

SYREENIEN PITKÄAIKAISSÄILYTYS KRYOMENETELMÄLLÄ

Julia Laurén

Opinnäytetyö
Tammikuu 2011

Laboratorioala
Tekniikan ja liikenteen ala





Tekijä(t) LAURÉN, Julia	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 18.11.2010
	Sivumäärä 75	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (x)
Työn nimi SYREENIEN PITKÄAIKAISSÄILYTYS KRYOMENETELMÄLLÄ		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) LEPPÄAHO, Jaakko, lehtori		
Toimeksiantaja(t) MTT Kasvintuotannon tutkimus, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, vanhempi tutkija NUKARI, Anna, tutkija		
<p>Tiivistelmä</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli pitkäaikaissäilyttää seitsemän eri syreenikantaa (<i>Syringa</i> L.) onnistuneesti aiemmin kehitetyn menetelmän avulla. Lisäksi tarkoituksena oli etsiä jatkokasvatusalustaa, joka mahdollistaisi hyvän elpymisen pakastamisen jälkeen. Opinnäytetyö tehtiin Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskukselle (MTT) Laukaassa. Laukaan toimipiste kuuluu Kasvintuotannon tutkimus -yksikköön. Syreenien kryosäilyttäminen eli nestetyppeen pakastaminen päätettiin tehdä mahdollisimman monelle kannalle, koska menetelmä oli saatu kehitettyä.</p> <p>Pitkäaikaissäilyttäminen tehtiin lajikkeelle 'Julia' kehitetyn menetelmän mukaan. Menetelmänä käytettiin modifioitua pisara-vitrifikaatiomenetelmää. Vastaavaa menetelmää on sovellettu MTT Laukassa aiemmin muun muassa vadelmalle, mansikalle ja pensashanhikille.</p> <p><i>In vitro</i> -lisätystä materiaalista eristettiin kärkisilmut, joiden koko oli välillä 1–2 mm. Silmuja eristettiin yhteensä noin 950 kappaletta, joista noin 35 % käytettiin pitkäaikaissäilytykseen ja muut kontroleihin. Kontrolleja oli kahdenlaisia, +LN-kontrolli sekä –LN-kontrolli. Kontrollisilmuja kasvatettiin käsittelyiden jälkeen kahdella eri alustalla, jotta löydettäisiin mahdollisimman hyvä jatkokasvatusalusta.</p> <p>Modifioidulla pisara-vitrifikaatiomenetelmällä saatiin lupaavia tuloksia kryosäilyttämisestä syreenille. Silmut selvisivät hyvin elossa käsittelyistä, mutta versominen tuotti ongelmia. Parhaiten versoi lajike 'Julia', mutta senkin versomisprosentit jäivät alhaisiksi.</p> <p>Pitkäaikaissäilytys modifioidulla pisara-vitrifikaatiomenetelmällä ei onnistunut halutusti. Vika ei todennäköisesti ollut menetelmässä vaan jatkokasvatusalustassa. Alusta ei ollut sopiva syreenien versomiselle. Niinpä kokeita on jatkettava ja sopiva jatkokasvatusalusta on etsittävä, jotta pitkäaikaissäilyttäminen voidaan tehdä onnistuneesti.</p>		
Avainsanat (asiasanat) Kylmänkestävyys, kryosäilytys, pitkäaikaissäilytys, mikrolisäys, kasvintuotanto, vitrifikaatio		
Muut tiedot		



Author(s) LAURÉN, Julia	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 18112010
	Pages 75	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (x)
Title USING THE CRYOMETHOD FOR LONG-TERM PRESERVATION OF LILAC		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) LEPPÄÄHO, Jaakko, Senior Lecturer		
Assigned by MTT Plant Production Research, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, Senior Research Scientist NUKARI, Anna, Research Scientist		
<p>Abstract</p> <p>The goal of this final thesis was to preserve for a long-time seven different lilac (<i>Syringa</i> L.) accessions successfully using a method which was developed earlier. Another goal was to find a regeneration medium which would make survival of buds after freezing possible. The study was carried out for MTT Agrifood Research Finland at Laukaa. The office at Laukaa is a part of the Plant Production Research unit. It was decided that cryopreservation (preservation in liquid nitrogen) of lilacs is done to as many lilac accessions as possible because there was an existing method available.</p> <p>Long-term preservation was done by the method developed for the cultivar 'Julia'. The method used was a modified droplet vitrification method. A similar method has been applied earlier in MTT Laukaa for example to raspberry, strawberry and shrubby cinquefoil.</p> <p>Apical buds were isolated from plant material which was propagated <i>in vitro</i>. The sizes of apical buds ranged between 1–2 mm. From ca 950 buds that were isolated in total, ca 35% were used for long-term preservation and the others were used for controls. Two different types of controls were used, +LN-control and –LN-control. After the treatments the buds were grown on two different media for finding the best possible regeneration medium.</p> <p>The modified droplet vitrification method gave promising results for lilacs cryopreservation. The buds survived well after the treatment, but sprouting into shoots caused problems. Cultivar 'Julia' sprouted best, but the sprouting percentage stayed low.</p> <p>Long-term preservation by the modified droplet vitrification method did not succeed as wished. The problem was not in the method but in the regeneration medium. The medium was not suitable for lilacs sprouting. So the tests have to be continued and a suitable regeneration medium has to be searched for long-term preservation to be done successfully.</p>		
Keywords Cold-hardiness, cryopreservation, long-term preservation, micropropagation, plant production, vitrification		
Miscellaneous		

SISÄLTÖ

TERMEJÄ.....	4
1 JOHDANTO.....	6
2 SYREENILAJIKKEET	7
2.1 Isabellansyreeni	7
2.2 Jalosyreeni.....	8
2.3 Pihasyreeni	9
2.4 Puistosyreeni.....	12
3 SOLUKKOVILJELMÄT	12
3.1 Mikrolisäys	12
3.2 Mikrolisäyksen edut ja haitat	15
4 KYLMÄNKESTÄVYYS	16
4.1 Kasvien talveentuminen	16
4.2 Kryokestävyys.....	19
5 KRYOSÄILYTYSMENETELMÄT	21
5.1 Kontrolloitu asteittainen jäädytys.....	21
5.2 Kapselointi-dehydraatiomenetelmä	22
5.3 Vitrifikaatiomenetelmät.....	22
5.3.1 Alkuperäinen vitrifikaatiomenetelmä	22
5.3.2 Kapselointi-vitrifikaatiomenetelmä.....	23
5.3.3 Pisara-vitrifikaatiomenetelmä.....	24
6 KÄYTETTY MATERIAALI JA MENETELMÄ SEKÄ TYÖN VAIHEET	25
6.1 Käytetty kasvimateriaali	25
6.2 Modifioitu pisara-vitrifikaatiomenetelmä	25
6.3 Työn vaiheet.....	26
6.3.1 Esikasvatus.....	26

6.3.2 Silmujen eristäminen.....	27
6.3.3 Sokerikäsitteily.....	28
6.3.4 Vitrifikaatio	29
6.3.5 Upottaminen nestetyyppeen ja varsinainen kryosäilytys.....	30
6.3.6 Sulatus.....	30
6.3.7 Jatkokasvatus	31
7 MODIFIOIDUN PISARA-VITRIFIKAATIOMENETELMÄN TULOKSET	34
7.1 Tulokset syreenikannoilla	34
7.1.1 Lajike 'Holger'	34
7.1.2 Lajike 'Andenken an Ludwig Späth'	37
7.1.3 Kanta A2	39
7.1.4 Kanta A20	41
7.1.5 Lajike 'Katherine Havemeyer'	43
7.1.6 Lajike 'Julia'	45
7.1.7 Lajike 'Ainola'	48
7.2 Yhteenveto tuloksista	51
7.3 Tulosten tarkastelu	54
7.3.1 Modifioidun pisara-vitrifikaatiomenetelmän toimivuus syreeneille ...	54
7.3.2 Virhelähteitä ja ongelmia.....	57
8 JOHTOPÄÄTÖKSIÄ.....	59
8.1 Menetelmän toimivuus	59
8.2 Menetelmäsuositus	60
8.3 Tulevaisuuden näkymiä	61
LÄHTEET	62
LIITTEET	64
Liite 1. Kasvien menestyminen Suomessa vyöhykkeittäin	64
Liite 2. Käytetyt alustat.....	65

Liite 3. Käytetyt liuokset	72
Liite 4. Eristettyjen silmujen määrät sekä niiden jakautuminen eri kokeisiin	73
Liite 5. -LN-kokeiden kaikkien kantojen eloonjäämis- ja versomisprosentit maljalla kasvupistelinjoittain ja jatkokasvatusalustoittain.....	74
Liite 6. +LN-kokeiden kaikkien kantojen eloonjäämis- ja versomisprosentit maljalla kasvupistelinjoittain ja jatkokasvatusalustoittain.....	75

TERMEJÄ

alginaattihelmi	kalsiumkloridiliuokseen tiputetaan alginaattiliuosta, jolloin muodostuu helmi
auksiini	kasvihormoni, edistää kasvua
BAB	6-bentsyyliaminopuriini
diploidi	solu tai yksilö, jolla on kaksinkertainen kromosomisto
DMSO	dimetyylisulfoksidi
IBA	indoli-3-voihappo, synteettisesti valmistettu auksiini
<i>in vitro</i>	elämistä lasissa, tekniikka, jossa kasvia kasvatetaan esimerkiksi lasipurkissa tai koeputkessa
<i>in vivo</i>	kasvatus, joka tehdään elävässä olennessa tai solussa
haploidi	solu tai yksilö, jolla on yksinkertainen kromosomisto
kallus	kasvin erilaistumatonta solukkoa, jakautuu aktiivisesti ja sitä muodostuu muun muassa kasvin haavaumakohtiin
kasvupistelinja	kasviaineisto, joka on lisätty yhdestä kasvupisteestä
KS	kärkisilmu
kryosäilytys	pitkäaikaissäilytysmenetelmä, jossa haluttu biologinen materiaali säilötään nestetyyppeen (−196 °C) tai sen kaasufaasiin (alle −150 °C), josta se voidaan ottaa tarvittaessa uudelleen käyttöön
LS	latausliuos (loading solution), vitrifikaatiokäsittelyn ensimmäinen liuos
meristeemi	kasvin kasvusolukkoa, joka ei ole vielä erikoistunut kasvinosaksi
mikrolisäys	kasvin kasvullista lisäämistä aseptisesti laboratoriossa
PEG ₁₀₀₀ ja PEG ₆₀₀₀	polyetyleeniglykoli (molekyyli­massa 1000 ja 6000)
protoplasti	kasvisolu, jonka soluseinä on poistettu
PVP	polyvinyylipyrrolidoni
PVS2	vitrifikaatiokäsittelyn toinen liuos (plant vitrification solution 2)
vitrifikaatio	kylmä­säilytys­menetelmä, jossa solujen sisältämää vettä korvataan kemikaaleilla

+LN-koe	koe, jossa silmut käyvät lävitse vitrifikaatiokäsittelyn ja lopuksi nestetyypikäsittelyn
-LN-koe	koe, jossa silmut eivät koe nestetyypikäsittelyä, mutta käyvät lävitse vitrifikaatiokäsittelyn muiden silmujen tavoin

1 JOHDANTO

Puutarhakasveille on alettu soveltaa kryosäilytystä MTT:ssä eli Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksessa vuonna 2004, ja vuonna 2006 Laukaan toimipisteeseen perustettiin kryopankki, geenipankki, jonka säilytysmenetelmänä käytetään kryosäilytystä (Veteläinen 2008, 24). Laukaassa on käytössä kryosäilytysmenetelmä muun muassa vadelmalle (*Rubus idaeus* L.), mansikkalle [*Fragaria x ananassa* (Weston.) Royer.], herukalle (*Ribes Rubrum*-ryhmä ja *Ribes nigrum* L.), luumulle (*Prunus domestica* L.), kirsikalle (*Prunus cerasus* L.), lakalle (*Rubus chamaemorus* L.) ja humalalle (*Humulus lupulus* L.). Menetelmää kehitetään mahdollisimman monelle kasvilajille, ja näihin kasveihin kuuluu myös syreeni. (Nukari & Rantala 2009, 3.)

MTT toimii Maa- ja metsätalousministeriön alaisuudessa. Se on maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maatalouden ympäristötutkimusta tekevä laitos. Työntekijöitä MTT:llä on yhteensä noin 850 henkilöä 14 toimipaikalla eri puolilla Suomea. Päätoimipaikkana on Jokioinen. (Innovaatiota uusiutuvista luonnonvaroista 2009.) MTT:n tutkimustoiminta on organisoitu kuuteen eri tutkimusalaan sekä tutkimusohjelmiin (Osaaminen kuudessa tutkimusalassa 2009). Yksi näistä tutkimusaloista on Kasvintuotannon tutkimusyksikkö, johon Laukaan toimipiste kuuluu. Laukaan toimipisteen vastuualueita ovat varmennetun taimituotannon menetelmäkehitys, ydinkasviaineiston puhdistaminen, ydinkasvipankki, taimien tuotantomenetelmät sekä puutarhakasvien geenivarojen kryosäilytys. (MTT Laukaa 2009.)

MTT:n Kasvintuotannon tutkimusyksikössä tuli tarve siirtää joitakin syreenilajikkeita pitkäaikaissäilytykseen. Niinpä lajikkeelle 'Julia' alettiin kehittää modifioitua pisara-vitrifikaatiomenetelmää. Menetelmäkokeita tehtiin pienelle otokselle, mutta tällä otoksella saatiin lupaavia tuloksia. Saatujen tulosten perusteella päätettiin, että halutaan siirtää mahdollisimman monta kantaa pitkäaikaissäilytykseen. (Nukari, Laamanen & Uosukainen n.d.)

Tehtäväkseni annettiin pitkäaikaissäilyttää seitsemän eri kantaa. Tarkoituksena oli saada jokaisesta kannasta vähintään 30 silmua pitkäaikaissäilytykseen kryotankkiin. Käytettävää menetelmää oli tarkoitus samalla tutkia, jotta saataisiin varmuus siitä onnistuuko pakastaminen niin hyvin, että kannat olisivat elvytettävissä tankista myöhemmin. Tarkoituksena oli vertailla lajikkeiden ja kantojen välisiä eroja ja sitä, onko kasvupistelinjojen välillä huomattavissa eroja. Lisäksi yritettiin etsiä jatkokasvatusalustaa, joka mahdollistaisi hyvän elpymisen pakastamisen jälkeen.

Syreeni kuuluu öljypuukasvien heimoon *Oleaceae* ja sukuun *Syringa* (Juhanoja 2008), eikä sille ole tiettävästi onnistuttu kehittämään kryosäilytysmenetelmää. Samaan heimoon kuuluu myös oliivi (*Olea europaea*), jota on pakastettu onnistuneesti nestetyypeen. Kryosäilyttäminen ei ole onnistunut kapselointi-dehydraatiomenetelmällä eikä kapselointi-osmosuojaus-dehydraatiomenetelmällä, mutta käyttämällä kaksivaiheista PVS2-liuoskäsittelyä (30 min 50-prosenttisessä PVS2-liuoksessa ja 60 min 100-prosenttisessä PVS2-liuoksessa), on saatu lupaavia tuloksia 'Frantoio'-oliivin kärkisilmujen pakastamisessa. (Lynch, Siddika, Mehra, Fabbri, Benelli & Lambardi 2007, 221.)

2 SYREENILAJIKKEET

2.1 Isabellansyreeni

Isabellansyreenit (*Syringa x prestoniae*) ovat syntyneet nuokkusyreenin ja viltai- tai puistosyreenin risteyminä ja ne on useimmiten jalostettu Pohjois-Amerikassa. Niiden kukinta vaihtelee lajikkeittain, mutta lehdet muistuttavat lähinnä puistosyreeniä. Kukinta kestää noin kolme viikkoa ja alkaa kesäkuun puolessa välissä. (Räty 2009, 100.) Lajikkeet menestyvät Pohjois-Suomeen saakka vyöhykkeillä I–VI (VII) (ks. liite 1) ja ne ovat hyvin suosittuja ulkomailla

(Alanko & Lagerström 2009, 226). Lajikkeista yleisimmät ovat 'Coral', 'Elinor', 'James MacFarlane' sekä tutkimuksessa mukana ollut 'Holger' (Räty 2009, 100).

'Holger' (ks. kuvio 1) on kukinnoltaan puhtaasti valkoinen ja pysty. Lajike on kotoisin Tolppolan taimistolta Espoosta ja se on kasvatavaltaan hyvin säännöllinen. Tämä lajike viihtyy hyvin vyöhykkeillä I–VI (ks. Liite 1). (Räty 2009, 100.)



KUVIO 1. 'Holgerin' kukinto
(kuva Lassilan taimisto 2010)

2.2 Jalosyreeni

Jalosyreenit (*Syringa Vulgaris*-ryhmä) ovat jalostettuja pihasyreeneitä (Alanko & Lagerström 2009, 224). Ne erottuvat pihasyreeneistä kukintonsa avulla. Jalosyreenien kukinto on suurempi, poikkeavan värinen sekä kerrannainen. Jalosyreenit kasvavat korkeiksi, noin 2–3 m. Jalosyreenit ovat kukkiensa puolesta komeita ja arvostettuja pensaita. Jalosyreeneitä voidaan viljellä vain eteläisessä Suomessa (vyöhykkeillä I–III, ks. Liite 1), sillä ne ovat vaateliaita kasvupaikan suhteen ja vaativat jatkuvaa hoitoa. (Alanko 1997, 206.) Yleisimmin viljeltyjä lajikkeita ovat 'Charles Joy', 'Krasavitsa Moskvý', 'Michel Buchner', 'Mme Lemonei', 'Prairie Petite' sekä tutkimuksessa mukana ollut 'Andenken an Ludwig Späth' (Räty 2009, 101).

'Andenken an Ludwig Späth' (ks. kuvio 2) kuuluu Ludwig Späth -tyyppiin, jonka kukinto on pyramidimainen tai kapeanpyramidimainen ja joko keskipitkä tai pitkä. Kukka on hyvin suuri ja tummanpunainen (ks. kuvio 3). Lajike on Späthin jalostama muoto vuodelta 1883, ja nykyään se on taimistojen ja viheralan liikkeiden yleisin syreenilajike. (Hauta-aho 2006, liite 2, 6.)



KUVIO 2. Ludwig Späth -tyypin kukinto (kuva Laura Hauta-aho)



KUVIO 3. Ludwig Späth -tyypin kukka (kuva Laura Hauta-aho)

2.3 Pihasyreeni

Pihasyreeni (*Syringa vulgaris* L.) on maamme yleisimpiä koristepensaita ja se on kotoisin Kaakkois-Euroopan vuoristoalueilta. Kasvia on käytetty koristepensaana Suomessa jo yli 250 vuotta. Pihasyreenin tiedetään saapuneen Suomeen ensimmäistä kertaa 1700-luvun alussa. Ensimmäinen taimi on tuotu Turkuun vuonna 1728 Tukholmasta. (Hauta-aho 2006, 3.)

Pihasyreenin kukinto on runsas ja pituudeltaan 10–20 cm sekä tuoksultaan hyvin voimakas. Pensas on tiheä ja pystyversoinen, noin 2–5 m korkea. Pihasyreeni on kestävä laji ja se menestyykin aina Etelä-Lappiin saakka (vyöhykkeillä I–VI, ks. liite 1). (Alanko 1997, 205.) Pihasyreeneistä tutkittavina olivat kannat A2 ja A20 sekä lajike 'Katherine Havemeyer'.

Kanta A2 kuuluu Lemonei-tyyppiin ja sen kukat (ks. kuvio 5) ovat sinillilat ja kerrannaiset mutta pienet. Kukinnot (ks. kuvio 4) puolestaan ovat lyhyet, mutta melko tiheät. Vaikka kukinto on lyhyt, on se niin runsas, että se tekee kukinnosta näyttävän näköisen. Lemonei-tyypin nuput ovat punertavan violetit eikä

tyyppi ole Suomessa yleinen ja maailmallakin se on ilmeisesti unohdettu. Tyyppin on jalostanut Victor Lemonei vuonna 1878. (Hauta-aho 2006, liite 2, 17.)



KUVIO 4. Lemonei-tyypin kukinto (kuva Laura Hauta-aho)



KUVIO 5. Lemonei-tyypin kukka (kuva Laura Hauta-aho)

Kanta A20 kuuluu A20-tyyppiin, jonka kukinto (ks. kuvio 6) on noin 18 cm pitkä ja keskitiheä. Kukka (ks. kuvio 7) on väritään purppuranpunainen ja muodoltaan suuri ja kulhomainen. A20-tyyppi on erikoisen näköinen ja harvinainen. Se muistuttaa monia lajikkeita muodoltaan, mutta mitään näistä lajikkeista ei ole saatavilla suomalaisilta markkinoilta. Myöskään A20-tyyppiä ei ole saatavilla, mutta sitä on alettu lisätä ainakin yhdellä taimistolla. Tyyppille ei ole löytynyt kyllin hyvää nimiehdotusta. (Hauta-aho 2006, liite 2, 7.)



KUVIO 6. A20-tyyppin kukinto
(kuva Laura Hauta-aho)



KUVIO 7. A20-tyyppin kukka (kuva Laura
Hauta-aho)

'Katherine Havemeyer' kuuluu Katherine Havemeyer -tyyppiin, joka on ehkä kaunein tavattu pihasyreenityyppi. Tämän tyyppin kukinto (ks. kuvio 8) on kaksivärinen, pyramidimainen, täyteläinen, keskipitkä ja melko leveä. Kukka (ks. kuvio 9) on kerrannainen, lila ja erittäin suurikokoinen. Tämä syreenityyppi on erittäin kaunis ja harvinainen puistoalueilla. Lajike on maailmalla hyvin suosittu, mutta Suomesta sitä löytyy vain harvoista taimistoista ja viheralan yrityksistä. Lajike on Lemonein tuotantoa vuodelta 1922. (Hauta-aho 2006, liite 2, 15.)



KUVIO 8. Katherine Havemeyer -tyypin
kukinto (kuva Laura Hauta-aho)



KUVIO 9. Katherine Havemeyer
-tyypin kukka (kuva Laura Hau-
ta-aho)

2.4 Puistosityreeni

Puistosityreeni (*Syringa x henryi* C.K. Schneid.) on unkarinsyreenin ja vil-lasyreenin risteymä eikä unkarinsyreeni niin kuin ennen luultiin. Puistosityreeni kasvaa noin 2–4 m korkuiseksi pensaaksi. Kukinto on unkarinsyreeniä le-veämpi ja harsumpi. Puistosityreeni kukkii Etelä-Suomessa kesäkuussa ja Poh-jois-Suomessa heinäkuussa. Sitä voidaan kasvattaa vyöhykkeillä I–VII (ks. liite 1). (Alanko 1997, 202.) Tunnetuimpia puistosityreenilajikkeita ovat 'Tamme-lan Kaunotar' sekä tutkimuksessa mukana olleet 'Julia' ja 'Ainola'.

'Julian' kukinto (ks. kuvio 10) on nuok-kuva, liilanpunainen ja hyvin suuri. 'Julia' on peräisin Närpiöstä ja se menestyy vyöhykkeillä I–VI (ks. liite 1). 'Ainola' taas on kotoisin Jyväskylän seudulta ja sen kukinto on tumman violetti. (Räty 2009, 99.)



KUVIO 10. 'Julian' kukinto (kuva Lassilan taimisto 2010)

3 SOLUKKOVILJELMÄT

3.1 Mikrolisäys

Mikrolisäämisellä tarkoitetaan kasvien lisäämistä kasvinosista. Mikrolisättyjä kasveja voidaan tuottaa joko yksittäisistä soluista, protoplasteista, erilaistu-mattomasta kallussolukosta tai erilaistuneista solukoista. Mikrolisäys voidaan aloittaa generatiivisista soluista, joita ovat kasvin siitepölyhiukkaset ja mu-nasolut, tai vegetatiivisista solukoista, joita ovat kaikki muut kasvin osat. Aloit-tamalla vegetatiivisesta solukosta tuotetaan emokasvista klooneja eli täsmäl-leen samanlaisia yksilöitä. Kun taas aloittamalla generatiivisesta solusta, saa-daan emokasvista poikkeavia yksilöitä. (Haapala & Niskanen 1992, 15, 22.)

Vegetatiivisia solukkoviljelmiä ovat meristeemiviljelmät, versonkärki- ja silmu-
viljelmät, kallusviljelmät, solu- ja suspensioviljelmät sekä protoplastiviljelmät.
Meristeemiviljelmät ovat suhteellisen stabiileja, sillä niissä ei tapahdu juuri
lainkaan muuntelua. Meristeemiviljelmiä aloitetaan meristeemialoituksesta.
Meristeemisolukkoa löytyy kaikista kasvavista kasvinosista, mutta helpointa
on aloittaa meristeemistä, joka sijaitsee silmun sisällä. (Haapala & Niskanen
1992, 15.)

Meristeemin irrottaminen aloitetaan pintasteriloidusta oksasta, jonka silmun
ympäristä aletaan varovasti poistaa silmusuomuja ja lehdenaiheita. Meristee-
min suojaksi jätetään 2–5 lehtiaihetta ja meristeemi irrotetaan ottaen mukaan
meristeemin alapuolista solukkoa. Tällöin meristeemi on valmis siirrettäväksi
kasvatusalustalle, jossa se alkaa helposti tuottaa fenoleita, jotka ovat myrkylli-
siä. Fenoleiden myrkyllisyyttä ehkäistään siirtämällä aloitus uudelle kasva-
tusalustalle. Jos meristeemi lähtee hyvin kasvuun, on sen viljely riskittömäm-
pää. Noin kuukauden välein meristeemistä kasvanut kasvi paloitellaan ja palat
siirretään kasvamaan uudelle alustalle. (Haapala & Niskanen 1992, 17.)

Versonkärki- ja silmuviljelmät aloitetaan samalla tavalla kuin meristeemiviljel-
mät, mutta tässä viljelmätavassa mukaan aloitukseen otetaan joko koko silmu
tai vielä suurempi pala. Suurempi pala voi olla jopa yksi senttimetri vartta, jos-
sa on mukana yksi tai useampia silmuja. Silmut asetetaan kasvatusalustalle.
Silmut alkavat versoa yleensä kolmen viikon kuluessa, minkä jälkeen versot
katkotaan pätkiksi, joissa on yhdestä kolmeen silmua. Pätkät laitetaan kasva-
tusalustalle ja niille voidaan toistaa monistaminen tai ne voidaan siirtää juurru-
tusalustalle juurtumaan. (Haapala & Niskanen 1992, 18.)

Kallusviljelmät eivät ole suositeltavia tehtäessä kasvien kloonauksista, sillä
kallusolukossa somaklonaalisen muuntelun mahdollisuus on suuri. Kallusta
kasvaa aina jonkin verran aloituspalan leikkauskohtaan, ja sitä kasvatetaan
yleensä pimeässä alustalla, johon on lisätty auksiinia. Pimeässä kasvatuksen
jälkeen kallus siirretään auksiinittomalle alustalle valoon. Tällöin kalluksen so-
luista alkaa kehittyä alkioita muistuttavia rakenteita. Myöhemmin näistä kasvul-

lisistä alkioista alkaa kehittyä versoja, joita voidaan lisätä samalla tavalla kuin meristeemiviljelmiä sekä versonkärki- ja silmuviljelmiä. (Haapala & Niskanen 1992, 18–19.)

Solu- ja suspensioviljelmiä varten pitää ensiksi kasvattaa kallusta ja hajottaa se joko kemiallisesti tai mekaanisesti. Tämän jälkeen se siirretään nesteviljelyalustalle ja saadaan suspensioviljelmä. Nestealustoja ravistellaan, jotta saadaan solut pysymään irrallaan toisistaan, ja lisäksi siksi, että saataisiin alustaan happea. Viljelmässä solut lisääntyvät jakaantumalla. Kiinteällä alustalla yksittäisistä soluista saadaan versoja tai kasvullisia alkioita, sillä yksittäinen solu kasvattaa kiinteällä alustalla kallusta. Solu- ja suspensioviljelmiä ei tehdä pelkästään kasvin lisäämisen takia, vaan niillä pystytään tuottamaan myös käyttökelpoisia kemiallisia yhdisteitä. (Haapala & Niskanen 1992, 19.)

Protoplastiviljelmiin voidaan käyttää mitä tahansa kasvin osaa, mutta yleisintä on käyttää lehden solukkoa. Protoplasti valmistetaan pilkkomalla lehti suikaleiksi ja käsittelemällä soluseiniä liuottamalla entsyymillä. Näitä protoplasteja voidaan käyttää muun muassa geeninsiirroissa. Erilliset protoplastit siirretään kasvatusalustalle, jossa niihin kasvaa uudelleen soluseinä ja viljelmistä muodostuu soluviljelmä. (Haapala & Niskanen 1992, 19.)

Generatiivisia solukkoviljelmiä ovat hede- ja siitepölyviljelmät, alkioviljelmät ja mikrovarrtaminen. Hedeviljelmät tehdään heteiden ponsista, kun taas siitepölyviljelmät tehdään heteistä erotelluista siitepölyhiukkasista. Kummassakin tapauksessa kasvattaminen tehdään kasvatusalustalla. Kasvatusalustaa säätelämällä voidaan tuottaa joko haploidia kallusta, josta versot erilaistuvat tai haploideja alkioita, jotka kasvavat versoiksi. (Haapala & Niskanen 1992, 20.)

Alkioviljelyn avulla voidaan pelastaa kahden eri kasvilajin risteytysjälkeläinen silloin, jos siemenvalkuainen ei kehity siemenessä. Nuoret alkioit irrotetaan siemenestä ja siirretään kasvatusalustalle. Tuloksena saadaan emokasvista poikkeavia diploideja, sillä hedelmöittyminen on ehtinyt tapahtua. (Haapala & Niskanen 1992, 20.)

Mikrovarttaminen tapahtuu steriileissä olosuhteissa. Varteina käytettäviä versoja ja perusrunkoja lisätään erikseen. Kun materiaalia on tarpeeksi, perusrungot juurrutetaan ja katkaistaan noin 1,5 cm:n mittaisiksi versoiksi. Varteoksan verso liitetään varren yläosaan tehtyyn terävään pystysuoraan viiltoon ja vartteen alaosa leikataan kiilamaiseksi. Näin aikaan saatu varte siirretään kasvatusalustalle ja vartekohdan umpeuduttua turvehiekkaseokselle kasvaamaan. (Haapala & Niskanen 1992, 21.)

3.2 Mikrolisäyksen edut ja haitat

Solukkoviljelyn etuna verrattuna perinteiseen kasvintuotannon lisäysmenetelmään on nopeus. Mikrolisäyksessä on mahdollista tuottaa yhdestä yksilöstä rajattomasti kasveja, ja lisäksi jakaminen voidaan suorittaa esimerkiksi neljän viikon välein. Toinen etu verrattuna perinteiseen kasvintuotantoon on, että mikrolisäystä voidaan tehdä huomattavasti pienemmässä tilassa. Kun säästyy tilaa, säästyy myös energiaa, joka tarvitaan kasvatustilan lämmittämiseen ja valaisuun. (Haapala & Niskanen 1992, 28.)

Mikrolisättyjen kasvien hoito on myös helpompaa kuin perinteisen kasvintuotannon lisäysmenetelmällä tehtyjen kasvien. Mikrolisättyjä kasveja ei tarvitse kastella eikä muutenkaan hoitaa ennen uudelle kasvatusalustalle siirtoa. Myöskään ei ole väliä, missä vaiheessa kasvien lisäys aloitetaan. Yksi iso etu on, että aseptisissä viljelmissä kasvien infektoituminen on hankalampaa verrattuna perinteisiin kasvinlisäysmenetelmiin. (Haapala & Niskanen 1992, 28.)

Solukkoviljelyksessä pyrkimyksenä on tuottaa keskenään samanlaisia kasveja. Kuitenkin kasvien väleille syntyy eroja somaklonaalisen muuntelun takia, mikä on haitaksi mikrolisäykselle. Somaklonaalista muuntelua lisäävät kasvatusalustaan lisätyt kasvihormonit, joita alustoista löytyy luontoon verrattuna väkevämpinä konsentraatioina. Toisaalta somaklonaalinen muuntelu ei ole pelkästään haitta, sillä se mahdollistaa hyödyllisten poikkeavien yksilöiden muodostumisen. (Haapala & Niskanen 1992, 29.)

Mikrolisäyksen kannalta merkittävä tekijä on ikä. Viljelmän vanhetessa varsinkin kallusviljelmissä saattaa syntyä poikkeavia yksilöitä. Solukkoviljelyn haittana on myös se, että sen kaikkia pitkäaikaisvaikutuksia ei vielä tunneta. Yhtenä suurimmista haitoista mikrolisäyksen aloitukselle ovat suuret kustannukset. Aloitus vaatii perustarvikkeiden hankkimisen, mutta myöhemmin kemikaalikustannukset ovat melko vähäiset. Lopulta taimen hintaan vaikuttavat eniten henkilöstökustannukset, eivät niinkään käytetyt materiaalit, kuten kemikaalit. Henkilöstökustannuksia on pyritty pienentämään roboteilla eli automatisoinnilla. On kuitenkin tärkeää muistaa, ettei automatisointi ole ratkaisu henkilöstökustannusten suuruuteen, ennen kuin tuotettujen versojen kysyntä on jatkuvasti runsasta. (Haapala & Niskanen 1992, 29.)

4 KYLMÄNKESTÄVYYS

4.1 Kasvien talveentuminen

Kasvit alkavat valmistautua talvea varten eli talveentua jo syksyn alkaessa lähestyä. Tällöin kasvien kasvu päättyy, talvenkestävät silmut valmistuvat, joitakin kasvien osia kuolee ja soluissa tapahtuu muutoksia. Solun muutokset tapahtuvat, jotta solu pystyisi sietämään lämpötilan suuren vuotuisen vaihtelun (Havas & Sulkava 1987,36, 42).

Kasvin talveentumisen alkamiseen vaikuttavat suuresti päivän pituus sekä lämpötila. Talveentuminen etenee sitä mukaa, mitä kylmemmäksi ilma muuttuu. Kuitenkaan pelkkä lämpötilan laskeminen ei täysin aiheuta talveentumisen alkamista vaan se on yleensä monen tekijän summa. Yksi tärkeistä vaikuttajista on päivän pituus. Kasvi aistii pitkän yön ja alkaa valmistautua talveen. Vaikutuksen huomaa muun muassa siitä, että ruskan alkaminen vaihtelee leveyspiireittäin. Kaupungeissa kasvien talvehtimiseen vaikuttavat kuitenkin myös katuvalot. Ne vaikuttavat lehtien pysymiseen puissa, sillä katuvalot

tuovat valoisuutta ja näin lyhentävät kasvien yöaikaa. (Havas & Sulkava 1987, 44–45.)

Kasvien talveentuminen alkaa syksyllä lehtien putoamisella, mutta sitä ennen on täytynyt ottaa talteen kasveille tärkeitä ainesosia, kuten klorofyllit eli lehtivihreä. Osa puista ei kuitenkaan ota talteen lehtivihreää vaan pudottaa lehtensä vihreinä. Tällaisiin kasveihin lukeutuvat myös syreenit. (Havas & Sulkava 1987, 42.)

Lehtivihreän talteen ottaminen on kasville tärkeää, mutta vielä tärkeämpää on estää soluja jäätymästä niin, että solun rakenne hajoaisi. Solun biokemiallisia muutoksia ohjaa geneettinen informaatio. Talveentuminen alkaa ympäristötekijöiden vaikutuksesta ja merkitsee muun muassa entsyymien muodostumista sekä hormonitoiminnan muutoksia. (Havas & Sulkava 1987, 47.)

Kasveista haihtuu vettä talvellakin, mutta veden ottaminen jäisestä maasta on lähes mahdoton tehtävä. Veden haihtuminen on lähinnä passiivista ja se tapahtuu pääasiassa pintasolujen seinien lävitse. Haihtuminen on suurempaa silloin, kun aurinko lämmittää lehden pintaa. (Havas & Sulkava 1987, 93, 98.)

Kasvien on kerättävä riittävät energia- ja ravintovarastot jo paljon ennen pakkasten tuloa syksyllä. Näiden varastojen avulla kasvi selviää talven yli. Kasvi kerää varastoja varsinkin juuriin, varsiin, ikivihreisiin lehtiin ja silmuihin. Tärkeimpiä varastoaineita ovat tärkkelys, sokerit sekä rasvat. (Havas & Sulkava 1987, 48.)

Kasvien pakkasenkestävyyden kannalta tärkeintä on vesitalous. Jotta kasvien solut voisivat kestää pakkasen, on solujen sisällä oltava mahdollisimman vähän vapaata vettä. Näin ollen solujen vesipitoisuuden on vähennyttävä talven ajaksi. Tärkeintä on poistaa vapaa vesi solulimasta, sillä solu ei kestä jääkiteiden syntyä. Solujen sisällä tapahtuva jään muodostus saattaa johtaa kasvin kuolemaan. (Havas & Sulkava 1987, 48.)

Solun ulkopuolelle pääsee muodostumaan jääkiteitä, sillä solun sisältä poistunut vesi on kertynyt solujen väleihin eikä solun ulkopuolisten tilojen liuenneiden aineiden pitoisuus ole niin suuri kuin solun sytoplasman. Kuitenkin solun ulkopuolisen veden jäätymispiste on todellisuudessa yhdestä kahteenkymmeneen astetta alhaisempi kuin puhtaan veden. (Marchand 1996, 45.)

Solun ulkopuolelle muodostuneen jään ja solun sisällä olevan jäätyttömän veden välinen energiaero on suuri ja tästä aiheutuu, että aktiivisemmat liuosmolekyylit pyrkivät tunkeutumaan jään pintaan. Näin ollen sytoplasminen vesi liikkuu solukalvon lävitse ja ulos solusta lisäten kasvavien jääkiteiden määrää. Koska solun sisältä poistuu vettä, väkevöityy solun sisältö, jolloin jäätymispiste alenee entisestään. (Marchand 1996, 45.)

Solun kuolemaan johtava tapahtuma ei ole täysin selvä. Uskotaan, että proteiinien (solukalvon molemmilla puolilla) on mahdollista vaurioitua niin, että kaliumionit ja sokeri pääsevät virtaamaan kanavaa pitkin pois solusta. Jäätymisen yhteydessä solukalvon läpäisykykyä saattaa muuttaa solukalvon lipidien uudelleen järjestäytymistä niin, ettei ole havaittavissa kerrosrakennetta. (Marchand 1996, 46.)

Vaihtoehtoinen selitys solun kuolemalle on Weiserin hypoteesi elintärkeästä vedestä. Jäätymisen aikana, pisteessä jolloin kaikki saatavilla oleva vesi on siirretty solun ulkopuolelle ja jäänyt, protoplasmassa on vain vesisidoksia muistuttavia makromolekyylejä. Lämpötilan edelleen laskiessa, sidokset hajoavat ja alkaa ketjureaktio, jossa denaturaatiota seuraa veden väheneminen ja lopulta solun kuolema. (Marchand 1996, 46–47.)

Solun ulkopuolella voi olla vettä niin paljon, että tapahtuu peruuttamatonta vahinkoa. Muuten solun sisäiset jääkiteet voivat läpäistä soluseinän rakenteen ilman vahinkoa, ainoastaan protoplasman väheneminen aiheuttaa solukalvon irtoamisen kalvosta itsestään. Tätä ilmiötä kutsutaan 'pakkasplasmolyysiksi' (frost plasmolysis) ja se on harmiton niin kauan kuin solun ulkopuolista jäätymistä ei esiinny. (Marchand 1996, 48.)

Kasveilla on taito itse muodostaa jäätymisen estoaineita. Tällaisia aineita ovat sokerit, vesiliukoiset valkuaisaineet, aminohapot sekä antosyaanit, jotka aiheuttavat ruskan punaisen värin. Nämä aineet estävät jään muodostumisen solun sisälle ja niillä epäillään olevan vaikutusta myös siihen, miten solu kestää kertyvien myrkkyjen haittavaikutusta. (Havas & Sulkava 1987, 59.)

Aina ei ole täysin selvää kuoleeko kasvi kylmyyden takia vai sen, että kasvi kuivuu. Monilla kasveilla on kyky sietää yhtä aikaa kylmyyttä ja kuivuutta. Solutasolla voidaan sanoa, että kuivuuden ja jäätymisen vaikutukset ovat lähes samat. (Havas & Sulkava 1987, 92–93.)

4.2 Kryokestävyys

Kryosäilytysmenetelmät ovat kehittyneet viime vuosina vauhdilla. Hyvät tulokset kryosäilyttämisestä vaativat hyviä kasvien kasvuolosuhteita, riittävän hyväkuntoista kasvimateriaalia, kehittyneitä menetelmiä ja hyviä toipumisolosuhteita. (Uchendu & Reed 2008, 181–182.)

Kryosäilyttämisessä mennään hyvin alhaisiin lämpötiloihin, jolloin ollaan lähes 200 °C alhaisemmassa lämpötilassa kuin veden jäätymispiste. Tällöin havaittava solun kestävyys on poikkeuksellista jopa nykyaikaisen rakenne- ja molekyylibiologian näkökulmasta. Mutta useimmissa näissä tilanteissa on välttämätön tarve ainesosalle, joka mahdollistaa kasvin selviämisen alhaisissa lämpötiloissa. Tällöin puhutaan kryoprotektantista. (Fuller 2004, 375.)

Kryoprotektanttia voidaan kuvata lauseella: mikä tahansa lisäaine, joka voidaan antaa solulle ennen jäädyttämistä ja joka antaa korkeamman sulatuksen jälkeisen selviämismahdollisuuden kuin mitä voidaan havaita ilman sen läsnäoloa. Aikaisemmin kryoprotektantteja on kutsuttu kryofylaattisiksi aineiksi (cryophyllatic agents) tai liuosmoderaattoreiksi (solute moderators). Nykyinen nimi on vuodelta 1965. (Fuller 2004, 375.)

TAULUKKO 1. Kryoprotektanttien luokittelu (Tao & Li 1986, 308).

	Läpäisevyys	Esimerkkejä
Ryhmä 1	Läpäisee sekä soluseinän että solukalvon	Glyseroli, DMSO
Ryhmä 2	Läpäisee soluseinän, mutta ei solukalvoa	Oligosakkaridit (sokeri, mannitoli), aminohapot (proliini), polymeerit, joilla pieni molekyylimassa (PEG ₁₀₀₀)
Ryhmä 3	Ei läpäise solukalvoa eikä soluseinää	Polymeerit, joilla suuri molekyylimassa (proteiinit, polysakkaridit, PEG ₆₀₀₀ , PVP)

Kryoprotektantit jaetaan kolmeen ryhmään, jotka on esitetty taulukossa 1. Ryhmän 1 protektantit vähentävät soluseinän ja protoplasman välistä adheesiota. Kun ryhmän 1 protektantti pääsee protoplasmaan, solu täyttyy uudestaan vedellä. Nämä protektantit toimivat pääsääntöisesti protoplastissa suojaten protoplasmaa jäädyttämisen aiheuttamalta kuivumiselta ja vähentävät suolan myrkyllisyyttä. (Tao & Li 1986, 308.)

Ryhmän 2 protektantit aiheuttavat solun plasmolyysin ennen jäädytystä. Kun väliaine ja solu ovat jäätyneet, protektantit ovat konsentroituneet soluseinän ja solukalvon väliin. Nämä protektantit eivät ainoastaan suojele protoplastia jäätyksen aiheuttamalta kuivumiselta, vaan voivat myös toimia puskurikerroksena soluseinän ja protoplastin välillä suojaten solukalvon ulointa kerrosta. Ryhmän 2 kryoprotektantit voivat vähentää mekaanista puristusta, jonka kasvava jää protoplastissa aiheuttaa. (Tao & Li 1986, 308.)

Ryhmän 3 polymeerit, jotka eivät voi läpäistä soluseinää eivätkä solukalvoa, konsentroituvat jääkiteiden eteen kun väliaine ja soluseinä jäätyvät. Nämä polymeerit estävät jään kasvamisen ja muodostavat solunulkopuolisen puskurikerroksen, konsentroitua soluseinän uloimman kerroksen ja jääkiteiden väliseen tilaan. Suurimolekyylimassaiset polymeerit eivät suoja solua jäätyksen jälkeiseltä uudelleen muotoutumiselta eivätkä protoplastia kuivumiselta. (Tao & Li 1986, 308–309.)

Kryoprotektanttien tulee olla myrkyttömiä solulle konsentraatiossa, joka on välttämätön protektantin vaikutukselle (Reed 2008, 25). Kryoprotektanttien myrkyllisyyttä voidaan vähentää käyttämällä yhdistelmiä eri ryhmistä. Jotkin kryoprotektantit ovat myrkyllisiä yksinään kuten PEG₆₀₀₀, mutta sen myrkyllisyys vähenee yhdistettäessä se toiseen kryoprotektanttiin. Muutenkin on suositeltavaa käyttää kryoprotektanttien yhdistelmiä, sillä ne tarjoavat paremman ympäristön kryokestävyydelle. Esimerkiksi Ulrich, Finkle, Moore ja Ginoza käyttivät vuonna 1979 DMSO:ta, glukoosia ja PEG₆₀₀₀:a säilöessään onnistuneesti sokeriruo'on soluja nestetyypen. (Tao & Li 1986, 309.)

5 KRYOSÄILYTYSMENETELMÄT

5.1 Kontrolloitu asteittainen jäädytys

Kontrolloitu asteittainen jäädytys oli ensimmäinen kehitetty kryosäilytysmenetelmä (Reed 2008, 10). Menetelmä on kehitetty 1970-luvulla ja sitä on käytetty sekä *in vitro*- että *in vivo* -materiaaleille. Menetelmä mahdollistaa suurten määrien säilömisen kerralla. Kontrolloidussa asteittaisessa jäädytyksessä muodostuu solunulkopuolista jäätä ja solunsisäinen vesi siirtyy ulkopuolelle. (Nukari, Uosukainen, Rokka, Antonius, Wang & Valkonen 2009, 118.)

Kontrolloitu asteittainen jäädytys aloitetaan yleensä 0 – -4 °C:sta ja pakastettava materiaali jäädytetään kryoprotektantin jäätymispisteeseen. Jäädytysnopeutena on yleisesti käytetty 1 °C/min -30 °C:een asti. Jäädytysnopeus vaihtelee kasvin mukaan ja lopuksi asteittaisesti jäädytetty kasvinosa siirretään nestetyypen. (Reed 2008, 85.)

5.2 Kapselointi-dehydraatiomenetelmä

Kapselointi-dehydraatiomenetelmässä silmuja esikasvatetaan sokerimaljalla, jonka sokerikonsentraatio on korkea (Reed 2008, 60). Tämän jälkeen silmut kapseloidaan alginaattihelmiin, joita kuivatetaan joko laminaarikaapissa ilmavirrassa tai kuivan silikageelin päällä. Tavoitteena on laskea helmien vesipitoisuus 20 %:iin, jolloin helmet voidaan siirtää kryoputkiin ja nestetyyppeen. (Nukari ym. 2009, 119.)

Ensimmäinen kapselointi-dehydraatiomenetelmä on kehitetty 1980-luvulla. Menetelmää on käytetty monille lajeille, lähinnä alkuperältään lauhkean vyöhykkeen kasvilajeille, mutta sitä on käytetty myös trooppista alkuperää oleville kasveille. Menetelmää on sovellettu muun muassa eukalyptukselle (*Eucalyptus* L' Hér.), greipille (*Citrus x paradise* Macfad.) ja porkkanalle (*Daucus carota* L.). (Reed 2008, 59–60.)

5.3 Vitrifikaatiomenetelmät

5.3.1 Alkuperäinen vitrifikaatiomenetelmä

Vitrifikaatiomenetelmässä solut ja meristeemit täytyy kuivata onnistuneesti vitrifikaatioliuoksilla, jotta voidaan välttää kuolettavat vahingot solussa upotettaessa nestetyyppeen (Reed 2008, 35). Vitrifikaatioliuoksista yleisesti käytettyjä ovat glyserolipohjaiset PVS2- ja PVS3-liuokset (Sakai & Engelmann 2007, 152).

Menetelmässä silmuja esikasvatetaan sokerialustalla, jonka jälkeen silmuja käsitellään latausliuoksella, joka sisältää glyserolia ja sokeria. Latausliuoksessa silmuja pidetään 20–30 minuuttia, jonka jälkeen niitä käsitellään vitrifikaatioliuoksella (PVS2 tai PVS3). Vitrifikaatioliuoskäsittelyn pituus vaihtelee suuresti, koska tarkoituksena on kuivata silmut aiheuttamatta niille vahinkoa. Vitri-

fikaatiokäsittelyn jälkeen silmut upotetaan nestetyypeen ja pidetään siellä vähintään yhden tunnin ajan. (Sakai & Engelmann 2007, 153.)

Nestetypestä silmut siirretään vesihauteeseen (lämpötila +40 °C) ja sulatetaan nopeasti. Nopealla sulatuksella estetään mahdollisten vaurioiden syntyminen. Sulatuksen jälkeen silmuja käsitellään sokeriliuoksella, jolloin saadaan soluisa vitrifikaatioliuos korvautumaan sokerilla. Sokerikäsittelyn jälkeen silmut siirretään petrimaljalle. (Sakai & Engelmann 2007, 153.)

Vitrifikaatiomenetelmää on onnistuneesti sovellettu laajalle kasvijoukolla ja sitä on käytetty lähinnä kärkisilmuille. Tällaisia kasveja ovat muun muassa luumu ja puutarhamansikka. (Sakai & Engelmann 2007, 160–161.)

5.3.2 Kapselointi-vitrifikaatiomenetelmä

Vitrifikaatiomenetelmä mahdollistaa jäädyttämisen lyhyessä ajassa, mutta se ei sovellu laajalle määrälle näytteitä ja toisaalta taas kapselointi-dehydraatiomenetelmä vie paljon aikaa. Niinpä julkaistiin kapselointi-vitrifikaatiomenetelmä, joka yhdistelee vitrifikaatiomenetelmää ja kapselointi-dehydraatiomenetelmää. Kapselointi-vitrifikaatiomenetelmä on käyttäjäystävällinen ja sitä on sovellettu laajalle joukolla kasvilajeja, ainakin 22 suvusta. (Sakai & Engelmann 2007, 161–162.)

Kapselointi-dehydraatiomenetelmässä silmuja esikasvatetaan sokerialustalla, jonka jälkeen ne kapseloidaan alginaattihelmiin. Tämän jälkeen helmiä käsitellään latausliuoksella ja vitrifikaatioliuoksella. Vitrifikaatioliuoskäsittelyn jälkeen helmet upotetaan nestetyypeen. Nestetypestä helmet siirretään lämpöhauteeseen ja sulatetaan nopeasti. Tämän jälkeen helmiä käsitellään sokeriliuoksella ja siirretään maljalle. (Sakai & Engelmann 2007, 162.)

Menetelmä on hyvin paljon samankaltainen kuin vitrifikaatiomenetelmä. Aina erona on silmujen kapselointi. Esimerkiksi wasapin [*Wasabia japonica* (Sieb.) Maxim.] kärkisilmujen kryosäilytyksessä on saatu parempi tulos käyt-

tämällä kapselointi-vitrifikaatiomenetelmää kuin käyttämällä kapselointi-dehydraatiomenetelmää. (Sakai & Engelmann 2007,162.)

5.3.3 Pisara-vitrifikaatiomenetelmä

Pisara-vitrifikaatiomenetelmä on uusi tekniikka, jota on sovellettu tähän mennessä vain rajoitetulle määrälle kasvilajeja. Kuitenkin menetelmällä on saatu todella lupaavia tuloksia. (Sakai & Engelmann 2007,162.) Menetelmän ovat kehittäneet Kartha, Leung ja Mroginski jäädyttämällä maniokkia (*Manihot esculenta* Crantz) (Kartha, Leung & Mroginski 1982, 133).

Pisara-vitrifikaatiomenetelmässä silmut esikasvatetaan sokerimaljalla ja käsitellään latausliuoksella niin kuin vitrifikaatiomenetelmässä. Latausliuoskäsitelyn jälkeen, silmuja käsitellään vitrifikaatioliuoksella. Vitrifikaatioliuosta laiteaan pisaroina (5–10 µl) foliopalalle. Näihin pisaroihin laitetaan silmut ja ne upotetaan nestetyyppeen. Silmut voidaan laittaa kryoputkeen ennen nestetyyppeen upottamista tai sen jälkeen. Nestetypestä putket nostetaan lämpöhautteeseen ja sulatetaan silmut nopeasti. Tämän jälkeen silmuja käsitellään sokेरiliuoksella ja siirretään maljalle. (Sakai & Engelmann 2007,162.)

Käsittely eroaa vitrifikaatiomenetelmästä vain sen verran, että silmut sijoitetaan vitrifikaatioliuospisaraan ja folion päälle. Pisara-vitrifikaatiomenetelmää on sovellettu jo useille lajeille, muun muassa puutarhamansikan kärkisilmuille. (Sakai & Engelmann 2007,162–163.)

6 KÄYTETTY MATERIAALI JA MENETELMÄ SEKÄ TYÖN VAIHEET

6.1 Käytetty kasvimateriaali

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada mahdollisimman laaja määrä syreenikantoja pitkäaikaissäilytykseen kryotankkiin. Näin ollen päädyttiin ottamaan tutkitaviksi seitsemän eri kantaa ja kaikista mahdollisuuksien mukaan kaksi eri kasvupistelinjaa. Kaikista kannoista ei ollut saatavilla kahta eri kasvupistelinjaa, joita olisi voitu laittaa pitkäaikaissäilytykseen.

Pitkäaikaissäilytykseen oli tarkoituksena siirtää lajikkeet 'Julia', 'Ainola', 'Holger', 'Katherine Havemeyer' ja 'Andenken an Ludwig Späth' sekä kannat A2 ja A20. Näistä lajikkeista 'Holger', 'Andenken an Ludwig Späth' ja 'Ainola' ovat tuotannossa MTT Laukassa.

Kaksi kasvupistelinjaa löytyi kaikilta muilta kannoilta paitsi 'Katherine Havemeyer' -lajikkeelta ja lisäksi kanta A20 lisääntyi niin huonosti, ettei siitä saatu riittävästi materiaalia kuin yhdestä kasvupistelinjasta. Kasvimateriaali oli jo lisäyksessä mikrolisäyslaboratorion puolella ja sitä alettiin lisätä työn tarpeisiin.

6.2 Modifioitu pisara-vitrifikaatiomenetelmä

MTT Laukaassa on tehty menetelmäkokeiluja ja päädytty valitsemaan käytettäväksi menetelmäksi pisara-vitrifikaatiomenetelmä, joka optimoitiin ensimmäisenä vadelmalle ja mansikalle. Menetelmä on ilmeisesti sovellettavissa laajasti eri kasvullisesti lisättäville kasveille riippumatta niiden kylmäkaraistumiskyvystä. (Nukari, Rantala & Uosukainen 2008, 3.)

Refouvelet, Le Nours, Tallon ja Daguin (1998, 233) ovat kehittäneet syreenille kapselointimenetelmän, jossa silmut kapseloitiin alginaattihelmiin. Tästä huolimatta, päädyttiin käyttämään modifioitua pisara-vitrifikaatiomenetelmää, koska MTT Laukaassa on kehitetty sellainen lajikkeelle 'Julia'. Modifioidulla pisara-vitrifikaatiomenetelmällä päätettiin pitkäaikaissäilyttää mahdollisimman monta kantaa.

Menetelmällä on tehty kokeiluja syreenille 'Julia' jo aiemmin ja tulokset ovat lupaavia. Kokeilussa päädyttiin käyttämään kärkisilmuja, joiden koko on 1–2 mm ja esikäsitteilyalustana 0,50 M sokerialustaa. Näin saatiin yhdessä toistossa versomisprosentiksi 40 %. Koe-erät olivat kuitenkin suhteellisen pieniä. (Nukari, Laamanen & Uosukainen n.d.)

6.3 Työn vaiheet

6.3.1 Esikasvatus

Syreenien silmut otettiin neljän viikon ikäisistä kasveista, joten neljä viikkoa ennen aiottua silmujenottopäivää oli jaettava haluttuja kantoja. Kannat lisättiin lasipurkkeihin, joissa kantena käytettiin foliota. Yhteen purkkiin laitettiin seitsemästä kahdeksaan kappaletta versoja.

Purkkeja tarvittiin määrällisesti paljon, sillä yhdestä lisätystä versosta saatiin yleensä vain yksi silmu. Joissakin tapauksissa verso jakaantui tyvestä ja tällöin saatiin yhdestä versosta useampia silmuja, mutta siltikin maksimissaan kaksi. Syreenien versoissa lehdet ovat pareittain, jolloin yhteen lisättyyn versoon tulee mukaan aina kaksi hankasilmiä (ks. kuvio 11), jotka voivat molemmat versota. Näin ollen versoja piti lisätä vähintään niin paljon kuin haluttiin ottaa silmuja. Lisäksi piti ottaa huomioon kontaminaation mahdollisuus ja se, että materiaalia jää myös uutta lisäämistä varten, eli materiaalia piti lisätä enemmän kuin oli tarve.

Syreeneitä esikasvatettiin fruktoosi- ja glukoosipohjaisilla alustoilla. Glukoosipohjaisella alustalla kasvatettiin lajikkeita 'Julia', 'Holger', 'Katherine Havemeyer' ja 'Andenken an Ludwig Späth' sekä kantoja A2 ja A20. Fruktoosipohjaisella alustalla esikasvatettiin lajiketta 'Ainola'. Aluksi lajike 'Julia' oli sakkaroosipohjaisella alustalla, mutta sitä alettiin lisätä glukoosipohjaiselle alustalle, jossa se menestyi hyvin. Alustojen tiedot löytyvät liitteestä 2.



KUVIO 11. Syreenin verso, nähtävissä lehtien kasvutapa

6.3.2 Silmujen eristäminen

Silmuja eristettiin aiemmin kehitetyn menetelmän perusteella. Menetelmän kehitysvaiheessa oli tehty kokeita niin kärki- kuin hankasilmuillakin. Kärkisilmuista oli käytetty kahta eri kokoa, 1–2 mm ja 2–3 mm. Hankasilmujen koko oli ollut 0,3–1 mm. Tuloksissa suositellaan käytettäväksi kärkisilmuja, sillä ne ovat suurempia kuin hankasilmut ja helpompia käsitellä. Lisäksi kärkisilmut, joiden pituus oli 1–2 mm, antoivat suurimman pakastamisesta selviämisen- ja jatkokasvatusprosentin. (Nukari, ym. n.d.)

Pitkäaikaissäilyttäminen tehtiin kehitetyn menetelmän mukaan, joten versoista eristettiin kärkisilmut (ks. kuvio 12). Eristettyjen silmujen koko vaihteli yhdestä kahteen millimetriin ja ne eristettiin maanantaisin, jolloin pakastuspäiväksi tuli torstai. Silmut eristettiin aina samana viikonpäivänä, jolloin oli helppo aikatauluttaa pakastaminen sekä sulatuksen jälkeiset toimenpi-



KUVIO 12. Kärkisilmu syreenin versossa

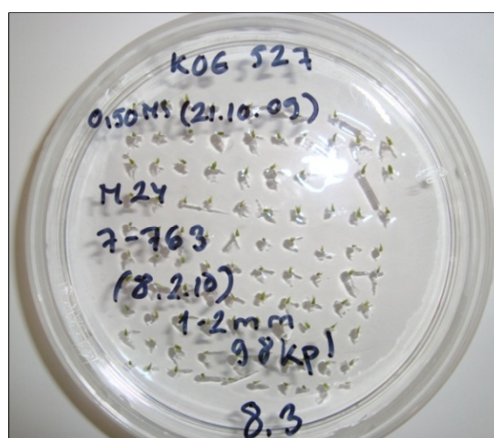
teet. Silmuja eristettiin eri määrät sen mukaan, paljonko materiaalia oli käytettävissä ja kuinka hyvin siitä saatiin silmuja. Eristettyjen silmujen määrät näkyvät liitteestä 4.

6.3.3 Sokerikäsittely

Sokerikäsittelyllä on huomattu olevan vaikutusta silmujen selviämiseen pakastamisesta. Menetelmää kehitettäessä tutkittiin, minkälainen sokerikäsittely parantaa syreenin silmujen elpymismahdollisuuksia pakastamisen jälkeen. Kärkisilmuja esikäsiteltiin korkeasokerisella MS-alustalla (Murashige & Skoog, 1962) joko vaiheittaisesti kasvattaen sokerikonsentraatiota tai laittamalla silmut suoraan sokerialustalle, jonka vahvuus oli 0,25 M, 0,50 M tai 0,75 M. Vaiheittaisessa sokerikäsittelyssä alustojen sokeripitoisuus lähti 0,25 M:sta, mikä jälkeen silmut siirrettiin seuraavana päivänä 0,50 M MS-alustalle ja lopuksi 0,75 M MS-alustalle. (Nukari, ym. n.d.)

Eristettyjen silmujen laittaminen suoraan 0,50 M MS-alustalle antoi parhaat prosentit pakastamisen jälkeiselle selviämiselle ja jatkokasvatukselle. Vaiheittaisessa sokerikonsentraation kasvattamisesta ei huomattu olevan mitään apua kasvin silmujen selviämiselle. Toisaalta taas silmujen laittaminen suoraan 0,75 M MS-alustalle aiheutti silmujen muuttumisen ruskeiksi pakastamisen jälkeen. (Nukari, ym. n.d.)

Tämän perusteella maanantaina eristetyt silmut laitettiin 0,50 M sokerialustalle (ks. kuvio 13) ja annettiin olla siinä torstaihin, jolloin silmut pakastettiin. Silmuja ei siirretty uudelle alustalle missään vaiheessa vaan ne olivat kolme päivää samalla alustalla. Tiedot käytetyistä alustoista löytyvät liitteestä 2.



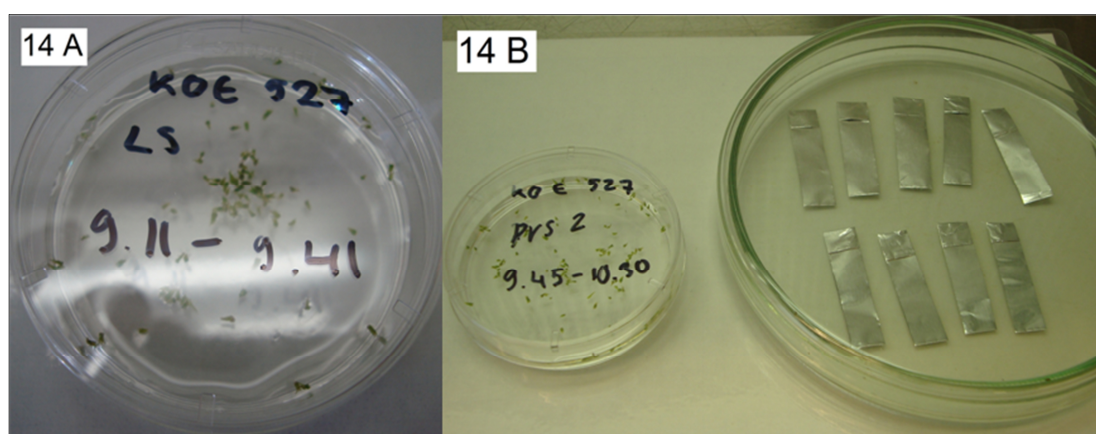
KUVIO 13. 'Katherine Havemeyer'-lajikkeen eristetyt silmut 0,50 M sokerialustalla

6.3.4 Vitrifikaatio

Vitrifikaatio kostui neljästä osasta, latausliuoskäsittelystä, PVS2-liuoskäsittelystä, foliopaloille laitosta sekä foliopalojen kryoputkeen laitosta. Ensimmäisenä oli latausliuoskäsittely. Silmut siirrettiin sokerimaljalta latausliuokseen (LS-liuokseen), jossa silmujen annettiin olla 30 min (ks. kuvio 14 A). Tämän jälkeen silmut siirrettiin suoraan PVS2-liuokseen.

PVS2-liuoksessa silmuja käsiteltiin 45 minuuttia, josta silmut siirrettiin foliopalojen päälle (ks. kuvio 14 B). Silmut asetettiin foliopalalle pisaraan PVS2-liuosta, joka tuli silmun mukana. Kun kaikki silmut olivat foliopalalla, suljettiin foliopala kryoputkeen ja putki nestetyypeen.

Yhteen putkeen laitettiin keskimäärin kymmenen silmua. Koska silmuja saattoi olla käsittelyssä mukana jopa 90 kappaletta, niin tarvittiin yhdeksän putkea. Näistä putkista osa oli –LN-kokeita eli niitä ei upotettu nestetyypeen. –LN-kokeiden putkiin laitettiin 1 M sokeriliuosta ja putki laitettiin pimeään 30 minuutiksi. Sokerikäsittelyn jälkeen silmut siirrettiin jatkokasvatusalustalle ja kasvatushuoneeseen folion alle pimeään.



KUVIO 14. Vitrifikaatiokäsittelyn vaiheet 14 A. Silmut LS-liuoksessa 14 B. Silmut PVS2-liuoksessa ja oikealla malja, jossa on valmiina foliopalat, joille silmut siirretään.

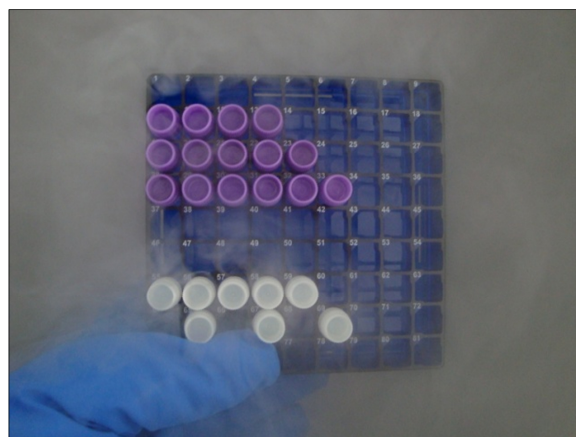
+LN-kokeiden laittaminen nestetyypeen ja –LN-kokeiden sokerikäsittely piti tehdä mahdollisimman nopeasti silmujen foliopalalle laiton jälkeen. Jos putkea

ei olisi upotettu välittömästi nestetyypeen, olisi PVS2-liuos jatkanut toimintaansa ja näin ollen PVS2-aika ei olisi pysynyt samana. Samalla tavalla 1 M sokeriliuos pysäyttää PVS2-liuoksen imeytymisen soluihin. Vitrifikaatioliuosten koostumukset löytyvät liitteestä 3.

6.3.5 Upottaminen nestetyypeen ja varsinainen kryosäilytys

Välittömästi PVS2-liuoskäsittelyn jälkeen silmut siirrettiin nestetyypeen, jossa niitä piti pitää vähintään 60 minuuttia, että voitiin sanoa silmujen täysin jäätyneen.

Mutta yleensä putket laitettiin säilytyslaatikoihin ja laatikot tankkiin (ks. kuvio 15). Osa putkista (violettikorkkiset) jäi pitkäaikaissäilytykseen ja osa (valkokorkkiset



KUVIO 15. Kryoputket säilytyslaatikossa menossa tankkiin.

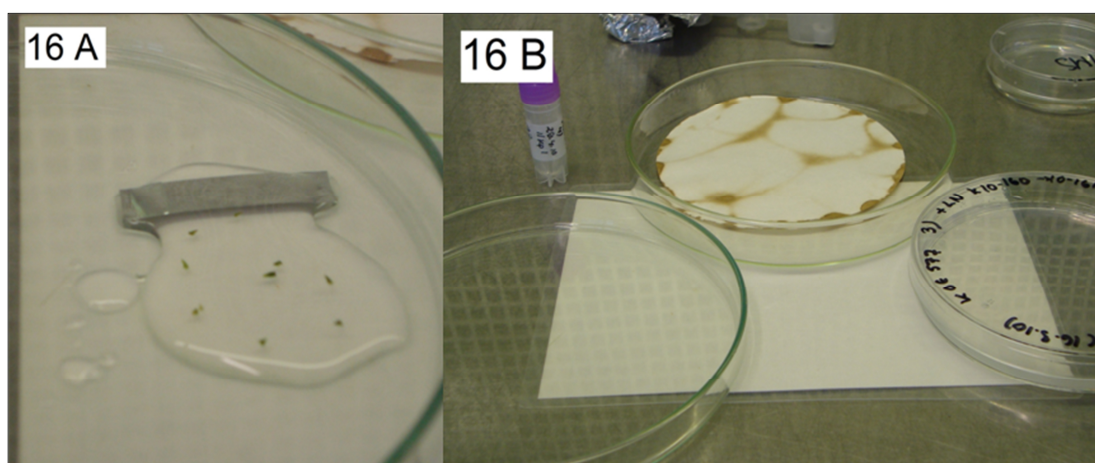
kontrollit) sulatettiin myöhemmin pois sieltä. Pitkäaikaissäilytykseen pyrittiin jättämään ainakin 30 silmua jokaisesta kannasta, mutta todellisuudessa silmuja jätettiin pitkäaikaissäilytykseen 20–30 yhdestä kasvupistelinjasta, jolloin pitkäaikaissäilytykseen saattoi jäädä jopa 60 silmua yhdestä kannasta.

6.3.6 Sulatus

Sulatus tehtiin lämpöhauteessa mahdollisimman nopeasti, ettei sulatuksessa voisi syntyä soluille vahinkoa. Putket siirrettiin suoraan nestetyypestä +40 °C:een lämpöhauteeseen, jossa niitä pidettiin kolme minuuttia. Lämpöhauteesta putket siirrettiin laminaarikaappiin, jossa niihin pipetoitiin 2 ml 1 M sokeriliuosta ja putket laitettiin folion alle pimeään.

Sokeriliuoksen annettiin imeytyä silmun soluihin 30 minuuttia putkissa, jonka jälkeen putken sisältö (sokeriliuos, foliopala ja silmut) kaadettiin tyhjälle petri-

maljalle (ks. kuvio 16 A). Silmut siirrettiin suodatinpaperin kautta jatkokasvatusalustalle (ks. kuvio 16 B), joita oli kaksi erilaista (kasvatusalustat A ja B). Alustat erosivat toisistaan lähinnä BAP:in määrässä ja lisäksi toisessa alustassa oli IBA:a. Alustoiden tarkat koostumukset löytyvät liitteestä 2. Kun silmut oli saatu siirrettyä jatkokasvatusalustoilleen, suljettiin maljat huolella ja kiedottiin folioon.



KUVIO 16. Sulatus 16 A. Silmut, sokeriliuos ja foliopala kaadettuna petrimaljalle kryoputkesta. 16 B. Silmut kaadetaan tyhjälle maljalle, josta ne siirretään suodatinpaperin kautta kasvatusalustalle (muovinen petrimalja).

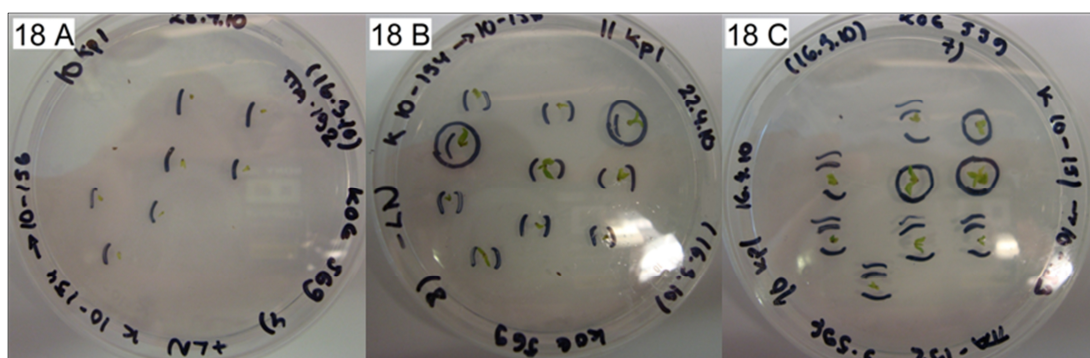
6.3.7 Jatkokasvatus

Sulatuksen jälkeen silmuja pidettiin folion alla keskiviikosta maanantaiaamuun eli noin viisi vuorokautta, jonka jälkeen maljojen päälle laitettiin harso. Harso oli maljojen päällä keskiviikkoiltapäivään eli noin kolme vuorokautta. Tällä tavalla käsiteltäessä silmut eivät olleet suorassa kosketuksessa valon kanssa kokonaiseen viikkoon. Harson poiston jälkeen voitiin alkaa havainnoida silmujen kuntoa. Silmämääräisesti pystyttiin sanomaan silmujen kunnosta jo jotain, mutta tarkempiin tulkintoihin tarvittiin mikroskooppia. Mikroskoopin avulla voitiin sanoa oliko silmuissa elonmerkkejä eli voitiinko silmun sanoa olevan elossa. Silmämääräisesti katsottuna silmu saattoi näyttää kuolleelta, mutta mikroskoopilla katsottaessa saatettiin havaita vihreää. Havainnoinnin yhteydessä maljoilta kirjattiin erikseen eloonjääneet ja versoontuneet.

Silmuja havainnoitiin viikon välein. Ensimmäiset kolme viikkoa silmut olivat samalla maljalla, jolle ne oli sulatuksessa laitettu. Kolmannella havainnointikerralla silmut siirrettiin joko uudelle maljalle tai erlenmeyerpulloon, samalle alustalle kuin millä ne olivat jatkokasvatuksessa olleet. Erlenmeyerpulloihin siirrettiin silmut, jotka olivat versoneet (ks. kuvio 17), niistä oli havaittavissa jo selviä lehtiä. Muut silmut menivät uudelle maljalle. Kuviosta 18 näkyy ensimmäisillä kolmella viikolla havainnoidut maljat.



KUVIO 17. Versonut silmu, havaittavissa neljä lehteä



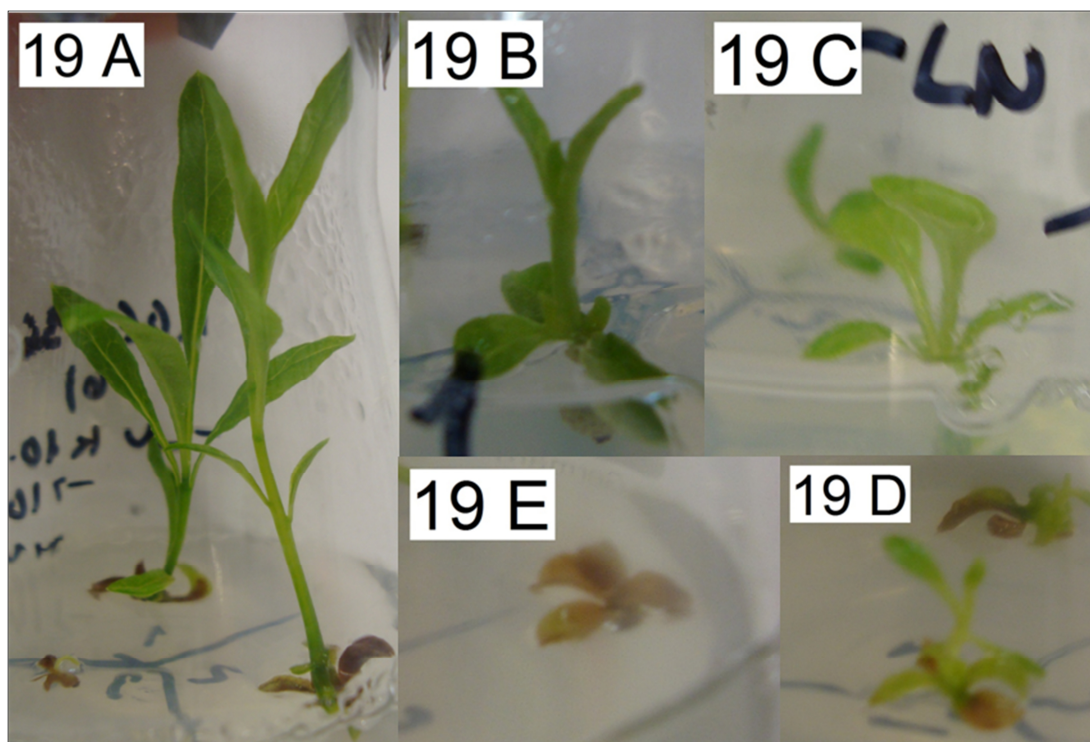
KUVIO 18. Jatkokasvatus maljoilla 18 A. Silmut havainnoitu harson pois oton jälkeen, ensimmäinen havainnointi sulatuksen jälkeen. 18 B. Silmut havainnoitu toisen kerran, kaksi viikkoa sulatuksen jälkeen. 18 C. Kolmas havainnointi sulatuksen jälkeen.

Useimmilla muilla kasvilajeilla siirtorytmi oli neljä viikkoa, mutta syreeneitä siirrettiin ensimmäisen kerran jo kolmannella viikolla. Muutama ensimmäinen malja siirrettiin neljän viikon ikäisenä ja tänä viimeisenä viikkona osa silmuista oli kuollut. Tästä johtuen muut maljat siirrettiin ensimmäisen kerran jo kolmen viikon ikäisinä.

Kerran uudelle alustalle siirretyt silmut havainnoitiin kahden viikon välein niin erlenmeyerpulloissa kuin maljoillakin ja maljojen siirrot tehtiin neljän viikon välein. Erlenmeyerpulloissa olevia versoja ei siirretty uuteen erlenmeyerpulloon lainkaan vaan niitä havainnoitiin yleensä kuuden viikon ajan.

Erlenmeyerpulloissa olevat versot luokiteltiin neljään luokkaan. Luokkaan I (ks. kuvio 19 A) luokiteltiin versot, jotka olivat kasvaneet hyvin ja olivat väriltään hyviä. Luokan I verso oli jaettavissa ainakin kahteen osaan ja näin se voi lisääntyä. Luokkaan II (ks. kuvio 19 B ja C) luokiteltiin versot, jotka olivat läheneet hyvin kasvuun, mutta olivat kuitenkin vielä niin pieniä, ettei niitä voitu jakaa. Näiden kahden luokan versot olisivat olleet menossa jatkokasvatukseen, jos niille olisi tehty jakoja ja uusiin erlenmeyerpulloihin siirtoja. Luokan III ja IV versot eivät olisi menneet jatkokasvatukseen.

Luokan III (ks. kuvio 19 D) verso ei ollut lähtenyt kasvamaan tai siinä oli havaittavissa vain hidasta kasvua. Luokan III verson kuoleminen oli hyvin mahdollista seuraavien viikkojen aikana. Luokan IV (ks. kuvio 19 E) versoksi luokiteltiin verso, joka oli jo kuollut tai siinä oli vain heikosti eloa. Heikosti eloa oli esimerkiksi silloin, kun yksi lehti oli vihreä, mutta muut olivat kuolleet.



KUVIO 19. Erlenmeyerpullojen havainnointi 19 A. Luokan I versot 19 B. Luokan II verso 19 C. Luokan II verso, vasta aloittanut kasvamisen 19 D. Luokan III verso 19 E. Luokan IV verso

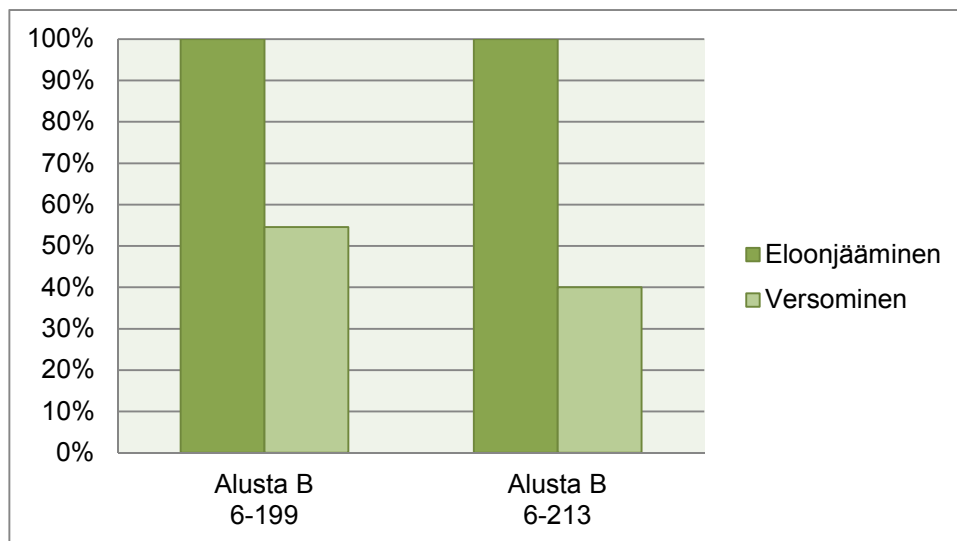
Maljoilla jatkokasvatuksessa oli havaittavissa ongelmia, sillä uudelle maljalle siirron jälkeen lähes kaikki silmut kuolivat. Osa silmuista selvisi hengissä ensimmäiset kaksi viikkoa, mutta tämän jälkeen kuoli. Niinpä oli turhaa siirtää kertaalleen kuolleita silmuja uudelle alustalle neljän viikon jälkeen, koska ne eivät kuitenkaan voisi enää alkaa kasvaa.

7 MODIFIOIDUN PISARA-VITRIFIKAATIOMENETELMÄN TULOKSET

7.1 Tulokset syreenikannoitta

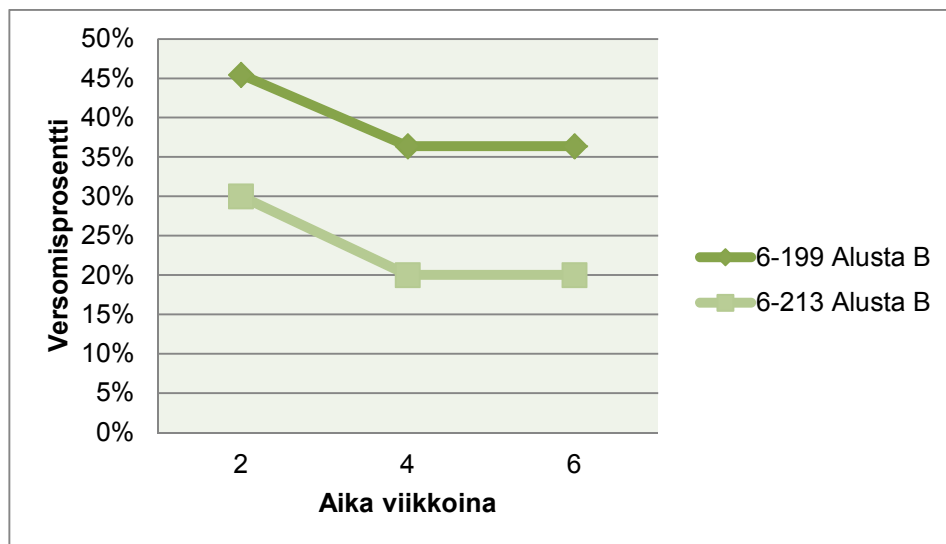
7.1.1 Lajike 'Holger'

Lajikkeesta 'Holger' silmuja eristettiin yhteensä 118 kappaletta. Näistä silmuista 65 oli kontrolleja, jotka sulatettiin pois. Muut jäivät pitkäaikaissäilytykseen. Kaikki sulatetut silmut menivät jatkokasvatukseen alustalle B ja näistä 21 silmuja meni –LN-kokeisiin. Tarkempi silmujen jakautuminen eri kokeisiin käy ilmi liitteestä 4. –LN-kokeiden silmujen elossäilymisprosentit olivat kummallakin kasvupistelinjalla 100,0 %, mutta versomisprosentit maljalla olivat alhaisemmat. Kuviosta 20 käyvät ilmi –LN-kokeiden eloonjäämis- ja versomisprosentit maljalla.



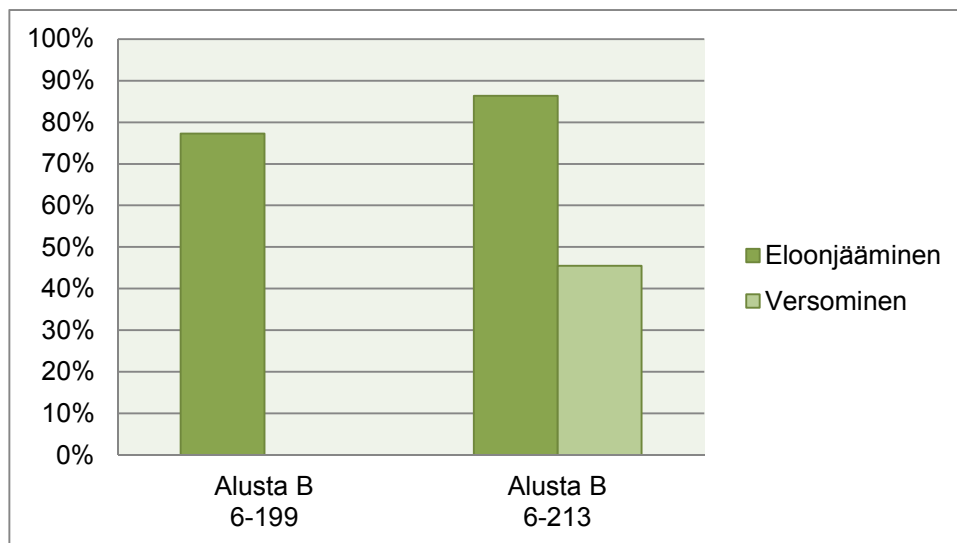
KUVIO 20. Lajikkeen 'Holger' silmujen eloonjääminen ja versominen –LN-kokeissa maljalla kasvupistelinjoittain (6-199 ja 6-213).

Erlenmeyerpullossa versoontuneiden silmujen versomisprosentit kuitenkin laskivat kahden ensimmäisen viikon jälkeen tarkkailtaessa –LN-kokeita. Kuvio 21 näkyy versomisprosenttien kehittyminen tarkkailuvälillä.



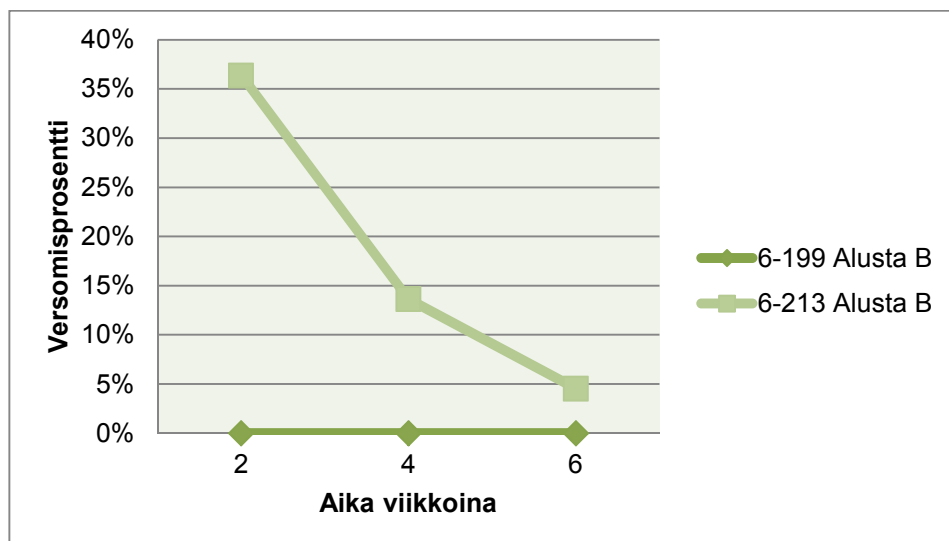
KUVIO 21. Lajikkeen 'Holger' (–LN-kokeiden) silmujen versomisen kehittyminen erlenmeyerpulloissa kasvupistelinjoittain.

+LN-kokeiden eloonjäämisprosentit olivat suhteellisen suuria (77,3 % ja 86,4 %), jolloin olisi voinut arvella myös versoontumisen olevan hyvää, mutta näin ei käynyt. Toinen kasvupistelinja ei lähtenyt versoontumaan lainkaan ja toisen versoontumisprosentiksi saatiin 45,5 % (ks. kuvio 22).



KUVIO 22. Lajikkeen 'Holger' +LN-kokeiden silmujen eloonjääminen ja versominen maljalla kasvupistelinjoittain.

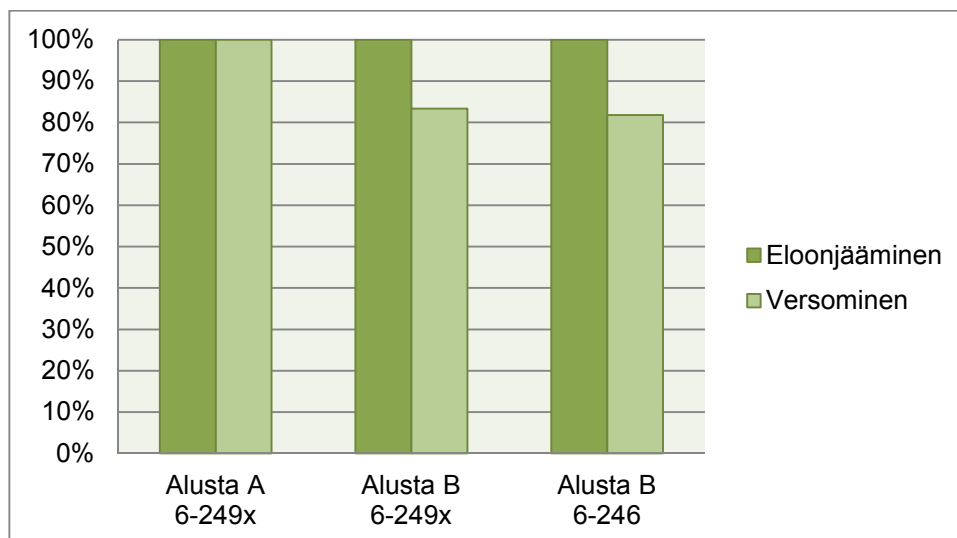
Erlenmeyerpulloihin siirretyt versoontuneet silmut eivät kasvaneet kunnolla ja niinpä versomisprosentti laski, sitä enemmän mitä kauemmin versot olivat pullossa (ks. kuvio 23). Kuten kuvio 23 näkyy, kuudennella viikolla havainnoiduista versoista lähes kaikki olivat kuolleet tai niin huonoja, ettei niitä olisi voitu siirtää enää jatkokasvatukseen. Ainoastaan yksi verso voitiin luokitella luokkaan I tai II.



KUVIO 23. Lajikkeen 'Holger' (+LN-kokeiden) versoneiden silmujen versomisen kehittyminen erlenmeyerpulloissa kasvupistelinjoittain.

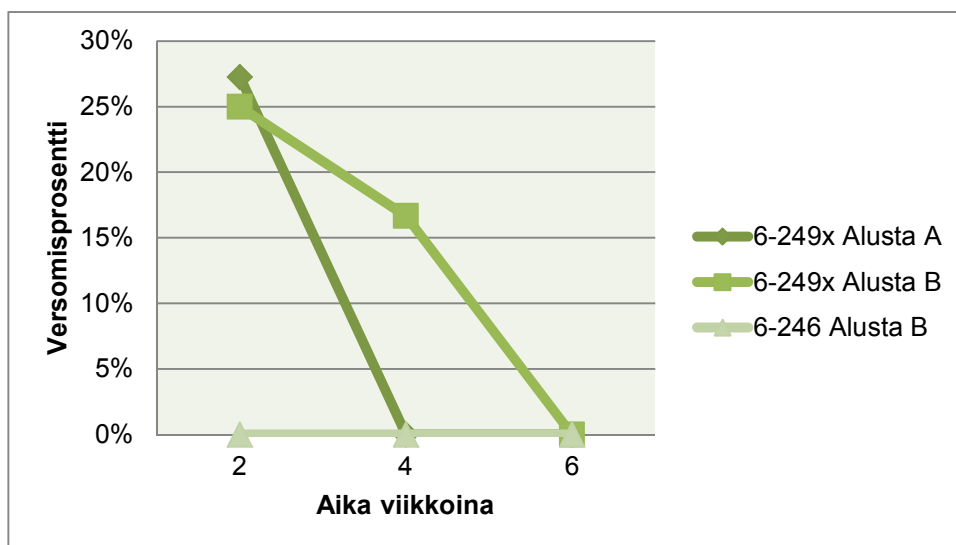
7.1.2 Lajike 'Andenken an Ludwig Späth'

'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeesta otettiin silmuja yhteensä 169 kappaletta, joista kontroleihin käytettiin 109. Kontrollien silmuista 34 oli -LN-kokeiden silmuja. Tarkemmat tiedot eristettyjen silmujen määristä ja jakautumisesta eri alustoille löytyvät liitteestä 4. Silmujen eloonjäämisprosentit ja versomisprosentit käyvät ilmi kuviosta 24, josta huomataan, että alustalla A versominen oli hieman parempaa kuin alustalla B.



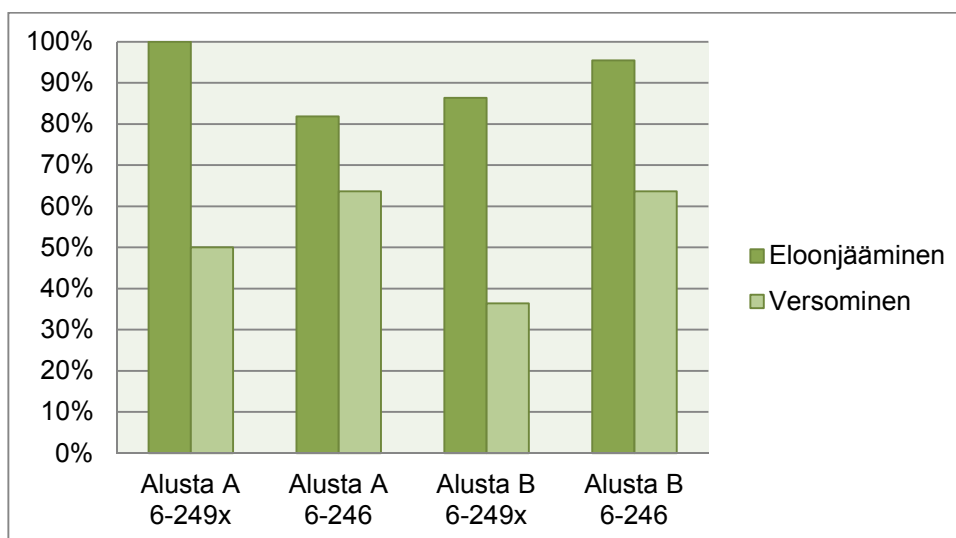
KUVIO 24. 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen eloonjääminen ja versominen maljalla prosentteina -LN-kokeissa kasvupistelinjoittain ja jatkokasvatusalustoittain (6-249x ja 6-246).

Versominen maljalla oli onnistunut, mutta siltikään versominen ei jatkunut samalla tavalla erlenmeyerpulloissa. Kuviosta 25 huomataan, että toinen kasvupistelinjoista alustalla B ei jatkanut versomista lainkaan erlenmeyerpulloissa. Muut jatkoivat kasvua, mutta kahden viikon havainnoinnin jälkeen tapahtui suuria muutoksia alaspäin versomisprosentteissa.



KUVIO 25. –LN-kokeiden versomisen muutokset kasvupistelinjoittain erlenmeyerpulloissa havainnointiaikana lajikkeelle 'Andenken an Ludwig Späth'.

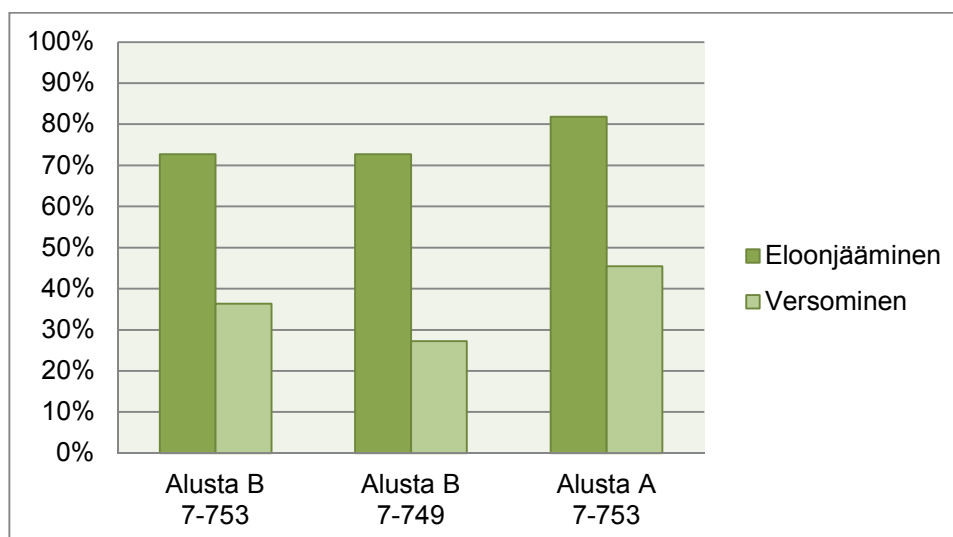
Eloonjäämisprosentit +LN-kokeiden kohdalla olivat hyviä ja versoontuminen maljalla oli keskinäistä. Alhaisin versoontumisprosentti oli 36,4 % ja korkein 63,3 %. Kuviossa 26 käy ilmi lajikkeen 'Andenken an Ludwig Späth' +LN-kokeiden silmujen elossa selviäminen ja versominen nestetyypen jälkeen. Vaikka versoontumisprosentit olivat kaikki yli 30 %, ei ainutkaan silmu jatkanut kasvuaan erlenmeyerpulloissa niin, että se olisi voitu luokitella luokkaan I tai II. Näin ollen versoontumisprosentti erlenmeyerpulloissa jäi molemmilla kasvupistelinjoilla molemmissa jatkokasvatusalustoissa 0 %:tiin.



KUVIO 26. Lajikkeen 'Andenken an Ludwig Späth' silmujen elossa selviäminen ja versominen maljalla +LN-kokeissa alustoittain ja kasvupistelinjoittain.

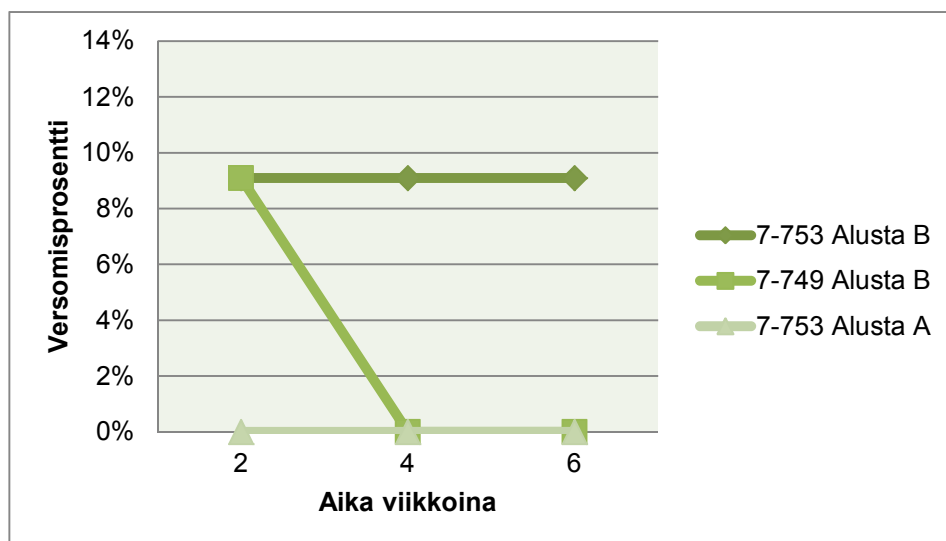
7.1.3 Kanta A2

Kannasta A2 silmuja eristettiin yhteensä 139 kappaletta, joista 33 kappaletta käytettiin –LN-kokeisiin ja kokonaisuudessaan 89 käytettiin kontrolleihin. –LN-kokeiden silmuista kolmasosa laitettiin jatkokasvatuksessa alustalle A, jolloin saatiin elossaselviämisprosentiksi hieman parempi kuin alustalla B, mutta siltikin eloonjäämisprosentti jäi hieman alhaiseksi (ks. kuvio 27). Myös versomisprosentit maljalla jäivät alhaisiksi (suurin 45,5 %). Alustalla A oli havaittavissa paras versomisprosentti (ks. kuvio 27).



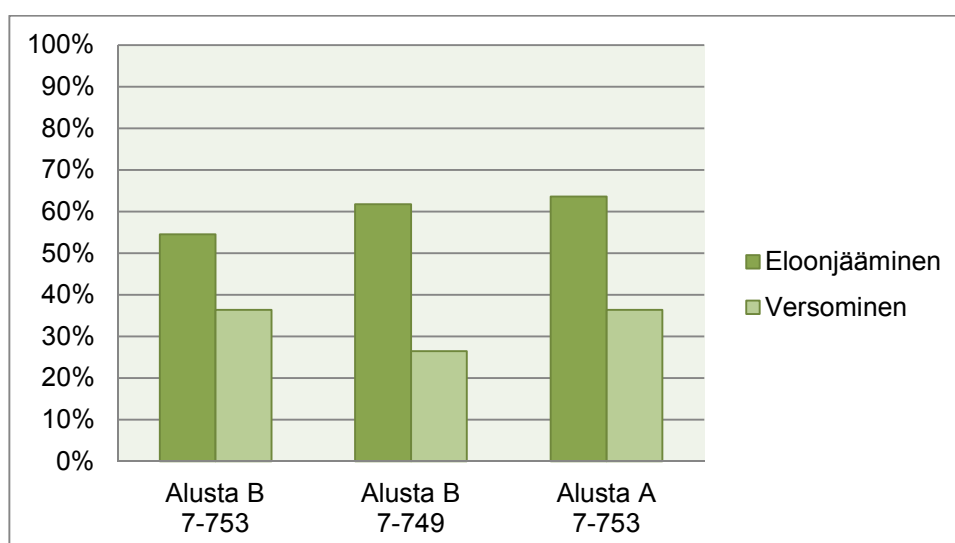
KUVIO 27. Silmujen eloonjääminen ja versominen prosentteina maljalla –LN-kokeissa kasvupistelinjoittain (7-753 ja 7-749) ja alustoittain kannalla A2.

Versominen maljalla jäi alhaiseksi ja niin tapahtui myös erlenmeyerpullossa. Alustalla A silmut eivät jatkaneet versomista lainkaan erlenmeyerpullossa vaikka maljalla tulokset olivat parempia kuin alustan B. Myöskään alustalla B versominen erlenmeyerpulloissa ei onnistunut hyvin, ainoastaan muutama versoi, eivätkä nämäkään jaksaneet kovin kauaa. Silmujen versomisen kehittyminen on huomattavissa kuvioista 28.



KUVIO 28. Kannan A2 silmujen versomisen kehittyminen erlenmeyerpulloissa prosentteina (–LN-koe).

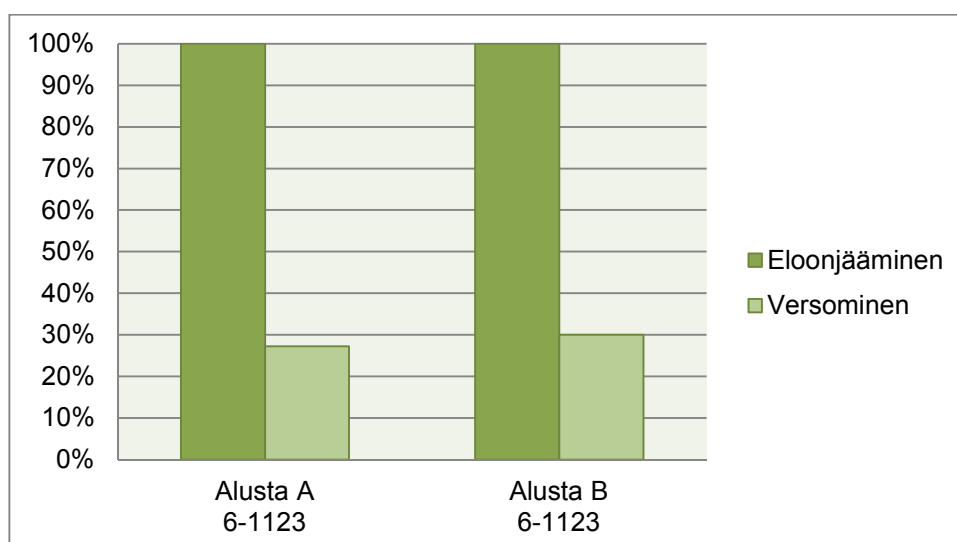
+LN-kokeissa elossaselviämispromsentit olivat noin 10–20 prosenttiyksikköä alhaisempia kuin –LN-kokeissa ja versomisprosentit maljalla suurin piirtein samaa luokkaa –LN-kokeiden kanssa, kuitenkin niin, että +LN-kokeiden versomisprosentit olivat alhaisempia (ks. kuvio 29). Mutta versomisen jatkuminen erlenmeyerpulloissa oli huomattavasti huonompaa, sillä ainutkaan erlenmeyerpulloon siirretty silmu ei jatkanut versomista niin, että se olisi voitu luokitella luokkaan I tai II.



KUVIO 29. +LN-kokeiden eloonjääminen ja versominen prosentteina maljalla kannalle A2.

7.1.4 Kanta A20

Kannasta A20 eristettiin silmuja vain yhdestä kasvupistelinjasta ja niiden kokonaisuus oli 81 kappaletta. Näistä silmuista 51 käytettiin kontrolleihin. Tarkemmat tiedot jakautumisesta eri alustoihin ja eri kokeisiin löytyvät liitteestä 4. Kaikki –LN-kokeiden silmut selvisivät elossa vitrifikaatiokäsittelystä. Versomisprosentit jäivät kuitenkin alhaisiksi kummallakin kasvatusalustalla (ks. kuvio 30).



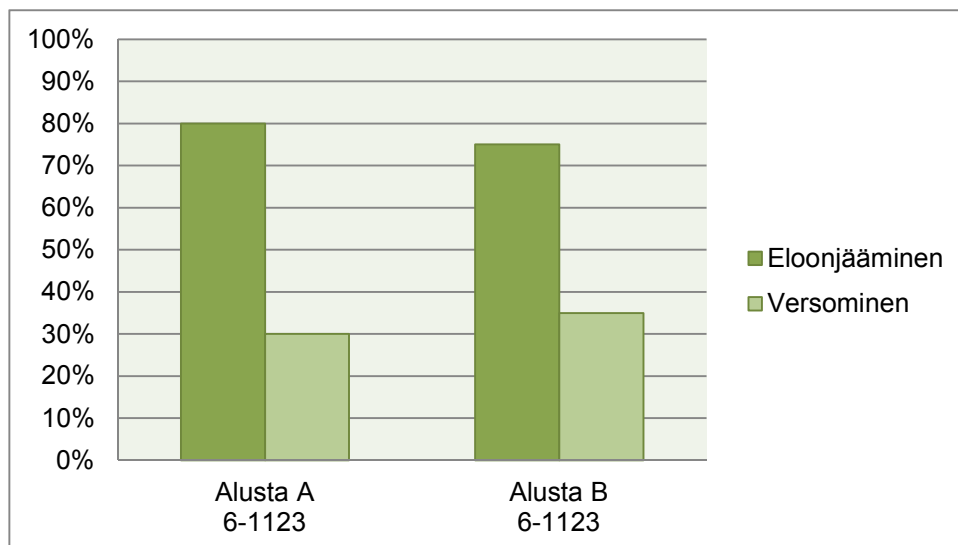
KUVIO 30. Kannan A20 eloonjääminen ja versominen maljalla prosentteina (-LN-koe).

Versomisen jatkuminen erlenmeyerpulloissa –LN-kokeissa ei myöskään onnistunut. Alustalla A olevat silmut eivät jatkaneet lainkaan versomista ja alustalla B versominen jatkui ensimmäiset kaksi viikkoa. Tämän jälkeen versominen lakkasi ja osa versoista kuoli (ks. kuvio 31).

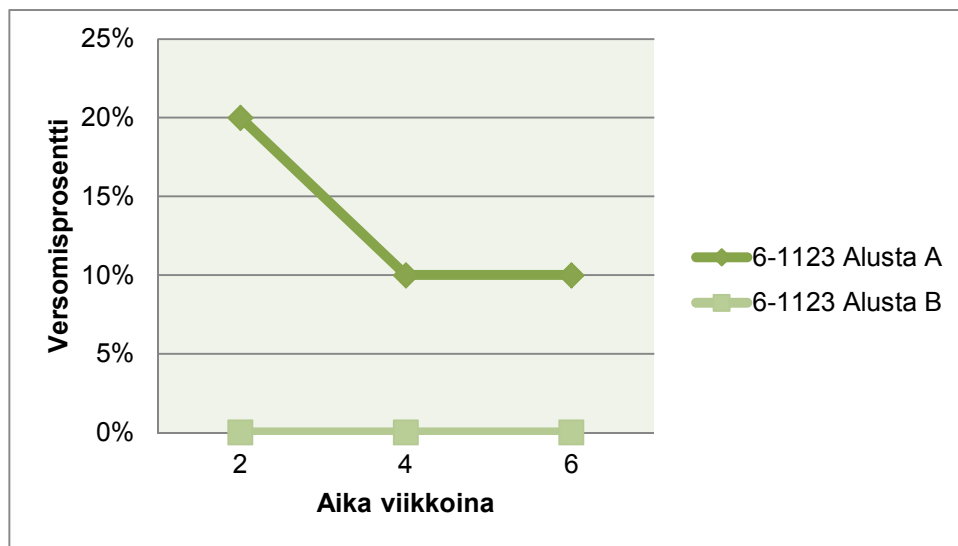


KUVIO 31. -LN-kokeiden versomisen jatkuminen erlenmeyerpulloissa havainnointivälillä kannalle A20.

Eloonjäämisprosentit laskivat 80,0 %:iin ja 75,0 %:iin upotettaessa silmut nestetyypeen. Tästä huolimatta versomisprosentit maljalla hieman kasvoivat verrattuna -LN-kokeisiin (ks. kuvio 32). Kuitenkin versominen erlenmeyerpulloissa oli huonoa ja jatkokasvatusalustalla B saatiin versomisprosentiksi 0 %. Alustalla A versominen oli parempaa kuin alustalla B ja lisäksi osa silmuista jaksoi jatkaa versomista toisin kuin -LN-kokeissa (ks. kuvio 33).



KUVIO 32. Kannan A20 silmujen eloonjääminen ja versominen maljalla prosentteina +LN-kokeissa.

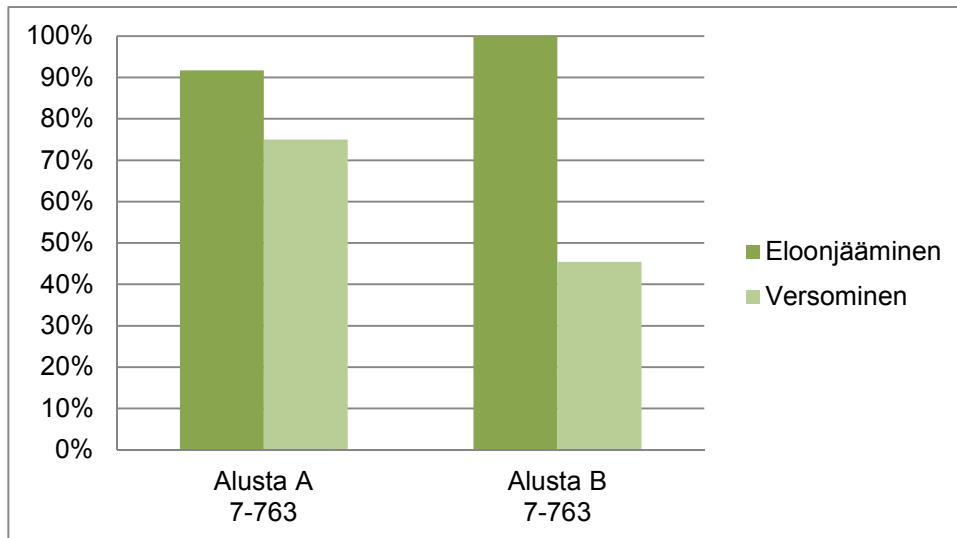


KUVIO 33. +LN-kokeiden silmujen versomisen jatkuminen erlenmeyerpulloissa havainnointivälillä kannalle A20.

7.1.5 Lajike 'Katherine Havemeyer'

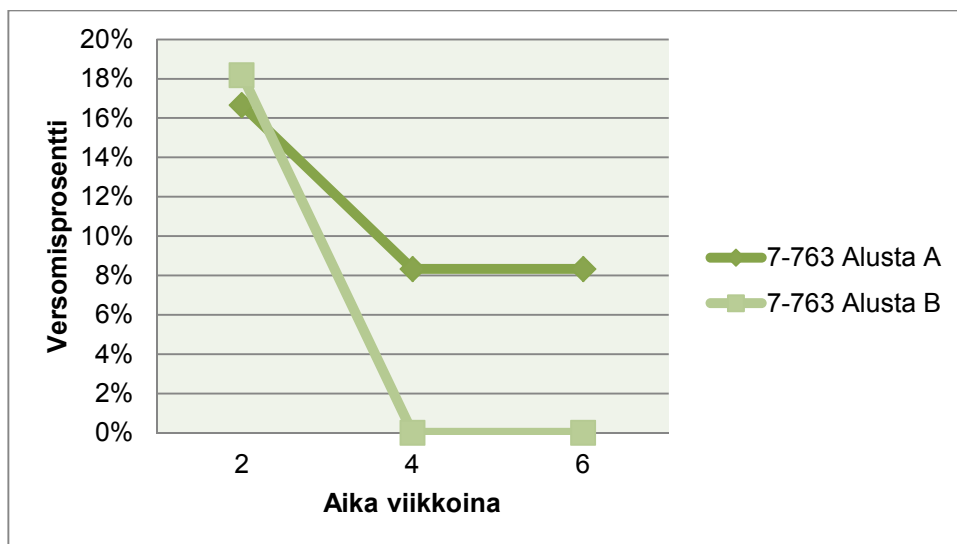
'Katherine Havemeyer' -lajikkeesta otettiin silmuja vain yhdestä kasvupistelinjasta yhteensä 140 kappaletta. Näistä silmuista 32 meni pitkäaikaissäilytykseen tankkiin ja muut silmut käytettiin +LN- ja -LN-kontrolleihin. Silmujen jatkuminen alustoille ja eri kokeisiin käy ilmi liitteestä 4.

-LN-kokeissa oli havaittavissa hieman parempi elossaselviämisprosentti alustalla B kuin alustalla A (ks. kuvio 34). Toisaalta versominen maljalla oli parempaa alustalla A. Alustalla A versomisprosentti oli suhteellisen suuri (75,0 %), mutta alustalla B prosentti jäi alhaiseksi.



KUVIO 34. 'Katherine Havemeyer' -lajikkeen silmujen selviäminen ja versominen maljalla –LN-kokeissa alustoittain.

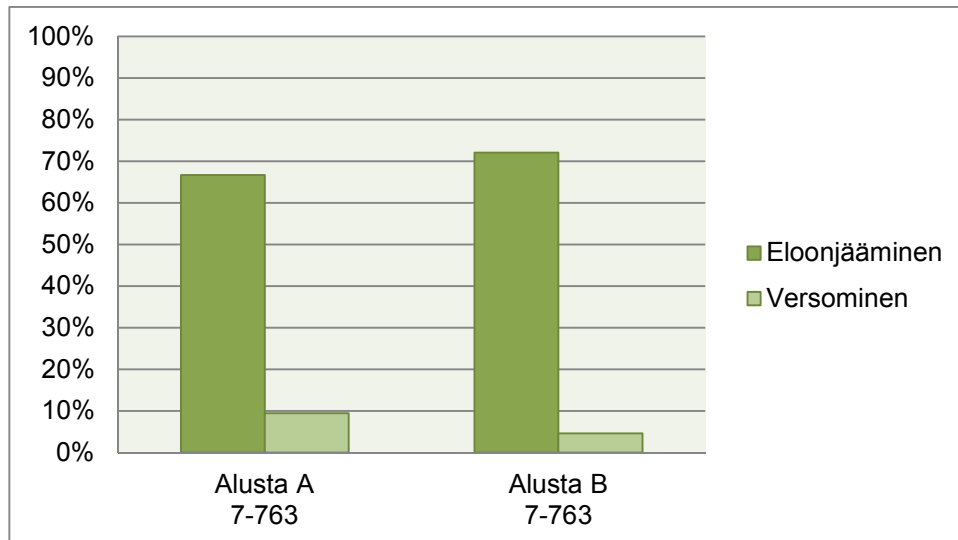
Maljalla versoontuminen oli onnistunut hyvin alustalla A, mutta silti se ei jatkunut erlenmeyerpulloissa. Versot eivät jatkaneet kasvuaan vaan menivät huonompaan suuntaan, jolloin versomisprosentti laski (ks. kuvio 35). Alustalla B tilanne oli vielä huonompi, eivätkä versot selvinneet kuin kaksi ensimmäistä viikkoa hyväkuntoisina.



KUVIO 35. Versoontumisen kehittyminen erlenmeyerpulloissa lajikkeelle 'Katherine Havemeyer' (–LN-koe).

Lajikkeen 'Katherine Havemeyer' silmut selvisivät keskimukaisesti pakastamisesta. Elossaselviämisprosentit ovat 70 %:n molemmilla puolilla (ks. kuvio

36). Versominen maljalla oli todella heikkoa sillä prosentit jäivät alle 10 %:iin kummallakin alustalla, mutta yhtäläisyyttä oli havaittavissa –LN-kokeiden kanssa siinä mielessä, että alustan A versomisprosentti on korkeampi kuin alustan B.



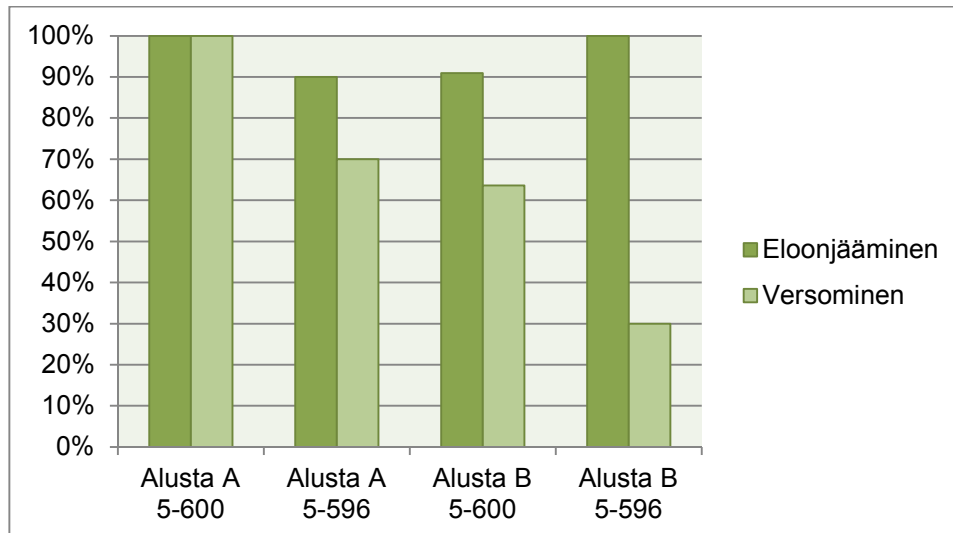
KUVIO 36. +LN-kokeiden silmujen eloonjääminen ja versominen maljalla alustoittain prosentteina lajikkeelle 'Katherine Havemeyer'.

Versominen erlenmeyerpulloissa oli huonoa. Alustalla B maljalla versoneet silmut eivät jatkaneet versomista erlenmeyerpullossa vaan tuloksena oli versomisprosentti 0 %. Alustalla A alku oli hieman parempi (versomisprosentti 2,4 %), mutta ei sekään hyvä ja kahden viikon jälkeen silmut menivät huonompaan suuntaan, jolloin viikolla neljä tehty havainnointi antoi versomisprosentiksi 0 %.

7.1.6 Lajike 'Julia'

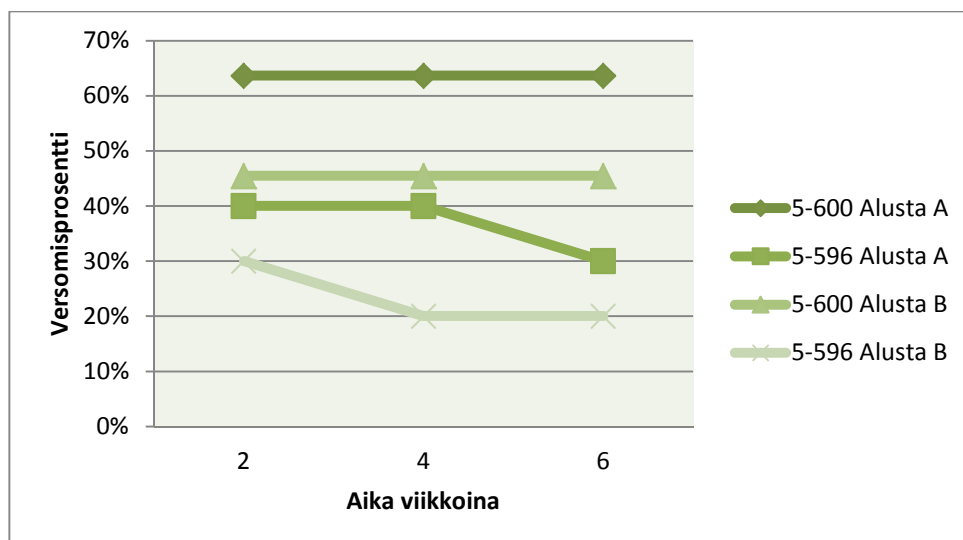
Lajikkeen 'Julia' tulokset olivat lupaavia. Silmuja eristettiin yhteensä 164 kappaletta kahdesta eri kasvupistelinjasta. Eristetyistä silmuista 106 käytettiin kontroleihin ja muut menivät pitkäaikaissäilytykseen. Kontrollien silmujen jakautuminen ilmenee liitteestä 4. –LN-kokeiden tulokset ovat eloonjäämisprosenttiltaan hyviä eivätkä versomisprosenttitkaan maljalla ole huonoja lukuun ottamatta kasvupistelinjaa 5-596 alustalla B, joka jäi vain 30,0 %:iin. Kuviossa

37 on havainnollistettu eloonjääminen ja versominen maljalla –LN-kokeiden osalta.



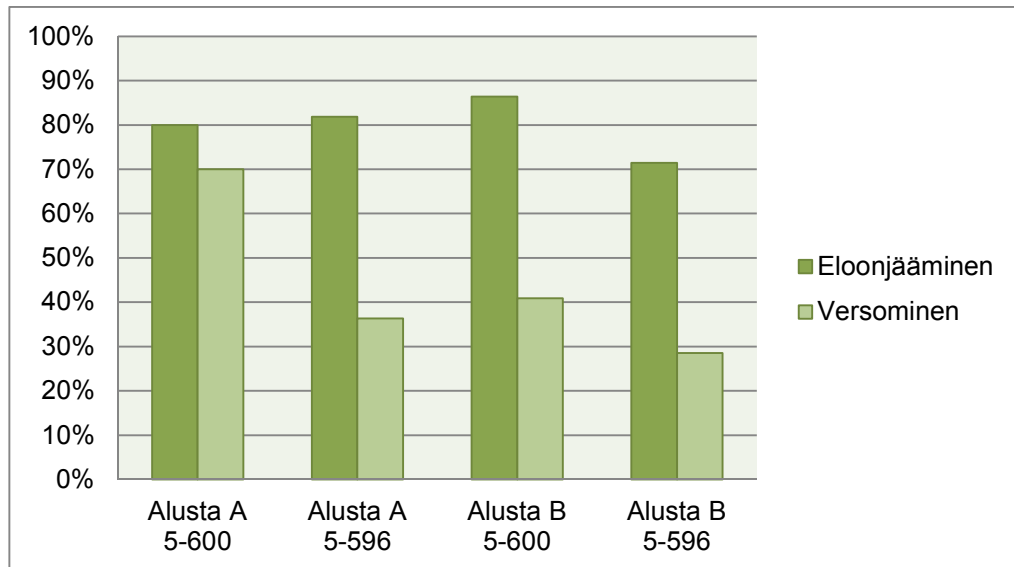
KUVIO 37. Lajikkeen 'Julia' silmujen eloonjääminen ja versominen maljalla kasvupistelinjoittain (5-596 ja 5-600) ja alustoittain prosentteina –LN-kokeissa.

Versoneiden silmujen versominen jatkui hyvin myös erlenmeyerpulloissa eikä suuria pudotuksia prosenteissa tapahtunut. Versomisesta on huomattavissa myös se, että kasvupistelinja 5-600 versoo paremmin kuin 5-596 ja alustoista A on parempi. Alustoiden kannalta katsottuna myös kasvupistelinja 5-596 kasvaa paremmin alustalla A (ks. kuvio 38).



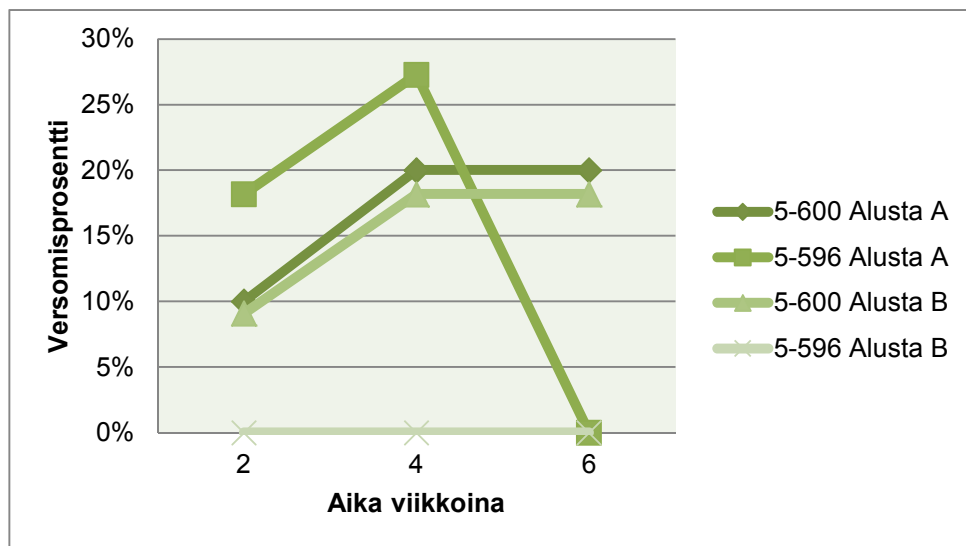
KUVIO 38. Versoneiden silmujen versomisen kehittyminen lajikkeella 'Julia' erlenmeyerpulloissa +LN-kokeissa kasvupistelinjoittain ja alustoittain.

+LN-kokeissa eloonjäämisprosentit ovat hyviä, huonoin on kasvupistelinjalla 5-596 alustalla B vain 71,4 %. Versomisprosentit taasen ovat samalla lailla jakautuneet kuin -LN-kokeissa eli pienin on kasvupistelinjalla 5-596 alustalla B. Kuviosta 39 käy ilmi +LN-kokeiden eloonjääminen ja versominen.



KUVIO 39. +LN-kokeiden silmujen eloonjääminen ja versominen maljalla kasvupisteittäin ja alustoittain lajikkeella 'Julia'.

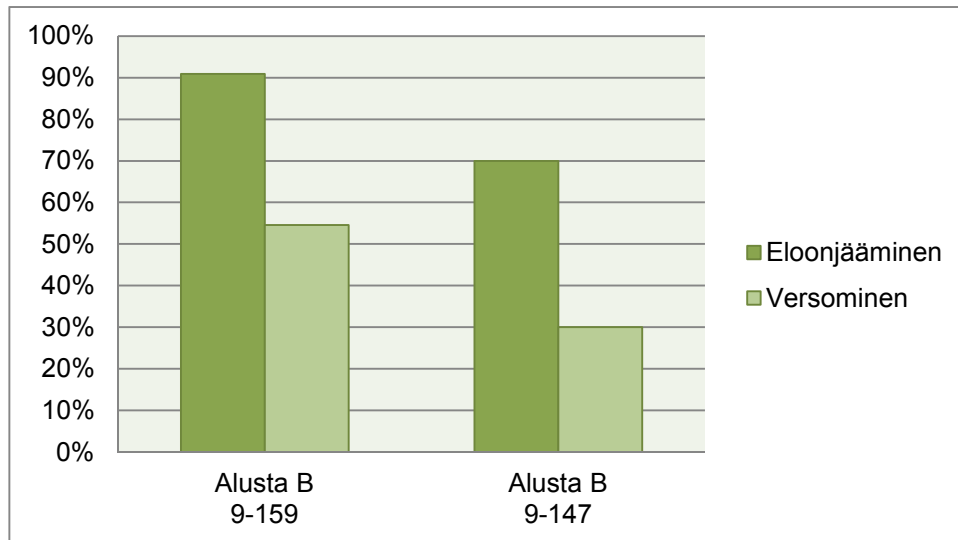
Versoneiden silmujen versomisen kehittämisessä on huomattavissa selvä ero kasvupistelinjojen välillä. Alustojen välillä ei ollut havaittavissa oikeastaan minkäänlaista eroa kasvupistelinjalla 5-600 (ks. kuvio 40). Kasvupistelinja 5-596 ei jatkanut versomista lainkaan alustalla B ja alustalla A on huomattavissa suuri pudotus neljän viikon jälkeen.



KUVIO 40. Versoneiden silmujen versomisen jatkuminen erlenmeyerpulloissa lajikkeella 'Julia' (+LN-koe).

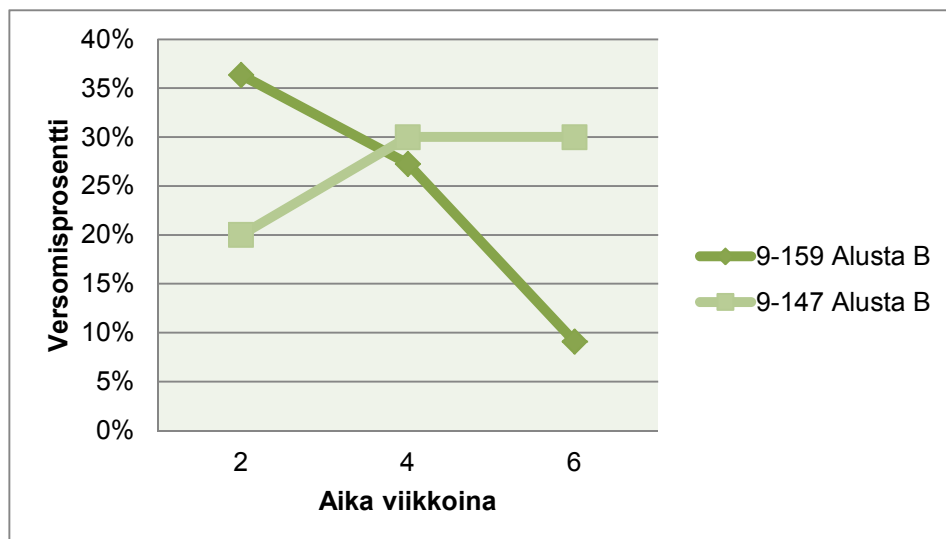
7.1.7 Lajike 'Ainola'

Lajikkeesta 'Ainola' eristettiin yhteensä 138 silmua kahdesta eri kasvupistelinjasta. Näistä silmuista 74 käytettiin kontroleihin. Kontrollisilmuista 21 käytettiin -LN-kokeisiin, joiden eloonjäämisprosentteissa oli noin 20 prosenttiyksikön ero kasvupistelinjojen välillä. 'Ainolan' jatkokasvatusalustana käytettiin ainoastaan alustaa B (tarkemmat tiedot jakautumisesta liitteessä 4). Versomisprosentteissa oli samanlainen ero kuin eloonjäämisprosentteissa (ks. kuvio 41).



KUVIO 41. 'Ainolan' silmujen eloonjääminen ja versominen maljalla kasvupistelinjoittain (9-147 ja 9-159) –LN-kokeissa.

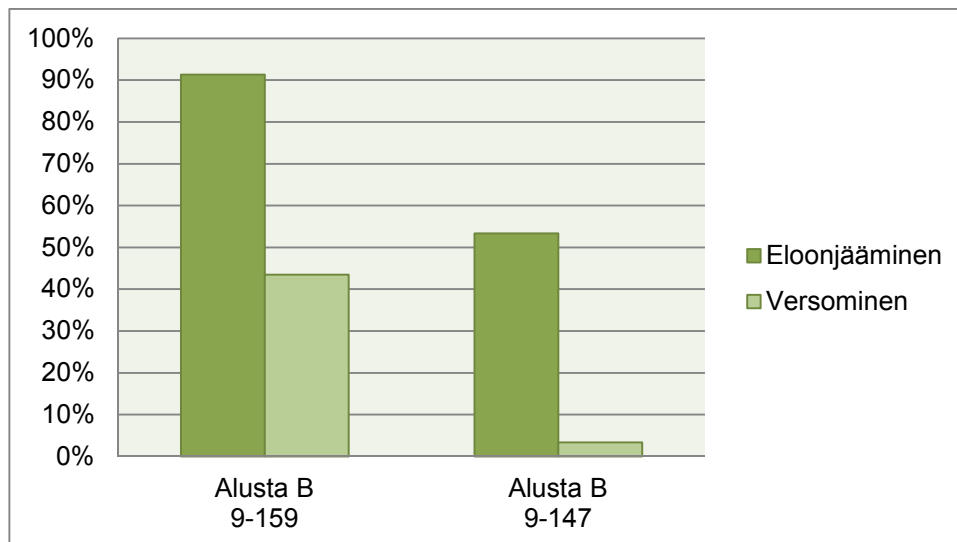
Silmujen versominen erlenmeyerpulloissa erosi suuresti kasvupistelinjojen välillä (ks. kuvio 42). Kuten kuvio 42 huomataan, kasvupistelinjan 9-159 versominen parani viikkojen kuluessa eteenpäin, mutta kasvupistelinjan 9-147 versomisprosentti laski jyrkästi.



KUVIO 42. Versoneiden silmujen versomisen kehittyminen –LN-kokeissa lajikkeella 'Ainola'.

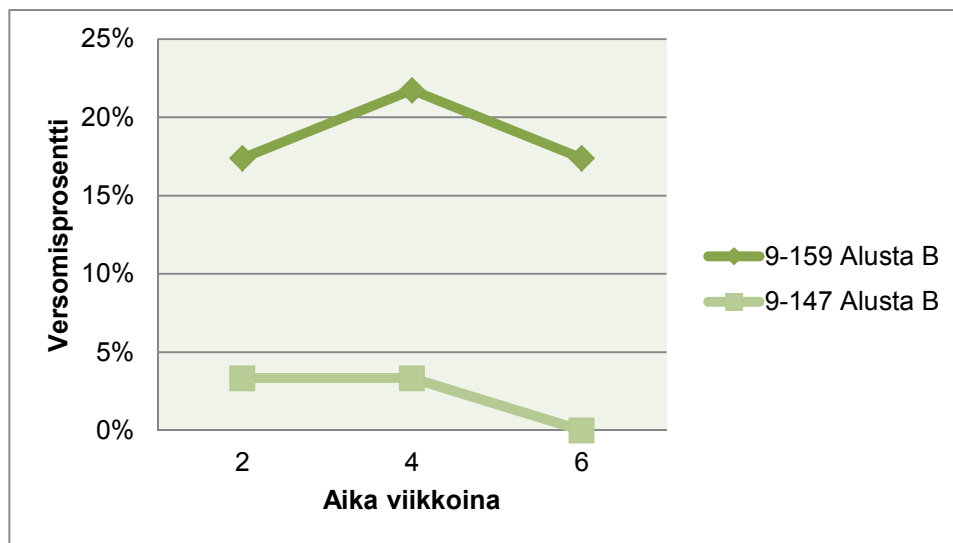
+LN-kokeissa kasvupistelinja 9-147 selvisi huonosti elossa pakastamisesta eikä lähtenyt versomaan oikeastaan ollenkaan. Tämä johtuu osittain siitä, että yhden erän kohdalla sattui sulatuksessa virhe, silmut olivat sokeriliuoksessa

vain 6 minuuttia vaikka niiden olisi pitänyt olla 30 minuuttia. Toisaalta kasvupistelinja 9-159 selvisi elossa yhtä hyvin kuin pakastamattomatkin silmut ja versominen oli lähes yhtä hyvää. Kuviosta 43 näkyy 'Ainolan' eloonjäämisprosentit ja versomisprosentit.



KUVIO 43. 'Ainolan' silmujen elossa selviäminen ja versominen maljalla +LN-kokeissa.

Silmujen versominen erlenmeyerpulloissa poikkeaa -LN-kokeiden tuloksista. +LN-kokeiden perusteella voisi sanoa, että menetelmä toimi kasvupistelinjalle 9-159 paremmin, mutta -LN-kokeiden tulokset antavat aivan toisenlaisen käsityksen. Vaikka kasvupistelinja 9-147 versoi maljalla huonosti, se jatkoi versomista edelleen erlenmeyerpullossa neljä ensimmäistä viikkoa ja samalla tavalla toimi myös kasvupistelinja 9-159 (ks. kuvio 44).



KUVIO 44. 'Ainolan' versoneiden silmujen versomisen kehittyminen tarkkailu välillä erlenmeyerpulloissa (+LN-koe).

7.2 Yhteenveto tuloksista

Saadut elossaselviämisen- ja versomisprosentit olivat ristiriitaisia. Jopa saman kannan eri kasvupistelinjojen välillä saattoi olla suuriakin eroja. –LN-kokeiden eloonjäämisprosentit ovat kaikki korkeita. Koonti eloonjäämis- ja versomisprosentteista maljalla löytyy liitteestä 5. Alhaisin prosentti oli 'Ainolalla' 70,0 %. Myös kannan A2 prosentit olivat alhaisempia kuin muiden. Kaiken kaikkiaan –LN-kokeiden silmut selvisivät hyvin elossa käsittelystä ja ongelmia tuotti lähinnä versominen.

Versomista katsottaessa –LN-kokeiden kohdalla, huomattiin lajikkeen 'Andenken an Ludwig Späth' versoneen maljalla parhaiten, jopa 100 %:sti. 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen kaikkien –LN-kokeiden versomisprosentit maljalla olivat yli 80 %.

Huonoiten maljalla versoivat kannat A2 ja A20. Molemmilla alhaisin versomisprosentti oli 27,3 % eikä mikään kummankaan lajikkeen –LN-kokeista saavuttanut yli 50 % versomista.

Erlenmeyerpulloissa versominen oli huonompaa kuin maljalla. Lähes kaikkien kantojen versomisprosentit laskivat silmujen erlenmeyerpulloihin siirron jälkeen. Vain muutaman kokeen versomisprosentti pysyi jonkin aikaa samana. Versomisprosentti laski eniten 'Andenken an Ludwig Späthillä'. Ainutkaan verso ei ollut luokiteltavissa luokkaan I tai II ensimmäisellä havainnointikerralla.

Alustoiden välillä oli havaittavissa eroavaisuuksia versomisessa, mutta osittain eroavaisuudet saattoivat aiheutua myös kasvupistelinjojen välisistä eroista. Suurimmassa osassa -LN-kokeita alusta A vaikuttaisi antavan parempia versomistuloksia kuin alusta B, mutta joitakin tapauksia löytyi missä asia oli toisin päin. Joillakin kannoilla -LN-kokeiden tulokset olivat ristiriidassa +LN-kokeiden tulosten kanssa kiinnitettäessä huomiota alustoihin.

+LN-kokeissa eloonjääminen oli hieman huonompaa kuin -LN-kokeissa. Huonoimmat selviämispromsentit ovat lajikkeella 'Ainola' ja kannalla A2 aivan niin kuin -LN-kokeissakin. Alhaisimmillaan eloonjäämispromsentti oli 53,3 %. Korkeimman promsentin sai 'Andenken an Ludwig Späth' (100,0 %) ja sen muutkin promsentit olivat hyviä (yli 80 %). Suurimman osan kannoista eloonjäämispromsentit olivat yli 70 %. Koonti eloonjäämis- ja versomisprosentteista maljalla löytyy liitteestä 6.

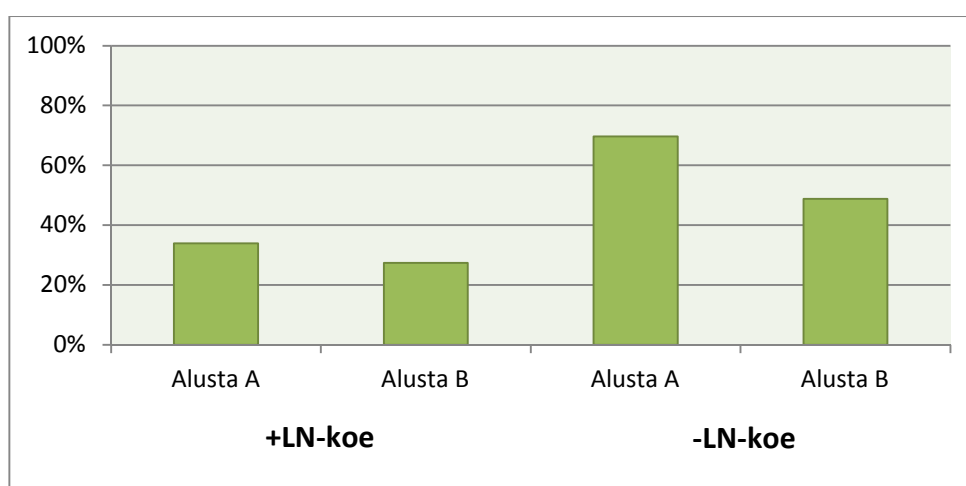
Versomisessa +LN-kokeilla oli vielä suurempia ongelmia kuin -LN-kokeilla. Useammalla lajikkeella maljalla versomisprosentiksi tuli alle 10 % ja 'Holgerin' toisella kasvupistelinjalla saatiin versomisprosentiksi 0 %. Korkein versomisprosentti saatiin lajikkeen 'Julia' toisella kasvupistelinjalla alustalla A ja se oli noin 70 %. Korkeasta maljalla versomisprosentista huolimatta 'Juliankin' silmut jatkoivat huonosti versomista erlenmeyerpulloissa. Vain muutama verso voitiin luokitella joko luokkaan yksi tai kaksi.

Monella muulla kannalla oli huomattavissa samansuuntaisia tuloksia kuin 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeella versomisessa erlenmeyerpulloissa. Versomisprosentit pienenevät kaikilla kannoilla erlenmeyerpulloon siirron jälkeen. Monella kannalla versomisprosentti laski nolnaan.

Niillä kannoilla joilla saatiin edes jonkinlaisia tuloksia ja oli tehty kokeita kahdella eri alustalla, on huomattavissa, että alusta A antaa paremman versomisprosentin. Lisäksi tuloksista on huomattavissa versomisen heikkenemistä kuudennen viikon kohdalla. Monilla kannoilla niin +LN-kokeissa kuin -LN-kokeissa, versomisprosentti laskee kuudennen viikon havainnoinnissa, jos se ei ole vielä aiemmin laskenut.

Syy tulosten heikkenemiseen kuudennella viikolla on epäselvä. Versojen kannalta olisi ollut hyödyllistä siirtää ne neljännellä viikolla uudelle alustalle. Tällä olisi voitu yrittää parantaa versojen selviämistä, mutta tämäkään keino ei takaa mitään. Uudelle alustalle siirrossa olisi saatu versoille uudet ravinteet ja niitä olisi ollut riittävästi, vanhalla alustalla ravinteet ovat vähentyneet kasvien käytettyä niitä.

Tuloksista oli havaittavissa yhtenäisyyksiä versomisessa eri alustoilla. Alusta A antoi paremman versomisprosentit useimmissa tapauksissa. Kuviosta 45 käy ilmi versomisprosenttien jakautuminen alustoittain maljalla.



KUVIO 45. Versominen maljalla alustoittain +LN- ja -LN-kokeissa.

7.3 Tulosten tarkastelu

7.3.1 Modifioidun pisara-vitrifikaatiomenetelmän toimivuus syreenille

Työn tuloksia on syytä tarkkailla kannoittain ja osittain jopa kasvupistelinjoittain. Kantojen välillä saattaa ilmetä suuriakin eroja ja, jos tuloksia ei tarkastella kannoittain jää huomioimatta kantojen väliset erot. Toisen kannan tulokset saattavat olla todella hyviä ja toisen huonoja. Myös kasvupistelinjojen väliset erot jäävät huomaamatta, jos tuloksia ei tarkastella kantakohtaisesti.

Lajikkeen 'Holger' tuloksista voidaan huomata ongelma versomisessa.

–LN-kokeiden silmuista kaikki selvisivät hengissä käsittelyistä ja

+LN-kokeiden silmuista noin 80 %. Tällöin elossaselviämisprosentit ovat hyviä ja tulosten perusteella olisi voitu olettaa myös versomisen olevan hyvää, mutta korkeinkin versomisprosentti jäi vain 50 %:iin maljalla ja laski jonkin verran erlenmeyerpulloissa. +LN-kokeissa toisen kasvupistelinjan versomisprosentti jäi 0 %:iin vaikka silmut selvisivät hyvin elossa, ja toisenkin kasvupistelinjan versomisprosentti laski jyrkästi erlenmeyerpulloissa. Voidaan siis sanoa, että lajikkeella 'Holger' pakastaminen onnistui, mutta versomisessa oli suuria ongelmia. Versomista täytyisi yrittää parantaa, ennen kuin voidaan todeta kehitetyn menetelmän toimivan täysin lajikkeelle 'Holger'.

Lajikkeella 'Andenken an Ludwig Späth' elossaselviämisprosentit olivat hyviä niin –LN-kokeissa kuin +LN-kokeissakin. Versomisprosentit maljalla olivat –LN-kokeiden kohdalla hyviä, mutta laskivat nopeasti erlenmeyerpulloissa. +LN-kokeissa versominen maljalla onnistui kasvupistelinjalla 6-246 hieman paremmin kuin linjalla 6-249x, mutta siltikään se ei ollut hyvää. Versominen maljalla jäi alhaiseksi, mutta erlenmeyerpulloissa ei ollut havaittavissa minäkäänlaista versomista siirron jälkeen. –LN-kokeissa tilanne oli hieman parempi, mutta niissäkin oli havaittavissa versomisen loppumista erlenmeyerpulloissa.

Näin ollen voidaan sanoa lajikkeesta 'Andenken an Ludwig Späth', että suurin ongelma pakastamisen onnistumisessa oli jatkokasvatusalusta. Lajikkeessa ei ollut havaittavissa suurta eroa versomisprosentteissa käytettyjen kasvatusalustoiden välillä. Alusta A antoi hieman korkeamman versomisprosentin maljalla kuin alusta B. Jos oikea kasvatusalusta olisi löytynyt, pakastamisen onnistuminen olisi ollut hyvin todennäköistä.

Kannan A2 kohdalla voidaan epäillä, ettei menetelmä toiminut kannalle riittävän hyvin. Elossaselviämispromsentti –LN-kokeissa jäi hieman alle 80 %:iin ja +LN-kokeissa vain vajaaseen 60 %:iin. Tällöin voidaan epäillä, etteivät silmut kestäneet vitrifikaatiokäsittelyä tarpeeksi hyvin vaan osa silmuista kärsi liikaa jo siinä vaiheessa. Elossaselviämispromsentit olivat huonoja, joten myös versomisprosentit jäivät huonoiksi. Kasvupistelinja 7-753 vaikutti versovan paremmin kummallakin alustalla kuin kasvupistelinja 7-749. Tämä kertoo siitä, että kasvupistelinjojen välillä voi olla eroja. Erot tulevat näkyviin parhaiten eri alustoilla. Toiselle kasvupistelinjalle alusta vaikuttaa sopivan paremmin kuin toiselle. Tällöin voidaan sanoa, että kasvupistelinjalla 7-753 kryosäilyttäminen vaikuttaisi onnistuvan paremmin ainakin käytetyillä alustoilla.

Kannan A20 tulokset olivat hyvin samankaltaisia kuin muidenkin lajikkeiden tulokset. Silmut selvisivät hyvin elossa käsittelyistä ja nestetypestä, mutta versominen oli hyvin heikkoa. Kanta on kuitenkin poikkeus siinä mielessä, että versominen oli parempaa +LN-kokeissa, vaikka normaalisti nestetypestä aiheutuva stressi laskee versomisprosenttia. Yleisesti katsottuna ei voida pakastamisen sanoa onnistuneen. Kuitenkin pakastamisen onnistumisen kannalta suurin ongelma piilee jatkokasvatusalustassa. Näin voidaan epäillä, koska myös +LN-käsittelyn aineiston ellossaselviäminen maljalla olivat suhteellisen hyvää, mutta versominen huonoa.

Lajikkeella 'Katherine Havemeyer' menetelmä vaikutti toimivan –LN-kokeiden osalta maljalla, mutta erlenmeyerpulloissa versominen ei kuitenkaan kehittynyt. +LN-kokeissa ellossaselviämispromsentit jäivät alhaisiksi ja versominen oli todella huonoa. Molemmista tuloksista oli huomattavissa, että alustalla A ver-

sominen oli parempaa kuin alustalla B. Vaikka +LN-kokeiden elossaselviäminen oli hieman alhaista, voidaan silti sanoa, että pakastaminen olisi voinut onnistua, jos sopiva jatkokasvatusalusta olisi löytynyt.

Menetelmä oli saatu toimimaan lajikkeelle 'Julia' ainakin pienelle otokselle. Näin voitiin toivoa, että se toimisi edelleen. Silmut selvisivät hyvin elossa käsittelyistä ja –LN-kokeissa versominen maljalla oli hyvää. +LN-kokeissa alustalla A versominen oli huomattavasti parempaa kuin alustalla B ja kasvupistelinja 5-600 versoi paremmin. Menetelmän voidaankin sanoa toimivan lajikkeelle 'Julia' suhteellisen hyvin, sillä neljän viikon kohdalla erlenmeyerpulloissa havainnoidut versot versoivat vielä hyvin varsinkin alustalla A. Kuitenkin kehittämistä on vielä varsinkin sopivan jatkokasvatusalustan osalta, mutta näistä tuloksista on hyvä jatkaa.

Lajikkeella 'Ainola' on hyödyllistä tarkkailla +LN-kokeiden osalta vain kasvupistelinjan 9-159 tuloksia, koska kasvupistelinjan 9-147 tuloksia väärin tuloksissa tapahtunut virhe. –LN-kokeissa tällaista ei tapahtunut, joten tulokset ovat vertailukelpoisia keskenään. Vaikka –LN-kokeissa ei ollutkaan tapahtunut virhettä, silti kasvupistelinjan 9-147 tulokset ovat huonompia. Näin ollen huomataan eroavaisuuksia kasvupistelinjojen välillä. Versominen tuotti ongelmia kummallekin kasvupistelinjalle, mutta tällöinkin kasvupistelinjan 9-159 versominen oli parempaa. Myös tämän lajikkeen kohdalla voidaan sanoa, että pakastamisen onnistuminen oli kiinni jatkokasvatusalustasta.

Katsottaessa tuloksia lajikeryhmittäin: isabellan-, jalo-, piha- ja puistosyreeni, ei ole huomattavissa minkäänlaisia yhtäläisyyksiä. Ryhmistä piha- ja puistosyreeni oli käytössä useampia kantoja, mutta tuloksissa ei ollut havaittavissa samankaltaisuutta tai niistä ei voida sanoa kummalle ryhmälle menetelmä toimi paremmin.

Kaikkia tuloksia katsottaessa voidaan sanoa, että suurin ongelma pakastamisen onnistumiselle oli versominen. Vaikka silmut selviävät hyvin elossa, eivät ne jaksaneet versota ja näin ollen kuolivat. Niinpä olisi hyödyllistä etsiä syree-

neille sopiva jatkokasvatusalusta. Tutkimuksessa käytetyistä jatkokasvatusalustoista alusta A (sisältää BAP:ia 3,0 mg/l ja IBA:a 0,5 mg/l) vaikuttaisi toimivan paremmin syreeneille kuin alusta B (sisältää BAP:ia 1,0 mg/l).

Versominen vaikutti alenevan erlenmeyerpulloissa lähes kaikilla kannoilla vaiheessa, jossa versot olivat olleet erlenmeyerpullossa yli neljä viikkoa. Niinpä olisi ollut hyvä, jos versot olisi voitu siirtää uudelle kasvatusalustalle, jolloin ne olisivat saaneet riittävästi ravinteita ja jaksaneet jatkaa kasvua.

Jos työ olisi tehty vain yhdellä kasvupistelinjalla, olisivat käytetyt silmujen määrät olleet suurempia. Tällöin tuloksista olisi tullut tarkempia ja luotettavampia, mutta kasvupistelinjojen välisiä eroja ei olisi voitu havainnoida lainkaan. Niitä kuitenkin huomattiin tuloksissa olevan. Vain yhtä kasvupistelinjaa käytettäessä olisi pystytty tekemään toistoa, jolloin olisi nähty oliko käytetyissä erissä eroja.

7.3.2 Virhelähteitä ja ongelmia

Silmujen kryosäilyttämisessä on monia vaiheita ja niinpä on myös monia mahdollisuuksia tehdä virheitä. Joidenkin kantojen kohdalla esikasvatuksessa oli ongelmia. Ainoastaan aivan ensimmäisenä eristetyt silmut selvisivät ilman ongelmia. Ongelmana oli versojen kasvun pysähtyminen. Versojen kasvu pysähtyi, koska kasvatushuoneen lämpötila laski yöaikaan liian alhaiseksi. Versojen kasvu lähti käyntiin uudelleen, mutta hitaasti, kun ne siirrettiin toiseen kasvatushuoneeseen, missä samanlaista ongelmaa ei ollut. Tästä johtuen kannan A20 toinen kasvupistelinja ei lisääntynyt riittävästi, jotta siitä olisi saatu eristettyä tarvittava määrä kärkisilmuja.

Virheitä syntyy helposti eri liuoskäsitelyajoissa (LS-liuos, PVS2-liuos ja soke-ri). Väärät ajat saattavat olla tappavia kasvien soluille. Varsinkin liian pitkä PVS2-aika saattaa tappaa osan soluista, jolloin silmuilla on huonommat mahdollisuudet selvitä elossa pakastamisesta ja versoontuminen huononee.

Kokeita tehdessä ei tullut merkittäviä virheitä PVS2-ajassa, virheet olivat yhden minuutin luokkaa suuntaan tai toiseen. Näin pienillä virheillä ei ole suurta vaikutusta silmuihin. Toisaalta taasen lajikkeen 'Ainola' kohdalla sattunut sokerikäsittelyvirhe vaikutti silmujen versomiseen. Silmut selvisivät hyvin elossa, mutta versominen oli huonompaa verrattaessa toisiin eriin. Koska silmut olivat vain kuusi minuuttia sokerissa 30 minuutin sijaan, saattoi silmuihin jäädä PVS2-liuosta, jota yritettiin huuhdella pois. Soluihin jäänyt PVS2-liuos jatkaa tällöin toimintaansa, koska sokeriliuos ei ole korvannut sitä ja näin ollen pysäyttänyt sen toimintaa.

Silmujen eloonjääminen ei niinkään ollut ongelma vaan niiden versominen. 'Katherine Havemeyer' -lajikkeen silmuilla ei ollut havaittavissa lainkaan versoontumista osassa eristä. Silmut kasvoivat vain kallusta ja näin ollen eivät olleet kuolleet, mutta ne eivät myöskään olisi pystyneet jatkamaan kasvamista.

Joillakin kannolla oli havaittavissa silmujen suurta kosteutta. Tämä saattoi johtua siitä, etteivät ne saaneet riittävästi ilmaa eikä kosteus päässyt haihtumaan pois alustalta. Alustat saattoivat myös olla liian kosteita, koska valamisvaiheessa niiden ei annettu kuivua ilman kantta vaan kansi laitettiin välittömästi kiinni. Tällöin kosteus kertyi esimerkiksi kanteen, josta se tippui kasvatusalustan pinnalle. Olisi ollut parempi antaa alustan jähmettyä kansi auki, mutta tilanpuutteen takia kannet jouduttiin sulkemaan välittömästi.

Alustat suljettiin tiiviisti parafilmillä, ettei niihin pääsisi mitään ylimääräistä. Tämä saattoi olla yhtenä syynä silmujen vettymiselle, koska jos mitään ei voi päästä sisälle maljaan ei sieltä voi myöskään päästä mitään ulos. Tällöin kaikki kosteus, mikä maljassa oli, jäi maljaan. Syitä silmujen vettymiselle voi olla lukuisia muitakin. Muun muassa vääränlainen lämpötila saattaa aiheuttaa veden kertymisen silmuihin. Myös valon määrällä voi olla vaikutusta asiaan. Silmujen versomiseen vaikuttaa myös alustan kovuus. Jos alusta on liian kova, eivät silmut saa riittävästi ravinteita, jolloin niiden on lähes mahdotonta alkaa versoa.

Ensimmäisen siirron jälkeen (kolme viikkoa sulatuksesta) suuri osa silmuista muuttui ruskeiksi. Tähän saattoi olla syynä jatkokasvatusalusta ja sillä vallitsevat olosuhteet. Tietenkin on mahdollista, että silmut olisivat vahingoittuneet siirron yhteydessä, mutta tämä vaihtoehto vaikuttaa epätodennäköiseltä, koska niin suuri osa silmuista muuttui ruskeiksi ja kuoli.

Todennäköisin syy on jatkokasvatusalustan sopimattomuus. Syreenien kasvatuksessa oli huomattu, että ne hyötyvät suuresta BAB:in määrästä ja näin valittiin kaksi alustaa, joissa kummassakin oli paljon BAP:ia. On mahdollista, että BAP:in määrä oli liian suuri silmuille vaikka se tuntui sopivan hyvin syreenien lisäämiseen.

Olisi ollut hyödyllistä kokeilla useampaa eri alustaa ja sitä vaikuttaako alustan vaihtaminen toiseen silmujen selviämiseen, mutta aika ei riittänyt eikä materiaalia olisi ollut riittävästi. Tälläkin materiaalimäärällä koe-erät jäivät pieniksi, mikä aiheutti virhettä tuloksiin. Jos erät olisivat olleet suurempia, saataisiin tuloksista tarkempia eivätkä poikkeamat näkyisi tuloksissa niin selvästi kuin ne nyt näkyvät.

8 JOHTOPÄÄTÖKSIÄ

8.1 Menetelmän toimivuus

Modifioidun pisara-vitrifikaatiomenetelmän toimivuudesta syreeneille ei voida olla varmoja. Kaikkien kantojen silmut selvisivät hyvin elossa käsittelyistä ja nestetypessä, mutta versominen tuotti ongelmia. Tällöin herää epäily, että ongelma on jatkokasvatusalustassa. Jatkokasvatusalustan sopimattomuus syreeneille on hyvin mahdollista, sillä silmut pysyivät elossa pitkiäkin aikoja pakastamisen jälkeen, mutta eivät versoneet viljelmiksi asti. Näin ollen menetelmä saattaisi toimia syreeneille, jos sopiva jatkokasvatusalusta löydettäisiin.

Kantojen välillä oli havaittavissa suuriakin eroja. Osan tulokset olivat positiivisia ja lupailivat jopa onnistunutta kryosäilytystä, mutta osan tulokset jäivät todella alhaisiksi varsinkin versomisen osalta. Myös kasvupistelinjojen välillä oli havaittavissa eroja. Suurimmat erot syntyivät kuitenkin alustoista. Toinen kasvupistelinja saattoi menestyä hyvin molemmilla alustoilla ja toinen vain toisella. Tällöin kasvupistelinjojen välillä oli eroa, mutta eroa oli myös alustojen sopivuudessa syreeneille.

8.2 Menetelmäsuositus

Lajikkeelle 'Julia' aiemmin MTT:ssä kehitetty menetelmä vaikuttaisi olevan toimiva, joten jatkossakin kannattaa jatkaa kehitetyn menetelmän käyttöä. Menetelmällä ei kuitenkaan kannata vielä pitkäaikaissäilyttää mitään vaan olisi tarpeellista etsiä sopiva jatkokasvatusalusta syreeneille. Kun jatkokasvatusalusta on löytynyt ja menetelmä vaikuttaisi toimivan riittävän hyvin, niin pitkäaikaissäilyttäminen on hyvä aloittaa.

Pakastamisen onnistuminen riippuu pitkälti versomisprosentista. Lajikkeella 'Julia' pakastaminen vaikuttaisi onnistuvan suhteellisen hyvin, joten sanoisin, että versomisprosentin noustessa yli 20 %:iin erlenmeyerpulloissa, voidaan pakastamisen sanoa onnistuneen. Kun pakastaminen onnistuu, pitkäaikaissäilyttäminen on hyvä aloittaa.

Jatkokasvatuksessa silmut kannattaa siirtää jo kolmannella viikolla sulatuksen jälkeen ensimmäisen kerran joko uudelle maljalle tai erlenmeyerpulloihin ainakin alustan A kohdalla. Myös erlenmeyerpulloista kannattaa tehdä siirtoja uusiin erlenmeyerpulloihin. Nämä siirrot olisivat hyvä tehdä vaiheessa, jossa versot olisivat olleet erlenmeyerpullossa neljä viikkoa. Jos silmuja ja versoja pidetään maljalla ja erlenmeyerpulloissa pidempään, elossaselviämis- ja versomisprosentit laskevat hyvin todennäköisesti.

8.3 Tulevaisuuden näkymiä

Pitkäaikaissäilyttäminen ei onnistunut odotetusti, ja kryotankissa on materiaalia, jolla ei saatu haluttuja tuloksia. Niinpä tankissa oleva materiaali tulisi sulattaa pois. Materiaalilla voisi jatkaa alustakokeita ja kokeilla muutamaa muuta alustaa jota tässä työssä ei ole vielä kokeiltu. Lisäksi voisi olla hyötyä, että ottaisi mukaan työssä käytetyn kasvatusalustan A. Otettaessa mukaan alusta, jolla on jo saatu tuloksia, pystytään vertaamaan tuloksia. Alusta A on parempi tähän tarkoitukseen, koska sillä saatiin parempia tuloksia kryosäilyttämisestä syreeneillä kuin alustalla B.

Tankissa ei ole kuin noin 60 silmua kannalta, joten olisi hyödyllistä jos silmuja eristettäisiin vielä lisää ja tehtäisiin niilläkin alustakokeita. Jos alustakokeisiin käytetään vain tankissa oleva materiaali, jäävät erät pieniksi ja tuloksiin syntyy poikkeamia. Lisäksi, jos erät ovat liian pieniä, ei tuloksia voida pitää luotettavina. Alustoja olisi hyvä ottaa kokeiluihin erilaisia, jotta nähtäisiin, mikä vaikuttaa versomiseen positiivisesti.

LÄHTEET

- Alanko, P. 1997. Puut ja pensaat. 4. p. Helsinki: Tammi.
- Alanko, P. & Lagerström, M. 2009. Puutarhan koristepensaat. Helsinki: Tammi.
- Fuller, B. J. 2004. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters* 25 (6):375–388.
- Haapala, T. & Niskanen A. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. Helsinki: VAPK-kustannus.
- Hauta-aho, L. 2006. Pihasyreenilajikkeita Helsingin kaupungin viheralueilla. Helsingin kaupungin rakennusviraston julkaisu. Helsingin kaupungin rakennusvirasto: katu- ja puisto-osasto.
- Havas, P. & Sulkava, S. 1987. Suomen luonnon talvi. Helsinki: Kirjayhtymä.
- Innovaatioita uusiutuvista luonnonvaroista. 2009. Viitattu 20.9.2010.
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely>
- Juhanoja, S. 2008. Syreenit, Vihervuoden kasvisuku. Viherympäristö 6.5.2008. Viitattu 29.9.2010.
<http://www.viherymparisto.fi/index.php?action=view&id=263&module=newsmodule&src=%40random481ff0a83754b>
- Kartha, K.K., Leung, N.L. & Mronginski, L.A. 1982. In vitro Growth Responses and Plant Regeneration from Cryopreserved Meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 107: 133–140.
- Lynch, P.T, Siddika, A., Mehra, A., Fabbri, A., Benelli, C. & Lambardi, M.2007, The challenge of successful cryopreservation of olive (*Olea europaea* L.) shoot tips. *Advances in horticultural sciences* 21 (4): 221–214.
- Marchand, P. J. 1996. Life in the cold: An Introduction to Winter Ecology. 3rd ed. UPNE. Teos julkaistu myös internetissä Google-kirjoissa. Viitattu 27.9.2010.
http://books.google.fi/books?id=gnSlxUEbwBUC&printsec=frontcover&dq=life+in+the+cold&hl=fi&ei=p0GgTNK_EpKHONPm6JEL&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CDQQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false
- MTT Laukaa. 2009. Viitattu 20.9.2010.
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely/toimipaikat/laukaa>
- Nukari, A., Laamanen, J. & Uosukainen, M. n.d. A Preliminary Study of the Droplet Vitrification Method Applied on Lilac. *Acta Horticulturae*: hyväksytty julkaistavaksi.

Nukari, A. & Rantala, S. 2009. Laukaan kryopankin menettelyohje. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus Kasvintuotannon tutkimus. Päivitetty 2010.

Nukari, A., Rantala, S. & Uosukainen, M. 2008. Pitkäaikaissäilytys kryomenetelmällä. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote 23:4 p. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen julkaisu. Viitattu 4.10.2010.
http://www.smts.fi/mpol2008/index_tiedostot/Esitelmat/es106.pdf

Nukari, A., Uosukainen, M., Rokka V., Antonius, K., Wang, Q. & Valkonen J. P.T. 2009. Cryopreservation techniques and their application in vegetatively propagated crop plants in Finland. *Agricultural and food science* 18: 117–128.

Osaaminen kuudessa tutkimusalassa. 2009. Viitattu 20.9.2010.
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely/tutkimusalat>

Puuvartisten kasvien menestymisvyöhykkeet. n.d. Viherystävällisyysliitto. Viitattu 9.9.2010.
<http://www.vyl.fi/index.php?section=67FirefoxHTML\Shell\Open\Command>

Refouvelet, E., Le Nours, S., Tallon, C. & Daguin, F. 1998. A new method for *in vitro* propagation of lilac (*Syringa vulgaris* L.): regrowth and storage condition for axillary buds encapsulated in alginate beads, development of a pre-acclimatisation stage. *Scientia Horticulturae* 74: 233 – 241.

Reed, B. M. 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer.

Räty, E. 2009. Viheralueiden puut & pensaat. 5. p., uud. p. Muina tekijöinä Taimistoviljelijät ry. Helsinki: Puutarhaliitto.

Sakai, A. & Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. *Cryoletters* 28 (3):151–172.

Syreenit. 2010. Lassilan taimisto. Viitattu 9.9.2010.
<http://www.lassilantaimisto.fi/syreenit.html>

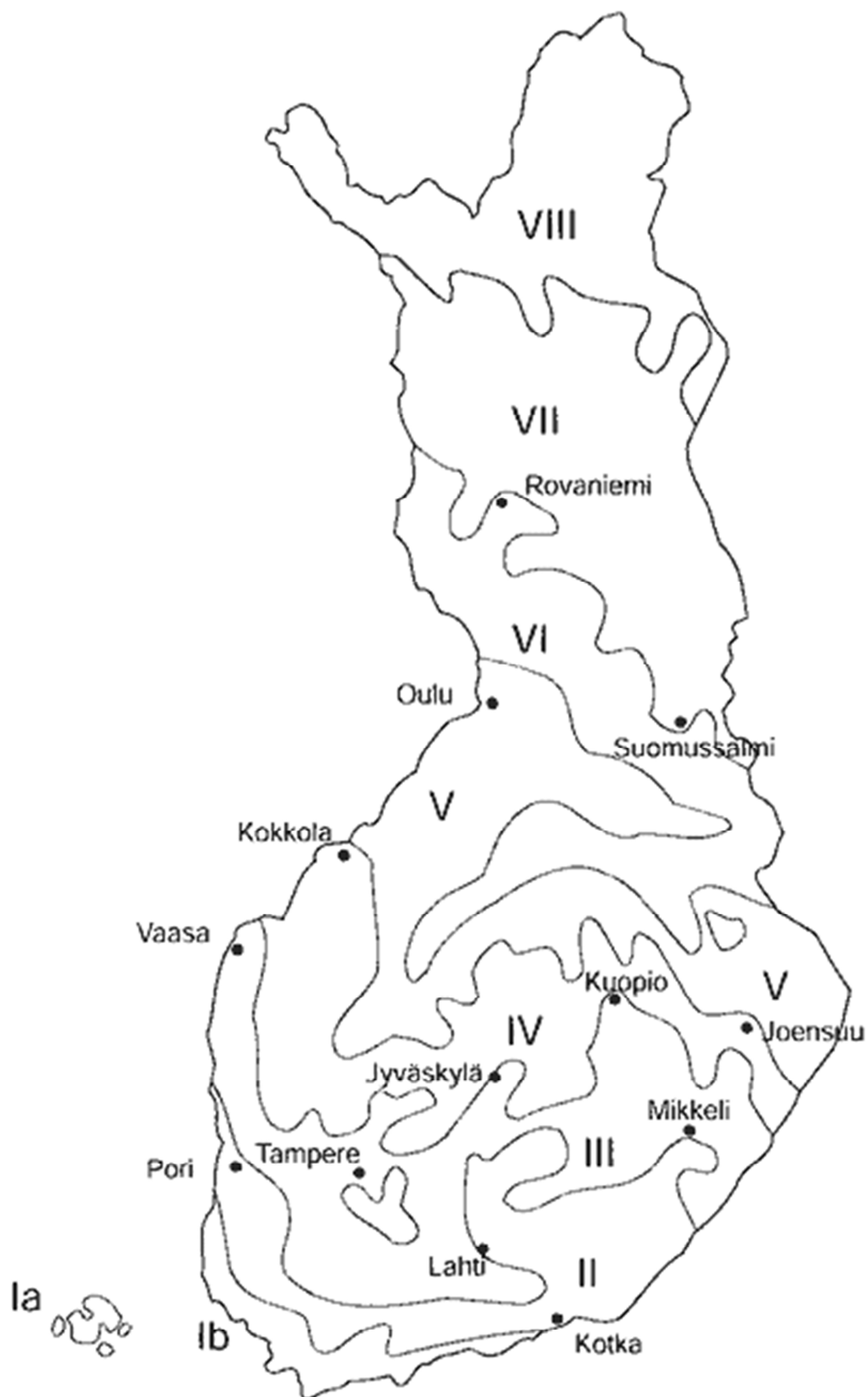
Tao, D. & Li, P. H. 1986. Classification of Plant Cell Cryoprotectants. *Journal of theoretical biology* 123: 305 – 310.

Uchende, E. E. & Reed, B. M. 2008. A comparative study of three cryopreservation protocols for effective storage of *in vitro*-grown mint (*Mentha SPP.*). *Cryoletters* 29 (3): 181–188.

Veteläinen, M. 2008. Suomen Kansallinen kasvigeenivaraothjelma suojelutyön tukena 2003–2008. MTT:n selvityksiä 165. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus Kasvintuotanto.

LIITTEET

Liite 1. Kasvien menestyminen Suomessa vyöhykkeittäin



Liite 2. Käytetyt alustat

0,50 M sakkaroosi Murashige Skoog -alusta:

(sokerikäsitteilyalusta)

Murashige Skoog -jauhe (4,3 g/l) (Sigma Aldrich, Tuotenumero M5524)
vitamiinit (10 ml /l) (saadaan liuoksesta, jossa on 0,05 g/l nikotiinihappoa,
0,10 g/l tiamiinia, 0,05 g/l pyridoksiinia ja 0,20 g/l glysiiniä)
0,50 M sakkaroosi (171 g/l)
myoinositoli (0,1 g/l)
gelriitti (2,6 g/l)

Sekoitetaan aineet tislattuun veteen ja säädetään pH:ksi 5,6 – 5,8.

(0,25 M ja 0,75 M sakkaroosi Murashige Skoog -alustat valmistetaan samalla tavalla, ainoastaan sakkaroosin määrä vaihtuu. 0,25 M alustassa sakkaroosia on 85,5 g/l ja 0,75 M alustassa 256,5 g/l.)

Glukoosipohjaiset alustat:

Käytössä oli kaksi eri alustaa, joissa molemmissa sokerina oli glukoosi. Alustoja käytettiin syreenien jatkokasvatusalustoina. Alustat valmistettiin käyttämällä neljää perusliuosta, vitamiineja (vitamiiniperusliuoksesta), kasvuhormoneja, sokeria, myoinositolia ja agaria.

Ensimmäinen perusliuos:

NH_4NO_3 (33,0 g/l)

KNO_3 (5,0 g /l)

KH_2PO_4 (5,0 g/l)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (20,0 g/l)

Aineet liuotetaan tislattuun veteen.

Toinen perusliuos:

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ja Na_2EDTA (0,78 g/l)

Liutetaan tislattuun veteen.

Kolmas perusliuos: hivenaineet

H_3BO_4 (0,62 g/l)

$\text{NaMoO} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/l)

$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)

KJ (0,083 g/l)

Liutetaan aineet tislattuun veteen.

Neljäs perusliuos: sulfaatit

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (20,0 g/l)

$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,86 g/l)

$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (2,23 g/l)

Liutetaan aineet tislattuun veteen.

Vitamiiniperusliuos:

Nikotiinihappo (0,05 g/l)

Tiamiini (0,10 g/l)

Pyridoksiini (0,05 g/l)

Glysiini (0,20 g/l)

Kasvuhormonit:

BAP (100 mg/l) ja IBA (100 mg/l) liutetaan pieneen määrään 1 N NaOH.

Kasvatusalusta A:

(Jatkokasvatusalusta)

Tehtäessä yksi litra liuosta tarvitaan:

50 ml ensimmäinen perusliuos

50 ml toinen perusliuos

10 ml kolmas perusliuos

10 ml neljäs perusliuos

10 ml vitamiiniperusliuos

30 ml BAP

5 ml IBA

30 g glukoosi

0,1 g myoinositoli (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Tuotenumero 201-781-2)

4 g agar (OneMed Oy, Vantaa, Tuotenumero 1462076)

3,75 g agar (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Tuotenumero 4508,2)

0,27 g Bacto Peptone (Becton Dickinson and Company, Sparks USA, Tuotenumero 21152)

Alustan pH:ksi säädetään 5,0

Kasvatusalusta B:

(Lajikkeiden 'Julia', 'Holger', 'Katherine Havemeyer' ja 'Andenken an Ludwig Späth' sekä kantojen A2 ja A20 esikasvatusalusta sekä toinen jatkokasvatusalustoista)

Tehtäessä yksi litra liuosta tarvitaan:

50 ml ensimmäinen perusliuos

50 ml toinen perusliuos

10 ml kolmas perusliuos

10 ml neljäs perusliuos

10 ml vitamiiniperusliuos

10 ml BAP

30 g glukoosi

0,1 g myoinositoli

4 g agar (OneMed Oy, Vantaa, Tuotenumero 1462076)
3,75 g agar (Carl Roth GmbH & Co, Tuotenumero 4508,2)
0,27 g Bacto Peptone

Alustan pH:ksi säädetään 5,0

Fruktoosipohjainen alusta:

(Lajikkeen 'Ainola' esikasvatusalusta)

Ensimmäinen perusliuos:

NH_4NO_3 (16,5 g/l)

KNO_3 (5,0 g/l)

KH_2PO_4 (5,0 g/l)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (20,0 g/l)

Aineet liuotetaan tislattuun veteen.

Toinen perusliuos:

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ja Na_2EDTA (0,78 g/l)

Liuotetaan tislattuun veteen.

Kolmas perusliuos: hivenaineet

H_3BO_4 (0,62 g/l)

$\text{NaMoO} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/l)

$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)

KJ (0,083 g/l)

Liuotetaan aineet tislattuun veteen.

Neljäs perusliuos: sulfaatit

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (20,0 g/l)

$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,86 g/l)

$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (2,23 g/l)

Liuotetaan aineet tislattuun veteen.

Vitamiiniperusliuos:

Nikotiinihappo (0,05 g/l)

Tiamiini (0,10 g/l)

Pyridoksiini (0,05 g/l)

Glysiini (0,20 g/l)

Kasvuhormonit:

BAP (100 mg/l) ja (IBA 100 mg/l) liuotetaan pieneen määrään 1 N NaOH.

Tehtäessä yksi litra liuosta tarvitaan:

50 ml ensimmäinen perusliuos

50 ml toinen perusliuos

10 ml kolmas perusliuos

10 ml neljäs perusliuos

10 ml vitamiiniperusliuos

5 ml BAP

2,5 ml IBA

20 g fruktoosi

0,1 g myoinositoli

4 g agar (OneMed Oy, Vantaa, Tuotenumero 1462076)

3,75 g agar (Carl Roth GmbH & Co, Tuotenumero 4508,2)

0,27 g Bacto Peptone

Alustan pH:ksi säädetään 5,0

Sakkaroosipohjainen alusta:

(Lajikkeen 'Julia' aikaisemmin käytetty esikasvatusalusta)

Ensimmäinen perusliuos:

NH_4NO_3 (16 g/l)

$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (3,84 g/l)

Liuotetaan aineet tislattuun veteen.

Toinen perusliuos:

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ja Na_2EDTA (0,78 g/l)

Liuotetaan tislattuun veteen.

Kolmas perusliuos:

K_2SO_4 (19,8 g/l)

Liuotetaan tislattuun veteen.

Neljäs perusliuos: sulfaatit

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (3,7 g/l)

$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/l)

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,86 g/l)

$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (2,23 g/l)

Liuotetaan aineet tislattuun veteen.

Viides perusliuos:

KH_2PO_4 (10,0 g/l)

Liuotetaan tislattuun veteen.

Kuudes perusliuos:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (22,24g/l)

Liuotetaan tislattuun veteen.

Seitsemäs perusliuos:

H_3BO_3 (0,31 g/l)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,0125 g/l)

Liuotetaan tislattuun veteen.

Vitamiiniperusliuos:

Nikotiinihappo (0,05 g/l)

Tiamiini (0,10 g/l)

Pyridoksiini (0,05 g/l)

Glysiini (0,20 g/l)

Kasvuhormonit:

BAP (100 mg/l) liuotetaan pieneen määrään 1 N NaOH.

Tehtäessä yksi litra liuosta tarvitaan:

25 ml ensimmäinen perusliuos

50 ml toinen perusliuos

50 ml kolmas perusliuos

10 ml neljäs perusliuos

17 ml viides perusliuos

25 ml kuudes perusliuos

10 ml seitsemäs perusliuos

10 ml vitamiiniperusliuos

5 ml BAP

20 g sakkaroosi

0,1 g myoinositoli

4 g agar (OneMed Oy, Vantaa, Tuotenumero 1462076)

3,75 g agar (Carl Roth GmbH & Co, Tuotenumero 4508,2)

0,27 g Bacto Peptone

Alustan pH:ksi säädetään 5,2

Liite 3. Käytetyt liuokset

Latausliuos:

(vitrifikaatiokäsittelyn ensimmäinen liuos, LS)

Murashige Skoog -jauhe (4,3 g/l)

2 M glyseroli (184 g/l)

0,4 M sakkaroosi (137 g/l) (laboratoriolaatu)

Sekoitetaan aineet tislattuun veteen ja säädetään pH:ksi 5,8.

PVS2-liuos:

(vitrifikaatiokäsittelyn toinen liuos)

Murashige Skoog -jauhe (4,3 g/l)

30 paino- % glyseroli (300 g/l)

15 paino- % etyleeniglykoli (150 g/l)

15 paino- % DMSO (150g/l)

0,4 M sakkaroosi (137 g/l) (laboratoriolaatu)

Sekoitetaan aineet tislattuun veteen ja säädetään pH:ksi 5,8.

1 M sakkaroosiliuos:

(1 M MS-liuos, purkuliuos, sulatuksessa käytetty liuos)

Murashige Skoog -jauhe (4,3 g/l)

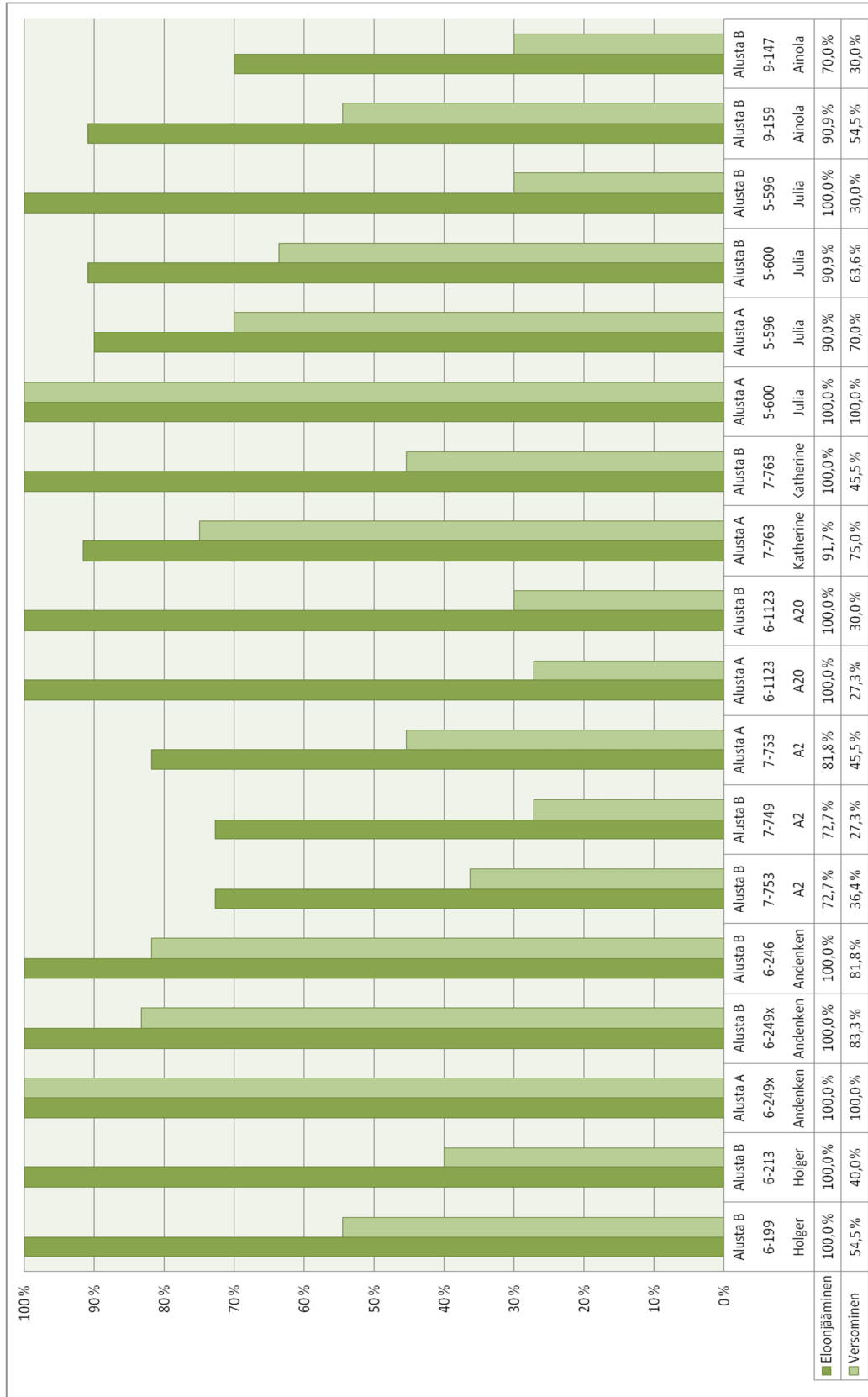
1 M sakkaroosi (342 g/l)

Sekoitetaan aineet tislattuun veteen ja säädetään pH:ksi 5,8.

Liite 4. Eristettyjen silmujen määrät sekä niiden jakautuminen eri kokeisiin

Kanta	Kasvustelinija	Silmuja eristetty yhteensä	Pitkäaikais-säilytykseen	-LN-koe kontrolleja	-LN-koe kontrolleja alustalle A	-LN-koe kontrolleja alustalle B	+LN-koe kontrolleja	+LN-koe kontrolleja alustalle A	+LN-koe kontrolleja alustalle B
'Holger'	6-199	53	20	11	0	11	22	0	22
	6-213	65	33	10	0	10	22	0	22
'Andenken an Ludwig Späth'	6-246	74	30	11	0	11	33	11	22
	6-249X	95	30	23	11	12	42	20	22
A2	7-749	75	30	11	0	11	34	0	34
	7-753	64	20	22	11	11	22	11	11
A20	6-1123	81	30	21	0	10	30	10	20
'Katherine Havemeyer'	7-763	140	32	23	12	11	85	42	43
'Julia'	5-596	80	30	20	10	10	30	11	21
	5-600	84	30	22	11	11	32	10	22
'Ainola'	9-147	70	30	10	0	10	30	0	30
	9-159	68	33	11	0	11	24	0	24
Yhteensä		949	348	195	55	129	406	115	293

Liite 5. –LN-kokeiden kaikkien kantojen eloonjäämis- ja versomisprosentit maljalla kasvupistelinjoittain ja jatkokasvatusalustoittain



Liite 6. +LN-kokeiden kaikkien kantojen eloonjäämis- ja versomisprosentit maljalla kasvupistelinjoittain ja jatkokasvatusalustoittain

