (taulukko 13). Jokaisen risteytysnumeroiden kohdalla versojen lukumäärät olivat muutaman yksilön luokkaa. Risteytysnumeroiden 4, 18 ja 24 kohdalla versoja ei kehittynyt ollenkaan. Jokaisen risteytysnumeroiden kohdalla albiinoiden versoja kehittyi enemmän, kuin vihreitä versoja. Tuloksista ei voi tehdä luotettavia johtopäätöksiä versojen määrien ollessa liian alhaisia.

TAULUKKO 13. Versojen saanto viidennessä tutkimustehtävässä

		Vihreät			Albiinot				
		tav.	<1	1-2	>2	tav.	<1	1-2	>2
4.	A	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
8.	A	0	0	0	0	0	0	0	3
	B	0	0	0	0	0	0	1	0
	C	1	1	0	0	0	0	0	1
	D	0	0	0	0	0	0	1	1
		1	1	0	0	0	0	2	5
10.	A	0	0	0	1	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0	1	0
	C	0	0	0	0	0	0	2	1
	D	0	0	0	0	0	0	0	1
	E	0	0	0	0	0	0	1	0
		0	0	0	1	0	0	4	2
18.	A	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
21.	A	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	1	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	1	0	0	0
24.	A	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0

6.8 Maljaus

Ensimmäiseen tarkastukseen mennessä alkioita ei ollut kehittynyt yhtään (taulukko 14). Maljauksien ajankohdat on merkitty taulukkoon vihreällä värillä. Maljauksen yhteydessä siirrettyjen alkioiden lukumäärä on tavallisesti siirrettyjä alkioita suurempi, koska maljauksen yhteydessä myös kaikista pienimmät alkiot siirtyvät regeneraatioalustalle. Eri tarkastusten välillä ei ole havaittavissa selkeää eroa alkioiden lukumäärään liittyen. Jokaisessa tarkastuksessa alkioita siirrettiin suuruusluokaltaan sama määrä.

Siirretyistä alkiosta ei kehittynyt yhtään vihreitä tai albiinoja versoja. Tämän seurauksena tutkimustehtävän tuloksista ei voida tehdä johtopäätöksiä vihreiden versojen saantoon liittyen.

TAULUKKO 14. Kuudennesta tutkimustehtävästä saatujen alkiodien lukumäärät

Ryhmä			1. tarkas- tus		2. tarkas- tus		3. tarkas- tus		4. tarkas- tus		5. tarkas- tus	
			1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1.	21.	A	0	0	4	4	-	0	-	0	-	0
		B	0	0	23	0	-	2	-	3	-	0
		C	0	0	2	1	-	2	-	1	-	0
		D	0	0	2	1	-	3	-	2	-	1
		E	0	0	3	3	-	5	-	2	-	0
		F	0	0	6	5	-	3	-	4	-	0
			0	0	40	14	-	15	-	12	-	1
2.	20.	A	0	0	0	1	2	0	-	0	-	0
		B	0	0	1	0	3	0	-	1	-	0
		C	0	0	1	0	0	2	-	0	-	2
		D	0	0	1	2	11	2	-	4	-	0
		E	0	0	5	2	18	1	-	3	-	0
		F	0	0	0	0	3	1	-	1	-	2
			0	0	8	5	37	6	-	9	-	3
3.	20.	G	0	0	4	3	5	1	4	6	-	0
		H	0	0	4	1	0	0	1	0	-	0
		I	0	0	3	1	3	1	6	2	-	0
		J	0	0	6	9	4	4	20	6	-	3
		K	0	0	0	2	0	1	2	5	-	0
		21.	G	0	0	0	1	2	3	2	3	-
		0	0	17	17	14	10	35	22	-	3	

7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia käytössä olevaa kevätvehnän ponsiviljelymenetelmää ja kehittää saatujen tulosten perusteella vähävaiheinen sekä nopea viljelymenetelmä jolla on hyvä saanto. Tavoitetta ei saavutettu. Kaikkien tutkimustehtävien kohdalla sekä vihreiden, että albiinujen versojen saanto jäi alhaiseksi. Vähäiseen saantoon vaikutti todennäköisesti eniten opinnäytetyössä käytetyn aineiston alhainen responsio. Ainoastaan Bor A -lajike tuotti kohtuullisen määrän versoja. Saannon ollessa muutaman verson luokkaa, ei tulosten perusteella voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä. Alkioiden saanto antaa suuntaa johtopäätöksien tekemiseen, mutta pelkästään alkioiden lukumäärästä ei voida tehdä lopullisia johtopäätöksiä.

Kaikkien tutkimustehtävien kohdalla regeneraatiomaljoille siirretyistä alkioista suurin osa kuivui ja muuttui alle viikossa ruskeiksi. Myös osa pienemmistä, aikaisessa kehitysvaiheessa olevista versoista kuivui (kuvio 5). Kuivumisen seurauksena suurimmasta osasta alkioista ei kehittynyt versoja. Kuivuminen voi olla seurausta usean eri ympäristötekijän vaikutuksesta. Esimerkiksi liian suuri agarpitoisuus regeneraatioalustalla saattaa johtaa kuivumiseen.



KUVIO 5. Kuivuneita alkioita ja versojen alkuja regeneraatioalustalla

Ensimmäisen tutkimustehtävän tavoitteena oli selvittää, onko yli kuukauden vanha induktioalusta edelleen käyttökelpoista vai vanheneeko se vaikuttaen negatiivisesti vihreiden versojen saantiin. Saatujen tulosten perusteella vanhempi alusta tuotti tuoretta alustaa

enemmän alkioita. Alustan ikä ei vaikuttanut vihreiden versojen saantoon ja tulokset olivat kunkin alustan kohdalla suuruusluokaltaan samat. Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että yli kuukauden vanha induktioalusta on edelleen käyttökelpoista. Induktioalustan pidempi käyttöikä vähentää hävitettävän alustan määrää, sillä kaikki valmistettu alusta voidaan käyttää ilman pelkoa sen vanhenemisesta. Samalla alustaa voisi resurssien puitteissa tehdä kerralla enemmän.

Toisen tutkimustehtävän tavoitteena oli selvittää vaikuttaako induktioalustan määrän vähentäminen vihreiden versojen saantoon. Saatujen tulosten perusteella induktioalustan 1 ml:n vähentämisellä ei ole negatiivista vaikutusta vihreiden versojen saantoon. Tuloksen perusteella induktioalustan nestemäärän voisi alentaa 6 ml:n, jolloin ensimmäisen tarkastuksen yhteydessä tehtävä ruokinta nopeutuisi ja samalla saastumisriskiä saataisiin alennettua. Tulosten perusteella voidaan pohtia myös, voisiko alustan määrää vähentää edelleen. Tällöin alkioiden ruokintaa saataisiin nopeutettua ensimmäisen tarkastuksen lisäksi mahdollisesti myös toisessa tarkastuksessa.

Kolmannessa tutkimustehtävässä tutkittiin kolmen eri regeneraatioalustan tuottavuutta ja tavoitteena oli selvittää, mikä alustoista tuottaa parhaiten vihreitä versoja. Y ja Z -alustojen vertailussa Bor A -lajike oli ainoa, jonka kohdalla on mahdollista suorittaa vertailua. Bor A tuotti Y-alustalla 54 vihreää versoja ja Z-alustalla 57. Y -alustan ja siitä modifioidun Z -alustan vihreiden versojen tuoton välillä ei ole merkittävää eroa, vaan niiden voidaan katsoa olevan samaa suuruusluokkaa. Vaikka X ja Y -alustojen vertailussa vihreiden versojen määrä oli pieni, tuotti X -alusta enemmän versoja kaikilla risteytysnumeroilla. Saman suuntaisia tuloksia on saatu aiemmissa tutkimuksissa Bor A:lla. Sekä X ja Y, että Y ja Z -alustojen vertailuista saatujen tulosten perusteella ei voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä liittyen alustojen kykyyn tuottaa vihreitä versoja.

Neljännän tutkimustehtävän tavoitteena oli selvittää, kuinka suuri merkitys alkioiden siirron yhteydessä tehtävällä ruokinnalla on alkioiden ja vihreiden versojen määrään. Alkioiden saannon perusteella merkittävää eroa ruokittujen ja ruokkimattomien maljojen välille ei syntynyt. Ilmeisesti tutkitun aineiston alkioiden määrä ei vielä kuluta alustasta kaikkia kriittisiä ravinteita. Vihreiden versojen saanto jäi liian pieneksi johtopäätösten tekoa varten. Ruokinnan huonoja puolia ovat toisen tutkimustehtävän kaltoin suuri saastumisriski ja maljojen tarkastamiseen kuluva aika. Jos ruokinnalla ei ole suurta vaikutusta vihreiden versojen tuottoon, on syytä harkita ruokinnan pois jättämistä.

Viidennessä tutkimustehtävässä pyrittiin määrittämään alkioille niiden optimaalinen siirtokoko. Kuudennessa tutkimustehtävässä tavoitteena oli selvittää missä vaiheessa alkioiden maljaus kannattaa suorittaa. Molempien tutkimustehtävien kohdalla tulosten perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä.

Haasteena opinnäytetyössä oli optimaalisten viljelyolosuhteiden saavuttaminen ja niiden ylläpitäminen. Jo pieni muutos olosuhteissa saattoi vaikuttaa ratkaisevasti viljelyn lopputulokseen. Poikkeuksellisen kuumen ajanjakson takia emokasvien kasvatusvaiheessa kasvihuoneen lämpötila nousi liian korkeaksi. Tämä saattoi vaikuttaa huomattavasti siihen, millaisiksi emokasvien versot kehittyivät. Opinnäytetyössä käytetyt versot olivat enimmäkseen ohuita ja kellertäviä.

Viljelyolosuhteiden lisäksi toisena haasteena voidaan pitää suurta albiinujen versojen saantoa verrattuna vihreisiin versoihin. Ohralla suoritetuista kokeista suurin osa on koskenut stressitekijöiden ja induktioalustan komponenttien vaikutusta albiinujen versojen määrään. Ohralla oikein valittujen stressitekijöiden yhteisvaikutuksella on pystytty vähentämään albiinujen versojen kehitystä jopa 67,8 %. (Makowska & Oleszczuk 2013, 389). Jos kaikki tai ainakin suurin osa kehittyvistä versoista olisi vihreitä, paranisi saanto huomattavasti. Tästä syystä olisi tärkeää tehdä tarkempaa tutkimusta liittyen kevätvehnän optimaaliseen stressitekijäyhdistelmään.

Kaikki tutkimustehtävät vaativat lisätutkimusten suorittamista. Lisätutkimukset tulisi suorittaa niin, että tutkimustehtävät etenisivät loogisessa järjestyksessä ja aina seuraavassa tutkimustehtävässä voisi hyödyntää edellisestä saatuja tuloksia. Lisätutkimusten aineistoa suunniteltaessa tulee miettiä tarkasti, mitkä risteytysnumerot ja lajikkeet tutkimukseen valitaan. Paras vaihtoehto olisi tehdä tutkimukset jollakin lajikkeella, jolla on tunnetusti hyvä responsio. Toisaalta aineistona voisi käyttää myös useampaa hyvän responsion omaavaa lajiketta. Käytettävän aineiston tulisi olla tässä opinnäytetyössä käytettyä aineistoa suurempi. Suuremmilla nypintämäärillä suoritettujen tutkimusten tuloksista saataisiin suuremmalla todennäköisyydellä enemmän analysoitavaa tietoa, joka edesauttaisi luotettavien johtopäätöksien tekoa.

LÄHTEET

- Boreal Kasvinjalostus Oy. N.d. Jalostus: Tuotekehitystä viljelijöiden hyväksi. Luettu 19.11.2018. <http://www.boreal.fi/jalostustoiminta/>
- Boreal Kasvinjalostus Oy. 2015. Vehnän nypintäohje.
- Boreal Kasvinjalostus Oy. 2017. Vehnän alkioiden siirto-ohje.
- Fagerstedt, K., Lindèn, L., Santanen, A. & Väinölä, A. 2008. Kasvioppi: Siemenestä saatoon. Helsinki. Edita Prima Oy.
- Farmit Website Oy. N.d. Viljan härmä. Luettu 17.11.2018. <https://www.farmit.net/kasvinviljely/kasvinsuojelu/kasvitaudit/tunnistuskuvat/viljanharma>
- Halkka, L. 2001. Meioosi ja rekombinaatio. Luettu 16.11.2018. <http://liihal.pp.fi/sarjat/05-LH-tutkimus/KrMaa99/KrMaaMEI/1meioosi.html#anchor477381>
- Halkka, L. 2003. Polyploidiat. Luettu 18.11.2018. <http://liihal.pp.fi/sarjat/05-LH-tutkimus/KrMaa99/KrMaaEVO/polyploidia.html>
- Kasha, K.J., Simion, E., Oro, R., Yao, Q.A., Hu, T.C. & Carlson, A.R. 2000. An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley.
- Kekkilä Professional. N.d. Kasvualustat ruukku- ja ryhmäkasveille: Taimiseos W HS R8030. Luettu 17.11.2018. <https://www.kekkilaprofessional.com/fi/tuotteet/ruukku-ja-ryhmakasvit/>
- Klima, M., Vyvadilova, M. & Kucera, V. 2008. Chromosome Doubling Effects of Selected Antimitotic Agents in Brassica napus Microspore Culture.
- Koskinen, M. Boreal Kasvinjalostus Oy. 8.10.2018. Henkilökohtainen tiedonanto.
- Lappalainen, F. 2016. Tutkimusprojekti: Kuusen solukkoviljely – tulevaisuuden taimituotantoa. Luettu 17.11.2018. <http://www.biotalous.fi/tutkimusprojekti-kuusen-solukkoviljely-tulevaisuuden-taimituotantoa/>
- Luonnonvarakeskus. 2016. Kasvinjalostus. Luettu 9.11.2018. <https://www.luke.fi/tietoa-luonnonvaroista/maatalous-ja-maaseutu/kasvinjalostus/>
- Makowska, K. & Oleszczuk, S. 2013. Albinism in barley androgenesis. Luettu 27.11.2018. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921450/pdf/299_2013_Article_1543.pdf
- Nabors, M. W. 2004. Introduction to Botany. San Francisco. Benjamin Cummings.
- Opetushallitus. N.d. Etälukio: suvuton ja suvullinen lisääntyminen. Luettu 16.11.2018. <http://www02.oph.fi/etalukio/biologia/kurssi2/suvutonjasuvullinen.html>
- Peltoniemi, K. Boreal Kasvinjalostus Oy. 23.5.2018. Henkilökohtainen tiedonanto.

Puolimatka, M. & Pauk, J. 1998. Vehnän ponsi- ja mikrosporiviljelymenetelmät. Vammala: Vammalan Kirjapaino Oy.

Raj, A. N.d. Process of Androgenesis. Luettu 17.11.2018. <http://www.biologydiscussion.com/plants/process-of-androgenesis-with-diagram-biotechnology/61376>

Ruokatieto Yhdistys ry. 2018. Perustietoa viljoista. Luettu 18.11.2018. <https://www.ruokatieto.fi/ruokakasvatus/ruokaketju-ruuan-matka-pelloilta-poytaan/maatilalla-kasvataan-ruokaa/peltokasvit/perustietoa-viljoista>

Schwartz, E., DeBuhr, L. & Addelson, B. 2009. Pollination. Luettu 12.11.2018. <http://www.mbgnet.net/bioplants/pollination.html>

Suomen lajitietokeskus. N.d. Leipävehnä – *Triticum aestivum*. Luettu 9.11.2018. <https://laji.fi/taxon/MX.40542>

Tenhola-Roininen, T., Tanhuanpää, P. & Immonen, S. 2005. The effect of cold and heat treatments on the anther culture response of diverse rye genotypes.

Ulvinen, S. Boreal Kasvinjalostus Oy. 3.10.2018. Henkilökohtainen tiedonanto.

University of Leicester. N.d. Pollen Development. Luettu 16.11.2018. <https://www2.le.ac.uk/departments/genetics/people/twell/lab/pollenis/development>

Uosukainen, M. 1996. Kontaminaatiot solukkoviljelylaboratoriossa. Luettu 16.11.2018. <https://core.ac.uk/download/pdf/52206263.pdf>

Väänänen, H. 1967. Tiedon portaat 3. Porvoo: Werner Söderström Oy.

LIITTEET

Liite 1. Alustoille X ja Y siirrettyjen alkioiden lukumäärät

		1. tarkastus		2. tarkastus		3. tarkastus		4. tarkastus	
		X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Bor B	A	0	0	0	0	5	5	3	3
	B	0	0	0	0	4	4	3	3
	C	0	0	0	0	3	3	1	1
	D	0	0	0	0	4	4	2	2
	E	0	0	0	0	4	4	1	1
	F	0	0	0	0	3	3	0	0
	G	0	0	0	0	4	4	4	4
	H	0	0	0	0	3	3	1	1
	I	0	0	0	0	2	2	1	1
			0	0	0	0	32	32	16
18.	A	1	1	1	1	4	4	3	3
	B	0	0	4	4	5	5	3	3
	C	1	1	5	5	4	4	4	4
	D	1	1	3	3	3	3	3	3
	E	0	0	5	5	7	7	5	5
	F	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	1	1	3	3	6	6	3	3
	H	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	0	0	2	2	5	5	3	3
	J	1	1	1	1	3	3	2	2
	K	0	0	0	0	0	0	0	0
	L	0	0	3	3	4	4	1	1
	M	0	0	1	1	3	3	1	1
	N	0	0	1	1	7	7	4	4
	O	1	1	3	3	4	4	3	3
	P	0	0	3	3	1	1	0	0
	Q	0	0	3	3	3	3	1	1
	R	0	0	3	3	3	3	1	1
	S	0	0	8	8	5	5	4	4
	T	0	0	1	1	1	1	1	1
U	0	0	4	4	1	1	1	1	
		6	6	54	54	69	69	43	43
20.	A	1	1	2	2	2	2	3	3
	B	1	1	0	0	1	1	0	0
	C	1	1	2	2	2	2	3	3
	D	0	0	2	2	1	1	1	1
	E	1	1	0	0	1	1	1	1

	F	0	0	0	0	2	2	1	1
	G	0	0	3	3	3	3	2	2
	H	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	4	9	9	12	12	11	11
21.	A	0	0	3	3	5	5	0	0
	B	0	0	1	1	4	4	0	0
	C	0	0	1	1	3	3	0	0
	D	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	0
	F	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	0	0	1	1	0	0	0	0
	H	0	0	1	1	2	2	0	0
	I	0	0	2	2	1	1	0	0
	J	0	0	3	3	3	3	1	1
	K	0	0	2	2	3	3	0	0
		0	0	14	14	21	21	1	1

Liite 2. Versojen saanto X ja Y -alustojen vertailussa

		Vihreät		Albiinot	
		X	Y	X	Y
Bor B	A	1	1	1	0
	B	0	0	0	1
	C	0	0	0	2
	D	0	0	1	1
	E	0	0	0	1
	F	1	0	0	1
	G	0	0	0	0
	H	0	0	0	0
	I	1	0	0	1
			3	1	2
18.	A	0	0	0	0
	B	0	0	1	1
	C	1	0	0	0
	D	0	0	0	0
	E	0	0	1	1
	F	0	0	0	0
	G	0	0	0	0
	H	0	0	0	0
	I	0	0	0	0
	J	0	0	0	1
	K	0	0	0	0
	L	0	0	0	0
	M	0	0	0	0
	N	0	0	0	0
	O	0	0	0	1
	P	0	0	0	0
	Q	1	0	1	0
	R	0	0	0	0
	S	0	0	1	0
	T	0	0	0	0
U	0	0	0	0	
		2	0	4	4
20.	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	1	0	0	0
	D	0	0	0	0
	E	0	0	1	0
	F	1	0	0	0
	G	0	0	1	0
	H	0	0	0	0
			2	0	2

21.	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
	D	0	0	0	0
	E	0	0	0	0
	F	0	0	0	0
	G	0	0	0	0
	H	0	0	0	0
	I	0	0	0	0
	J	0	0	0	0
	K	0	0	0	0
		0	0	0	0