
**Metsäkuusen erikoismuotojen lisääminen silmustamalla ja
mikropistokkaista**




Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Puutarhatalous

Lepaa, kevät 2016

Saija Alho



LEPAA
Puutarhatalous
Kasvihuone- ja taimitarhatuotanto

Tekijä	Saija Alho	Vuosi 2016
Työn nimi	Metsäkuusen erikoismuotojen lisääminen silmustamalla ja mikropistokkaista	

TIIVISTELMÄ

Viherrakentaminen ja siihen liittyvä taimikauppa ovat olleet kovassa kasvussa viime vuosina. Taimia tuodaan meille Keski-Euroopasta, mutta niiden kestävyys pohjoisessa ilmastossa on vaihtelevaa. Kotimaisilla taimilla on kasvava kysyntä.

Kasvullisen lisäämisen keinoja kuusella on tutkittu Suomessa vähän ja uusia menetelmiä tarvitaan kuusen erikoismuotojen massatuotantoon. Silmustus ja in vitro -pistokaslisäys voisivat olla uusia menetelmiä ja tämä opinnäytetyössä testattiin näiden menetelmien toimivuutta. Testattavana oli kuusi erilaista metsäkuusen erikoismuotoa.

Tämän työn tilaaja Metla (joka on nykyisin osa LUKEa) tekee jatkuvasti tutkimusta alalla ja etsii uusia menetelmiä taimituotantoon. Metlassa on tutkittu mm. pistokaslisäystä ja varttamista kuusen erikoismuotojen kasvullisen lisäyksen keinoina.

Tämän opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin keväällä 2014, Metlan Punkaharjun yksikön tiloissa. Silmustaminen tehtiin taimiston kasvihuoneella ja mikropistokaskokeet laboratorioissa.

Molemmissa kasvullisen lisäyksen kokeissa epäonnistuttiin. Silmustaminen ei toiminut kuusella sellaisenaan vaan silmut kuihtuivat ja kuolivat. Vuonna 2015 silmustaminen korvattiin silmuvarte-menetelmällä, jossa onnistuttiin noin 30 %:sesti. Mikropistokkaat saatiin kasvamaan pituutta, mutta juurenmuodostusta ei tapahtunut. Juurrutushormonin määriä ja altistusaikoja voisi testata lisäkokeissa, samoin kuin kasvualustan ravinnepitoisuuksien määriä.

Avainsanat Kasvullinen lisääminen, in vitro -pistokkaat, *Picea abies*

Sivut 23 s. + liite 1.

Lepaa
Degree Programme in Horticulture
Greenhouse and Nursery Production

Author	Saija Alho	Year 2016
Subject of Bachelor's thesis	Propagating Special Forms of the Norway Spruce by Budding and from In vitro Cuttings	

ABSTRACT

Landscaping and sapling businesses have been growing in the last few years. Saplings are brought from Central Europe to Finland, but their surviving in our harsh northern climate is varying. The demand of domestic saplings is growing.

The ways of vegetative propagation of Norway spruce have been studied very little in Finland. New ways are needed to make the mass production of special forms of Norway spruce possible. Budding and in vitro cuttings could be new ways to mass production. In this study both ways were tested with six different forms of the Norway spruce.

This thesis was commissioned by Metla (now a part of LUKE) which is constantly doing research in this field and seeking new ways to vegetative production. Metla has studied cuttings and crafting over the past years.

The testing part of this thesis was made in Metla's Punkaharju facilities during the spring of 2014. Buddings were propagated in the nursery greenhouse and in vitro cuttings tests were done in the laboratory.

Both tests were unsuccessful. The Norway spruce could not be propagated by budding. Buds just dried out and died. Next year (2015) bud crafting replaced budding with a 30 % success viability. In vitro cuttings did grow height, but adventitious rooting did not appear. The amounts of rooting hormone could be tested more as well as the amounts of nutrients in the growing media.

Keywords Vegetative propagation, In vitro cutting, *Picea abies*

Pages 23 p. + appendices 1.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	VIRHE. KIRJANMERKKIÄ EI OLE MÄÄRITETTY.
2	METSÄKUUSI JA SEN ERIKOISMUODOT	2
2.1	Metsäkuusi (<i>Picea abies</i>)	2
2.2	Metsäkuusen erikoismuodot.....	2
2.3	Kuusen erikoismuotojen lisääminen	3
2.3.1	Suvullinen lisääminen	3
2.3.2	Kasvullinen lisääminen	4
2.4	Opinnäytetyön tavoitteet	5
3	AINEISTO JA MENETELMÄT	6
3.1	Työn tilaaja.....	6
3.2	Genotyypit.....	6
3.3	Lisäysmenetelmät.....	10
3.3.1	Silmustaminen	11
3.3.2	Mikropistokkaat.....	12
4	TULOKSET	14
4.1	Silmustus	14
4.1.1	Tulokset 2014	14
4.1.2	Tulokset 2015	14
4.2	Mikropistokkaat	15
5	TULOSTEN TARKASTELUA	17
5.1	Silmustus	17
5.2	Mikropistokkaat	18
5.2.1	Sterilointi	18
5.2.2	Kasvualustat	19
5.2.3	Mikropistokkaiden pituuskasvu.....	19
6	POHDINTAA.....	20
7	KIITOKSET	21
8	LÄHTEET	VIRHE. KIRJANMERKKIÄ EI OLE MÄÄRITETTY.

Liite 1 WPM-alustan alkuperäinen resepti

1 JOHDANTO

Viherrakentaminen on kasvava ala, jolla on kuitenkin pohjoisissa olois-samme omat haasteensa. Lehtipuiden ja -pensaiden ollessa suuren osan vuotta lehdettäviä, viherrakentamisessa ja koristetaimien tuotannossa tarvittaisiin kestäviä, kotimaisia havupuiden taimia. Viherrakentamiseen tarkoitettuja havupuiden taimia tuodaan meille Keski-Euroopasta, mutta tuontitaimien talvenkestävyys on heikompi kuin kotimaisten taimien. Tuontitaimien mukana voi myös tulla tauteja ja tuholaisia, joita emme tänne halua.

Metsäkuusen erikoismuodot ovat syntyneet useimmiten mutaation, joka on usein geneettisesti väistynyt ominaisuus, seurauksena, joten suvullinen lisääminen on usein hankalaa tai mahdotonta. Kasvullisen lisäämisen etuna ovat täysin emopuun kaltaiset jälkeläiset ja tasalaatuinen taimimateriaali. Metlassa on tutkittu kuusen kasvullisen lisäyksen menetelmiä, kuten solukkolisäystä ja pistokaslisäystä, sekä varttamista, mutta erikoismuotojen lisäämiseen kaivattaisiin uusia, entistä tehokkaampia menetelmiä.

Silmustus on lisäysmuotona käsityötä ja tarkkuutta vaativa toimenpide. Siinä yksi yksittäinen silmu otetaan emokasvista ja kiinnitetään se perusrunkoon, tässä tapauksessa nuori metsäkuusen siementaimeen. Tavoitteena on, että siirretystä silmusta kasvaa perusrungolle uusi latva, joka ilmentää haluttua geenimuunnosta.

In vitro -pistokaslisäys on käsityönä tehtävä ja tarkkuutta vaativa toimenpide, joka suoritetaan laboratorioissa, steriileissä oloissa. Siinä lisättävästä emopuusta otettu silmu tai versonkärki pintasteriloidaan ja siirretään steriilille kasvualustalle kasvamaan. Tavoitteena on, että verso juurtuu ja kasvaa taimeksi steriileissä olosuhteissa.

Opinnäytetyöni tutkimuskysymys on, ovatko silmustus tai in vitro -pistokaslisäys sopivia lisäyskeinoja metsäkuusen erikoismuotojen massatuotantoon? Molempia kasvullisen lisäyksen keinoja havupuille on tutkittu Suomessa hyvin vähän. Varttaminen ja pistokaslisäys ovat tutkittuja ja toimivia lisäyskeinoja, mutta vaativat paljon lisäysmateriaalia kuusen erikoismuodoista, josta meillä Suomessa valitettavasti on pulaa. Perinteisen pistokaslisäyksen ongelmana on lisäksi, että vanhoista puista leikattujen pistokkaiden juurtuminen on yleensä heikkoa. Uusia tehokkaampia kasvullisen lisäämisen keinoja etsitään jatkuvasti. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on testata kahden uuden menetelmän soveltuvuutta metsäkuusen erikoismuotojen kasvulliseen lisäykseen.

2 METSÄKUUSI JA SEN ERIKOISMUODOT

2.1 Metsäkuusi (*Picea abies*)



Kuva 1

Kartassa on kuvattuna metsäkuusen levinneisyysalue Euroopassa. (Metsäkuusi 2016)

Maapallolla tunnetaan vajaat 50 kuusilajia, joista Suomessa menestyy luonnonvaraisena vain metsäkuusi. Suomen metsistä lähes neljännes on kuusikoita. Vaikka sekä Pohjois- että Etelä-Suomessa kasvaa sama kuusilaji, ne näyttävät erilaisilta. Pohjoisessa kuusi on kasvutavaltaan selvästi kapeampi kuin etelässä. Syynä tähän oletetaan olevan lapin suurempi lumikuorma. Tutkijat ovatkin nimenneet pohjoisen muodon omaksi alalajikseen, siperiankuusi *Picea abies subsp. obovata*. Kuusi on Suomen korkeimmaksi kasvava havupuu ja se voi varttua jopa 500-vuotiaaksi (Relve 1997).

2.2 Metsäkuusen erikoismuodot

Kuusen erikoismuodot ovat tavallisen metsäkuusen (*Picea abies*) muunnoksia, jotka eroavat lajin tyypillisistä yksilöistä kasvutavan tai jonkin muun ominaisuuden (esim. neulasten väri) perusteella, mutta poikkeavan ominaisuuden syynä eivät ole kasvuympäristö tai muut ulkoiset tekijät. Esimerkkejä ovat surukuusi, tapionpöytä, kultakuusi ja purppurakuusi. Erikoismuodon poikkeava ulkomuoto aiheutuu ominaisuuteen vaikuttavassa/vaikuttavissa geneeissä tapahtuneesta muutoksesta, mutaatiosta. Joitakin erikoismuotoja on tuotettu myös risteyttämällä luonnosta löytyneitä mutatoituneita yksilöitä keskenään (esim. kultapendula). Mutaatiot aiheuttavat usein myös hidaskasvuisuutta, jonka vuoksi erikoismuodot häviävät elintilakilpailussa normaaleille yksilöille, eli ajan kuluessa häviävät luontaisilta kasvupaikoiltaan. Luonnosta löytyvistä erikoismuodoista pidetään kirjaa, merkitään näkyvästi ja harvinaisuudet voidaan julistaa suojelukohteiksi.

Taulukko 1

Luonnonvarakeskuksen kantapuurekisterissä vuonna 2011 merkityt kuusen erikoismuodot Nikkanen & Velling (2011)

Erikoismuoto	Lukumäärä kpl
Kapealatvaiset	685
Käärmeet ja riipat	42
Tuulenpesät	37
Kääpiökasvuiset ja la- moavat	82
Neulasten poik- keavuudet	63
Rungon ja kuoren poikkeavuudet	40
Käpyjen poikkeavuu- det	2
Yhteensä	951

2.3 Kuusen erikoismuotojen lisääminen

2.3.1 Suvullinen lisääminen

Arosen (2011) mukaan suvullinen eli siemenlisääminen onnistuu erikoismuotojen kohdalla vain, kun erikoismuodon aiheuttavat perintötekijät ovat vallitsevia. Tästä esimerkkinä on visakoivu. Visakoivun ja tavallisen koivun risteytysjälkeläisistä visautuu noin puolet. Molempien vanhempien ollessa visakoivuja, on visautuvien jälkeläisten osuus suurempi, 50–80 %. Suvullisessa, siemenen kautta tapahtuvassa lisäämisessä perintötekijät järjestyvät aina uudestaan ja koska mutaatiot ovat väistyviä, tulisi sama mutatoitunut geeni olla molemmilla vanhemmilla, että se siirtyisi edes osalle jälkeläisistä.

Kuusen erikoismuodoista vain kapea- ja pallolatvaiset sekä purppurakuuset voivat tulla kyseeseen siemenlisäystä pohdittaessa, koska ko. ominaisuuksien on havaittu periytyvän vallitsevasti (Aronen 2011). Erikoismuodot ilmenevät taimissa yleensä varsin myöhään, joten haluttua muotoa ilmentävien taimien tunnistus voi olla haasteellista. Lisäksi tulee muistaa, että vaikka haluttu ominaisuus, esimerkiksi neulasten keväinen punaväri, periytyykin osalle jälkeläisistä, voivat näiden erikoismuotojen muut ominaisuudet (esim. kasvutapa) olla koristeikäyttöön huonosti sopivia.

2.3.2 Kasvullinen lisääminen

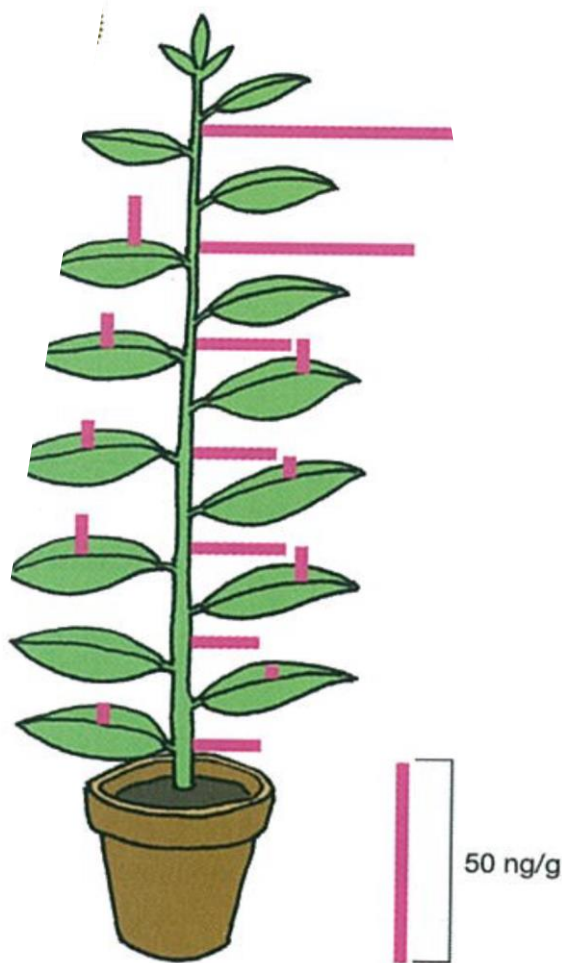
Kasvullisen lisäyksen eli kloonauksen etuna on tunnettujen ominaisuuksien siirtyminen taimille. Kloonatuista taimista tulee täysin emokasvin kaltaisia. Toinen suuri etu on taimimateriaalin tasalaatuisuus. Haittana kloonauksessa on perinnöllisen monimuotoisuuden kapeneminen tuotetussa taimiaineistossa.

Kasvullisen lisäyksen menetelmiä ovat pistokaslisäys, varttaminen, silmustaminen, mikropistokaslisäys ja solukkolisäys. Kasvullisen lisäyksen menetelmiä ja niiden soveltuvuutta eri puulajien lisäämiseen on esitelty tarkemmin lukuisissa julkaisuissa Aronen (2011); MacDonald (2014) ja Hartmann, Kester, Davies ja Geneve (2014).

Pistokaslisäyksessä versonkärjet laitetaan suoraan esim. turve/perliitti seokseen juurtumaan. Otetaan halutun pituinen (esim. 6 cm) versonkärki (edellisen vuoden kasvain), poistetaan neulasia noin 2 cm matkalta verson alaosasta ja pistetään kasvualustaan juurtumaan. Vartettaessa perusrungon latva tai oksan kärki, korvataan jaloversolla. Jalonnettavan erikoismuodon verso liitetään perusrunkoon niin, että saman paksuiset versot liitetään saman pituisella liitoksella, jotta nestevirtaus ei katkea. Liitos sidotaan napakasti ja annetaan kasvaa yhteen rauhassa. Silmustamisessa perusrunkoon siirretään vain yksi tai useampi silmu jalonnettavasta erikoismuodosta, kokonaisen latvan sijaan. Mikropistokaslisäyksessä kasvatetaan kasvupisteestä tai jostain muusta kasvinosasta steriilisti eli laboratoriossa juurellisia versoja. Solukkoviljelyssä puita monistetaan laboratoriossa viljelemällä puusta otettua solukkoa keinotekoisella ravintoalustalla sulje- tuissa astioissa Aronen (2011).

Kasvullisen lisäyksen menetelmistä varttaminen onnistuu varmimmin, mutta vaatii eniten lisäysmateriaalia ja käsityötä. Silmustaminen vaatii vähemmän lisäysmateriaalia ja on käsityönä nopeampaa tehdä. Mikropistokaslisäys tuottaa vähäisestä määrästä lisäysmateriaalia paljon taimia, mutta vaatii kalliin panostuksen laboratoriotiloihin ja -laitteisiin ja ammattitaitoon – mikäli se toteutetaan in vitro -oloissa kuten solukkolisäyskin. Kasvullisen lisäämisen keinoista on runsaasti englanninkielistä kirjallisuutta mm. teos *The manual of plant grafting* (MacDonald 2014). Havukasvien kasvullisesta lisäämisestä on tässä kirjassa oma lukunsa.

Kasvullisen lisäyksen onnistumiseen vaikuttaa useita tekijöitä. Emopuun ikä – vanhoista puista leikatut lisäysmateriaalit toimivat heikommin kuin nuorem- mista puista leikatut. Juveniilivaihe eli puun nuoruusvaihe kestää kuusella noin 10–15 vuotta. Puu saavuttaa aikuisuuden kun se tulee sukukypsäksi eli kukinta alkaa. Puun paras emotaimi-ikä on 3–6 vuotta. Tästä hyvänä esimerkkinä on pistokaslisäys, joka nuoresta materiaalista onnistuu 80–100 %, kun taas vanhoista puista otettuna vain 50 %, Nikkanen, Aronen & Heiska (2012). Lisäysmenetelmästä riippuen lisäysmateriaalin keräysajankohta vaikuttaa lopputulokseen. Myös lisäysmateriaalin sijainti emokasvissa voi vaikuttaa lopputulokseen – kasvihormonien pitoisuus vaihtelee kasvin eri osissa (kuva 2).



Kuva 2. Auksiinipitoisuus (punaiset palkit) kasvin eri osissa nanogrammoina tuorepainogrammoista. Fagerstedt, Linden, Santanen ja Väinölä (2008)

2.4 Opinnäytetyön tavoitteet

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on testata kahden uuden menetelmän, silmustuksen (silmuvarrtamisen) ja in vitro -mikropistokkaiden soveltuvuutta metsäkuusen erikoismuotojen kasvulliseen lisäykseen.

Silmustuksen kokeileminen kuusen erikoismuodoilla pohjautuu Ruotsissa kuusen jalostuksessa metsänviljelyyn tarkoitettulla kuusiaineistolla saatuihin lupaaviin tuloksiin (Hajek 2009). Silmustusta ei kuitenkaan ole tiettävästi aiemmin kokeiltu kuusen erikoismuodoilla.

Mikropistokasmenetelmän testaamisen taustalla puolestaan ovat Metlassa vuonna 2013 tehdyt alustavat kokeet. Näissä kokeissa testattiin julkaistujen seetri koetulosten (Renau-Morata, Nebauer, Sales, Allainguillaume, Caligari & Segura 2005 ja Piola & Rohr 1996) pohjalta mahdollisuutta aloittaa organogeneettisiä kuusen erikoismuotoviljelmää juuri puhjenneista versonkärjistä. Aloitukset tehtiin hormonnittomalle ja neljälle eri sytokiniini-määriä sisältävälle alustalle ja tarkoituksena oli, että versoissa olevat silmut saataisiin kehittymään ja venymään uusiksi versoiksi, jotka voitaisiin juurruttaa. Kokeilussa selvisi, että kuusen tuoreiden versonkärkien

pintasterilointi onnistuu paremmin vetyperoksidilla kuin etanolilla, mutta vaikeutuu mitä pidemmälle kesä etenee. Kasvualustaan laitettun sytokiniinin havaittiin aiheuttavan kalluksen muodostumista, eivätkä silmut puhjenneet, kuten tapahtui hormonittomalla alustalla. Näiden tulosten pohjalta päätettiin seuraavana keväänä (2014) kokeilla suoraa mikropistokaslisyästä, jossa juurrutuksen kohteena ovat in vitro -olosuhteissa hormonittomalla alustalla puhjenneet ja venytetyt tuoreet versot.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Työn tilaaja

Tämän opinnäytetyön tilaaja on Metla, Punkaharjun yksikkö ja työn käytännön osuus suoritettiin siellä keväällä 2014. Meneillään oli Euroopan aluekehitysrahaston rahoittama hanke ”Kasvullinen lisäys – osaamista ja teknologiaa biotalouden tueksi”, yhteistyössä Taimityöllä Oy:n ja Itä-Suomen yliopiston kanssa. Metlassa oli käynnissä pienempiä hankkeita ja kokeita, joihin tämä opinnäytetyö lukeutuu.

3.2 Genotyypit

Aineistona opinnäytetyössä on 6 kuusen koristeellista erikoismuotoa. Viisi niistä kasvaa vartteina Punkaharjun lisäystarhassa. Oksa-aineisto tähän työhön on kerätty lisäystarhan lisäksi tuulenpesäkuusen kokeesta, josta oli kaksi koe-erää. Alla on esitelty kaikki seitsemän tässä kokeessa mukana ollutta kuusen erikoismuotoa.



Kuva 3 Tuulenpesäkuusi (*Picea abies f. globosa*), klooni E11437 kokeessa Punkaharjulla on oksa-aineiston keräyspuu. Lohjalta peräisin olevan tuulenpesäkuusen siemenistä kasvanut puu. Kylvövuosi 1956, istutettu kokeeseen Punkaharjulle 1962, puun korkeus oli v.2013 2,9 m. Kuva: Teijo Nikkanen



Kuva 4 Tuulenpesäkuusi (*Picea abies f. globosa*), kantapuu klooni E11387 kokeessa Punkaharjulla oksa-aineiston keräyspuu. Lohjalta peräisin olevan tuulenpesäkuusen siemenestä kasvanut puu. Kylvövuosi 1956, istutettu Punkaharjulle 1962, puun korkeus oli v. 2013 12,5 m. Kuva: Teijo Nikkanen



Kuva 5 Tuulenpesäkuusi (*Picea abies* f. *globosa*), Punkaharjun lisäystarhassa. Oksa-aineisto kerättiin näistä 6-vuotiaista vartteista. Kuva: Saija Alho



Kuva 6 ”Kumopatakuusi” Kuusen erikoismuoto kokoelmassa Pelkolassa Imatralalla. Tohmajärveltä peräisin olevasta emupuusta vartettu nuori taimi. Kumopatakuusi ei tee latvaa vaan oksat lamoavat alaspäin. Kuvassa kantapuu K1487, lähes 50 vuotta vanha varte. Aineisto on kerätty tämän kloonin Punkaharjulla kasvavista 6-vuotiaista vartteista. Kuva: Teijo Nikkanen



Kuva 7 Pöytäkuusi (*Picea abies f. tabulaeformis*) ”Tapion pöytä” (E2165) Punnkaharjulla. Kuvassa on noin 20 vuotta vanha varte. Aineisto on kerätty lisäystarhan vartteista. Tältä erikoismuodolta puuttuu ylöspäin kasvava pääranka. Kuva: Teijo Nikkanen



Kuva 8 Kartiokuusi (*Picea abies f. pyramidata*) ”Pelkola” (K359) Haapastensyrjässä Lopella. Tämä koristepuulajikkeeksi ’Pelkola’ kuvattu (Nikkanen, T. 2014: kartiokuusesta koristepuulajike, *Sorbifolia* 45(4): 175-176) erikoismuoto sopii hyvin sekä viherrakentamiseen, että joulupuuksi. Sen latvus on tiheäöksäinen ja säännöllisen kaartiomainen. Kuva: Teijo Nikkanen



Kuva 9 Kultasurukuusi (E11405) on syntynyt surukuusten risteytyskokeessa. Kokeessa syntyneitä taimia on lisätty kasvullisesti pistokkaina. Tällä genotyypillä ei ole tieteellistä nimeä. Kultakuusella (*Picea abies f. aurea*) lehtivihreän kehittyminen on jostain syystä viivästynyt. Keväällä puhkeavat kerkät ovat ensin vaalean- tai kullankeltaiset ja muuttuvat kasvukauden aikana vähitellen vihreiksi. Surukuusi (*Picea abies f. pendula*) kuusen kapealattainen muoto ja sen oksat riippuvat alaspäin rungon myötäisesti. Kuvassa 10 on 6-vuotias kultasurukuusen varte Kuva: Teijo Nikkanen

3.3 Lisäysmenetelmät

Menetelminä ovat silmustaminen, joka tapahtui Punkaharjun kasvihuoneella ja in vitro -pistokaslisyys, joka tehtiin Punkaharjun laboratoriossa. Silmustamisessa käytettiin kaksia, eri fysiologisessa vaiheessa olleita silmuja. In vitro -lisäyksessä, kolmen eri fysiologisen vaiheen, silmuja. Jokaisesta genotyypistä käytettiin n. 40 silmua silmustuksessa ja n. 60 silmua in vitro -lisäyksessä.

3.3.1 Silmustaminen

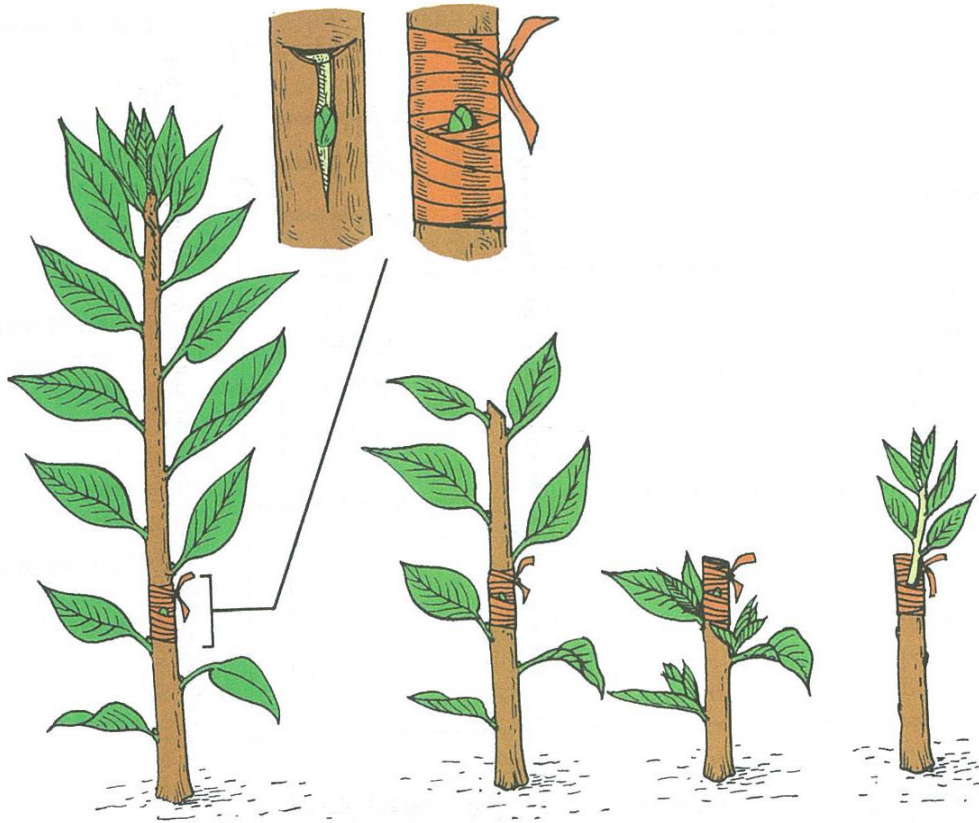
Silmustaminen tehtiin Metlan taimiston kasvihuoneella. Ensimmäinen silmustuserä täysin lepotilaisista silmuista tehtiin 28.4.–5.5.2014 välisenä aikana. Silmumateriaali oli kerätty jo 3.4. ja säilytetty +2 °C asteen kylmiössä. Jokaisesta genotyypistä tehtiin 20 silmustusta metsäkuusen kaksivuotiaisiin perusrunkoihin (jotka oli kasvatettu Metsätyllilällä Mäntyharjulla). Yhteensä siis 140 silmustusta.

Toinen silmustuserä tehtiin 12.5.–14.5.2014 välisenä aikana. Silmumateriaali kerättiin 12.5. jolloin silmut olivat jo hieman kasvaneet edellisiin verrattuna. Toinen silmustuserä oli määrältään samanlainen kuin ensimmäinen eli 140 silmustusta. Kaiken kaikkiaan silmusteita kertyi 280 kpl.



Kuva 10. Silmustus tehtiin metsäkuusen perusrungon latvaan.

Silmustamisessa siirrettävä silmu leikattiin irti niin, että silmun yläpuolelle jäi noin 1 cm kaistale kuorta ja alapuolelle noin 3 cm kaistale kuorta. Perusrunkoon tehtiin T-viilto, kuorta raotettiin varovasti ja silmu ujutettiin viillosta syntyneeseen ”taskuun”. Lopuksi haava sidottiin koko pituudeltaan kumilangalla napakasti, muttei liian tiukkaan. Silmustus on kuvattuna kuvissa 10 ja 11. Silmustuksen jälkeen perusrungot istutettiin lokerikkoon, niin että jokainen genotyyppi tuli omaan lokerikkoonsa. Uutta turvetta laitettiin, sekä taimipaakkujen alle, että päälle.



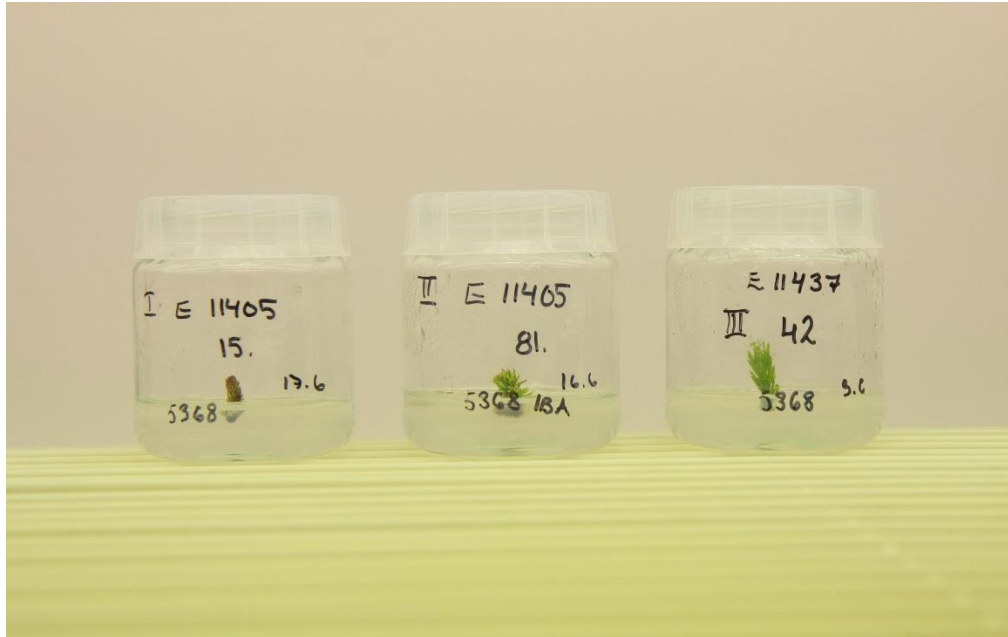
Kuva 11 on piirretty kirjasta Hartmann ym. (2014). Kuvassa on havainnollistettu silmustuksen teko.

Muutama päivä silmustamisen jälkeen, perusrunkojen latvaa typistettiin kasvuvoiman ohjaamiseksi uusiin silmuihin ja kolme viikkoa silmustuksen jälkeen latva leikattiin kokonaan pois uuden silmun yläpuolelta versomisen edistämiseksi. Taimien edistymistä ja hyvinvointia seurattiin silmämääräisesti.

Vuonna 2015 silmustamisessa käytettiin hieman erilaista menetelmää eli silmuvarte-menetelmää. Tästä kertoo tarkemmin Jörgen Hajek, 2009. Siinä pelkän silmun sijaan siirrettiin silmun mukana siivu verson puuainesta perusrunkoon. Silmuvartteita tehtiin kahdessa erässä, seitsemästä genotyypistä eli $2 \times 20 \times 7 = 280$. Ensimmäinen erä tehtiin 5.–6.5.2015 ja toinen erä 11.–15.5.2015.

3.3.2 Mikropistokkaat

In vitro -pistokkaat tehtiin Punkaharjun laboratoriossa, kolmessa erässä. Jokaisesta genotyypistä tehtiin noin 20 mikropistokasta/kerta. Ensimmäinen erä täysin lepotilaisista silmuista tehtiin 16.–25.4.2014. Silmumateriaali oli kerätty emopuista 3.4.2014. Toinen mikropistokaserä tehtiin 16.–21.5.2014. Silmumateriaali kerättiin 12.5.2014 (eli silmut jo hieman turvonneet). Kolmas mikropistokaserä tehtiin 26.–28.5.2014. Silmumateriaali kerättiin 26.5.2014 (osa silmuista auenneita).



Kuva 12. Kuvassa on yksi pistokas jokaisesta mikropistokaserästä kesäkuussa kuvattuna. Kuva: Tuija Aronen

Mikropistokaskokeisiin kerättiin emopuista oksankärkiä pussiin, mukaan laitettiin märkiä paperikäsipyyhkeitä (etteivät silmut kuivu), pussi suljettiin ja merkittiin (genotyyppi ja keräyspäivä). Pussit säilytettiin +2 °C asteen kylmiössä, etteivät silmut lähtisi kehittymään.

Versonkärjet leikattiin oksista irti niin, että mukana oli silmujen sekä niistä kehittyvien uusien versojen lisäksi pieni pätkä edellisen vuoden versoa. Versossa olevat neulaset leikattiin pois, mutta niin ettei verson kuori vaurioitunut. Versonkärjet steriloidtiin 10 % vetyperoksidi-liuoksessa 2h-yön yli. Steriloinnin jälkeen silmuista poistettiin aseptisesti silmuuomut ja edellisen vuoden versosta irti leikattu silmu / kehittyvä uusi verso laitettiin mitattuna steriilille kasvualustalle (aikaisemmat laitettiin petrimaljoille ja myöhemmät purkkeihin tai koeputkiin kuva 12). Siirrostus uudelle alustalle tehtiin noin kolmen viikon välein. Neljä viikkoa on ehdoton maksimi, koska ravinteet hupenevat ja pistokkaiden erittämät fenolit (fenoli on myrkyllinen alkoholi, jota kasvit erittävät torjuakseen eläimiä) saattavat aiheuttaa pistokkaan kuoleman (Haapala ja Niskanen, 1992). Kolmas siirrostus tehtiin alustalle johon on lisätty juurrutushormoni (5 mg/l syntetisistä aukiinia, indolivoihappoa IBA). Tavoitteena oli saada versonkärjet ensin venymään ja sitten kasvattamaan juuria juurrutus-alustalla.

Mikropistokkaiden kasvua seurattiin mittaamalla pistokkaiden pituus aina siirrostuksen yhteydessä ja pistokkaiden hyvinvointia havainnoitiin silmämääräisesti.

Alustat; hormoniton WPM, jossa 30 g/l sakkaroosia, pH 5.8, Plant agar S1000 6 g/l ja WPM, jossa 5 mg/l IBA, 30 g/l sakkaroosia, pH 5.8, Phytigel 6 g/l. Hormonittoman alustan resepti on LIITE 1.

In vitro-työskentelyn laitteista ja käytännteistä kerrotaan tarkemmin kirjassa Haapala ja Niskanen, 1992, Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys.

4 TULOKSET

4.1 Silmustus

4.1.1 Tulokset 2014

Silmustuskokeissa 2014 silmut lähtivät ensin turpoamaan hieman, vaan eivät koskaan auenneet (kuva 13). Näin ollen myös silmustuksessa jäätiin nollatuloksille.



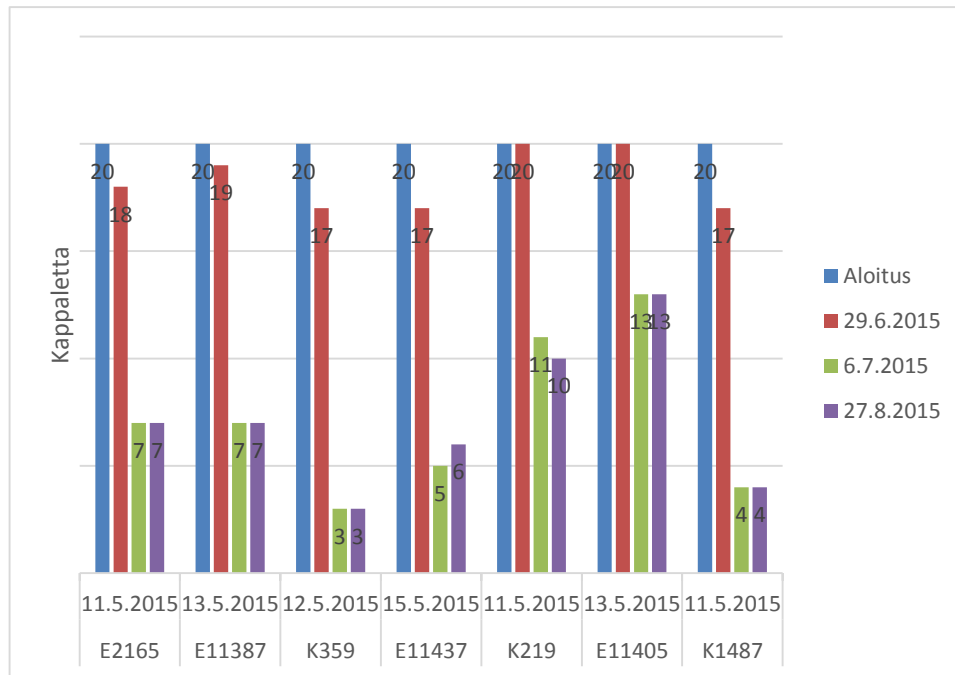
Kuva 13. Silmustetut metsäkuusen perusrungot keväällä 2014.

4.1.2 Tulokset 2015

Silmuvartetekniikalla päästiin noin 30 % tuloksiin (kuvat 14 ja 15).



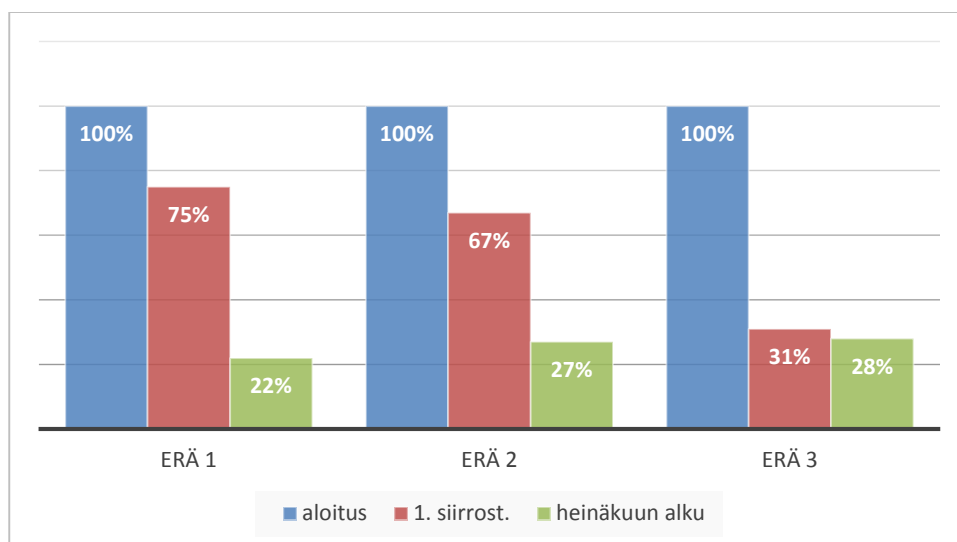
Kuva 14. Silmuvartteiden ensimmäisen erän tilanne väli-inventaariossa elokuussa 2015. Jokaisesta genotyypistä tehtiin 20 silmuvartetta ja lila palkki kuvaa tilannetta elokuussa.



Kuva 15. Silmuvartteiden toisen erän tilanne väli-inventaariossa elokuussa 2015. Myös toisessa erässä, jokaisesta genotyypistä tehtiin 20 silmuvartetta.

4.2 Mikropistokkaat

Mikropistokkaista suuri osa menetettiin home-kontaminaatioille. Silmuihin/versoihin on todennäköisesti jäänyt itiöitä, jotka lähtevät herkästi kasvamaan sokeri- ja ravinnepitoisella kasvualustalla. Toinen yleinen kuolinsyy oli kuivuminen. Siihen syynä saattoi olla liian pitkä sterilointiaika. Kuvassa 16, korkein pylväs kuvaa jokaisen erän aloitustilannetta, toinen pylväs tilannetta ensimmäisessä siirrostuksessa ja kolmas pylväs tilannetta heinäkuussa.

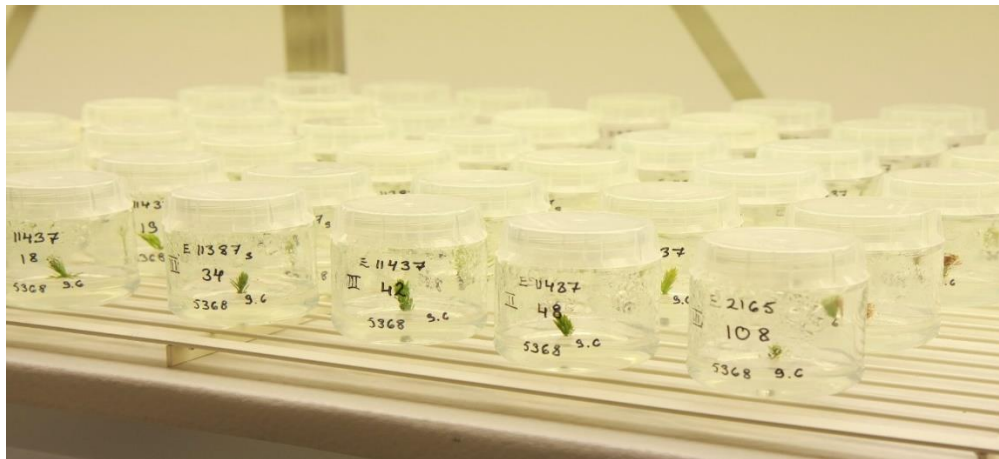


Kuva 16

Kuvassa metsäkuusen erikoismuotojen mikropistokkaiden kuolleisuus tutkimusaineistossa prosentteina keväällä 2014 METLA, Punkaharju.

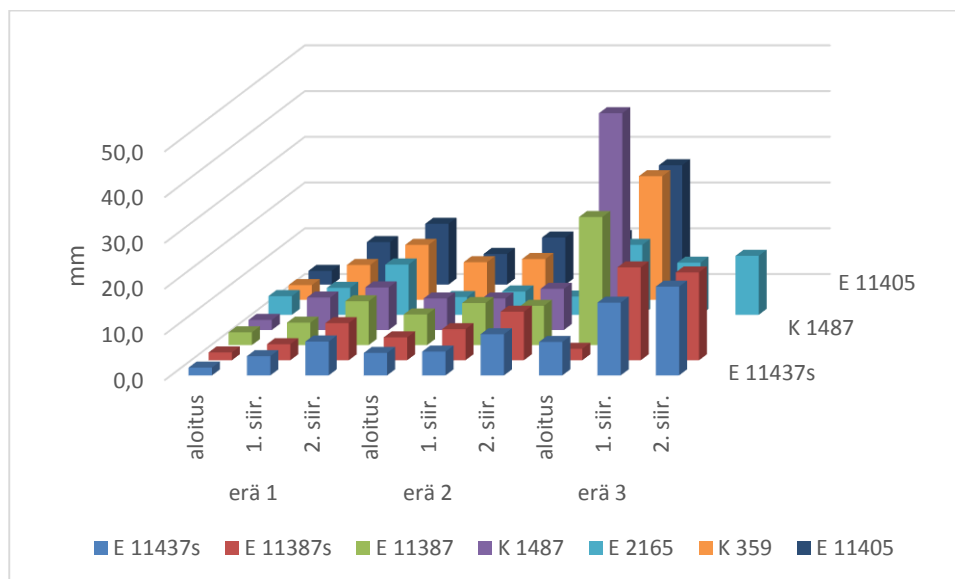
Kolmannen erän erilaisuus johtuu siitä, että silmujen puhkeaminen oli alkanut eli sterilointiaika oli lyhempi kuin muissa erissä, joten home-kontaminaatioita oli enemmän. Kaikista mikropistokkaista menetettiin 74 % jo ensimmäisten viikkojen aikana. Kuolleista 32 % homehtui ja loput eli 68 % kuivui.

Ensimmäisestä erästä juurrutuslustralle siirrostettiin 6 pistokasta. Toisesta erästä juurrutuslustralle siirrostettiin 10 pistokasta. Kolmas erä tehtiin suoraan juurrutuslustralle pistokkaiden suuren koon takia (kuva 17).



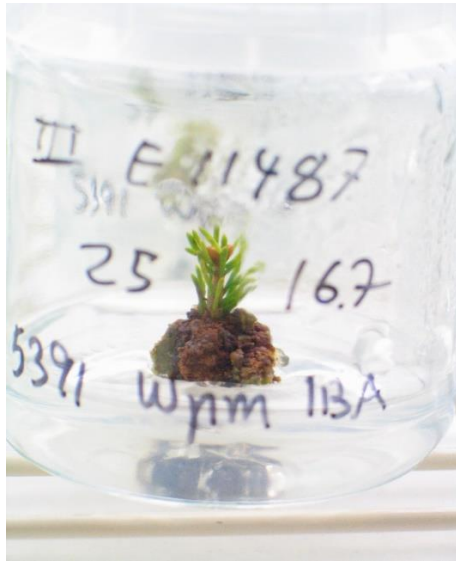
Kuva 17 Kolmannen mikropistokaserän taimia kasvatushuoneessa.

Pituuskasvu vaihteli erien ja yksilöiden välillä suuresti. Ensimmäisen erän pistokkaat venyivät keskimäärin 3-4 kertaisiksi aloituspituuteensa verrattuna. Toisen erän pistokkaat kasvoivat keskimäärin 1,5-2 kertaisiksi aloituspituuteensa verrattuna. Kolmannen erän kasvu oli heikointa, 1-2 mm – kaksinkertaiseksi aloituspituuteensa verrattuna. Eniten kasvaneet pistokkaat olivat hauraita ja usein katkesivat siirrostettaessa. Kuvassa 18 on kuvattuna mikropistokkaiden kasvu lasketuista keskiarvoista.



Kuva 18. Metsäkuusen erikoismuotojen mikropistokkaiden kasvu millimetreissä keväällä 2014 Punkaharjulla.

Yksikään pistokas ei kuitenkaan kasvattanut juuria. Joko mitään havaittavaa kasvua ei tapahtunut tai pistokkaan tyveen ilmaantui vaihtelevan muotoinen ja kokoinen kallussolukko-möykky (kuva 19), joten mikropistokaskokeet jäivät näin ollen nollatuloksille.



Kuvassa 19 on tuulenpesäkuusen mikropistokas juurrutusalustalla. Pistokas on kasvattanut kallussolukkoa juurten sijaan. Kuva: Tuija Aronen

Vuonna 2014 leikattujen mikropistokkaiden lisäksi viljelyssä oli myös 7 pistokasta edelliseltä vuodelta 2013. Nämä pistokkaat olivat peräisin alustavasta kokeesta, jossa testattiin kasvualustan kasvunsäätöiden/kasvihormonipitoisuuksien vaikutusta mikropistokkaiden kasvuun lähtöön. Hormoniton alusta todettiin parhaaksi ja joitakin sillä muodostuneita versoja pidettiin talven yli kylmäsäilytyksessä ja otettiin juurrutusalustalle 2014 keväällä. Myöskään nämä kylmäsäilytyksessä olleet versot eivät juurtuneet.

5 TULOSTEN TARKASTELUA

5.1 Silmustus

Silmustus T-viiltoon toteutettuna on todettu hyväksi kasvullisen lisäämisen keinoksi monilla puuvartisilla kasveilla, kuten hedelmäpuilla ja koristepuilla ja -pensaille, (Hartmann ym. 2014; Haapala ja Niskala 1992), mutta kuusella se ei ole toiminut. Syynä tähän on todennäköisesti se, ettei T-viiltoon siirrettyjen silmujen kasvaminen kiinni perusrunkoon onnistunut, joten siirretyt silmut jäivät ilman kuusella varren puuaineksen sisällä kulkevaa nestevirtausta eli kuivuivat. Turpoaminen lähti alkuun käyntiin silmussa itsessään varastoituna olevasta kasvuvoimasta, mutta se ei riittänyt edes silmujen avautumiseen asti. Silmujen

kiinnikasvaminen perusrunkoon olisi edellyttänyt silmusiirteen ja perusrungon ohuiden jälsikerrosten osumista kohdakkain, mikä t-viiltotekniikassa ei toteutunut.

Vuonna 2015, silmustamisen sijaan kokeiltiin silmuvarte - menetelmää. Silmuvartteista onnistui noin 30 %. Koska vartteessa oli mukana puuainesta ja sekä vartteen, että perusrungon jäljet ovat olleet kohdakkain, nestevirtaus ei katkenutkaan kokonaan ja silmu saattoi jatkaa kasvuaan. Aiemmin Ruotsissa metsänviljelyaineistolla tehdyissä silmuvartteissa onnistuminen on ollut yli 90 % (Hajek 2009). Klooneista parhaiten menestyivät K219 ja E11405 (kultapendula) ja heikoiten kloonit K359 (kartiokuusi). Syitä siihen että onnistumisprosentti oli verrattain alhainen, voi olla monia. Oliko hygienia tarpeeksi hyvä, oliko työn tekijän tieto/taito tarpeeksi korkea ja oliko ajoitus oikea ovat muun muassa kysymyksiä, joihin ei saatu vastauksia. Ensimmäisen erän onnistumisprosentti oli n. 21 % ja toisen n. 36 %. Erien välinen ero voi johtua joko silmuvartteiden teon ajankohdasta tai tekijän taitojen karttumisesta.

Erikoismuotojen lisääminen silmuvartetekniikalla on haastavampaa, kuin tavallisen metsänviljelyaineiston (Hajek 2009), koska erikoismuotojen silmut ovat tavallisia pienempiä, erikoismuotojen kasvu on hitaampaa ja hormonien sijainti erikoismuodoissa voi poiketa normaali kuusesta.

5.2 Mikropistokkaat

Monia kasveja saadaan laboratoriossa massalisättyä hyvin. Kasvinosat kasvavat ja versovat ja tuottavat juuria, eli käyttäytyvät juuri niin kuin oli toivottu. Se miksi kuusen erikoismuotojen kokeet sitten epäonnistuivat, saattoi johtua monesta tekijästä. Juurten muodostukseen mikropistokkailla on voinut vaikuttaa esimerkiksi pistokkaiden kunto ja säilytysaika, pistokkaiden emotaimien ikä, genotyyppi, lämpötila ja ravinteiden määrä kasvualustassa.

5.2.1 Sterilointi

Versonkärkien sterilointi tehtiin 10 % vetyperoksidiliuoksella, joka on Metlan omista testeissä todettu paremmaksi vaihtoehdoksi kuin etanoli. Koska kolmannen erän silmuvartemateriaali oli jo suurelta osin kerkkä-vaiheessa, ei sitä voitu steriloida kuin 2–3,5 tuntia. Pitempi sterilointiaika olisi tappanut ne. Lyhempi sterilointi johti siihen, että home-kontaminaatioita esiintyi enemmän. Ensimmäisen ja toisen erän silmuja sterilointiin 4 h–yön yli, joten homeita esiintyi vähemmän kuin kolmannessa erässä, mutta varsinkin ensimmäisen erän pistokkaita kuivui kuoliaaksi. Syynä kuivumiseen on voinut olla pitkä sterilointiaika.

5.2.2 Kasvualustat

Hormoniton WPM-kasvualusta on tutkittu ja monen puulajin solukkolisäyksessä hyväksi todettu (Haapala ja Niskanen 1992). Muita mahdollisia kasvualustoja olisivat voineet olla esim. paljon eri kasvilajeilla käytetty MS-alusta (Haapala ja Niskanen 1992) tai kuusen alkioalähtöisessä solukkoviljelyssä käytetty muunneltu Litvayn alusta tai DCR-alusta (Varis, Heiska & Aronen 2014) WPM-alustalla kuusen silmut kasvoivat pituutta vaihtelevasti, mutta sivuversoja ei muodostunut. Versomattomuus johtui luultavasti enemmän muista tekijöistä kuin alustan ravinnekoostumuksesta. Pistokkaat siirrettiin tai siis siirrotettiin uudelle alustalle kolmen viikon välein, ettei ravinteista tulisi puutetta. Sytokiniini-hormonia käytetään usein joko yksin tai yhdessä auksiinin kanssa versonmuodostuksen indusoimiseen puuvartisten kasvien solukkolisäyksessä (Haapala ja Niskanen 1992), mutta Metlan alustavien kokeiden mukaan sytokiniini aiheutti kuusen silmuissa/kehittyvissä versoissa kalluksen, ei sivuversojen muodostusta.

Juurrutushormonina oli IBA eli indolyyli-3-voihappo, joka on auksiini. Tässä kokeessa IBA lisättiin kasvualustaan mukaan, eli pistokas altistui sille jatkuvasti. IBA:n sopivuutta juurrutushormoniksi on tutkittu sitkakuusella, Iso-Britanniassa vuonna 1991 tehdyissä kokeissa (Selby, Kennedy & Harvey 1991). Siinä tutkijat altistivat pistokkaita hormonille eripituisissa jaksoissa ja saivat juurenmuodostusta aikaiseksi.

Punkaharjun laboratorion kasvatushuoneessa, kasvatusastiat laitettiin hyllyille joilla valoa oli riittävästi, muttei mahdollisuutta alalämpöön, josta olisi voinut olla mikropistokkaiden juurenmuodostukselle hyötyä. Suljetuissa astioissa lämpötila kohoaa kuitenkin liiankin korkeaksi. Mikrolokkereilla mitattuna suljetun kasvatusastian lämpötila on noin 10 °C korkeampi kuin kasvatushuoneen lämpötila. Kasvatushuoneen lämpötilaa pidettiin tasaisesti 20 asteessa, jolloin astioiden sisälämpötila oli noin 30 °C. Tämä on kuuselle liian korkea lämpötila, sillä kuusi viihtyy parhaiten 17–20 °C lämmössä. Tämä voi olla osasyynä juurtumisen epäonnistumiseen.

5.2.3 Mikropistokkaiden pituuskasvu

Ensimmäisen erän mikropistokkaiden pituuskasvu oli selvästi muita eriä parempi. Ensimmäinen erä tehtiin täysin lepotilaisista silmuista ja niiden alut olivat kaikkein pienimpiä. Tämän työn kokeiden perusteella lepotilaisten silmujen kasvukyky on parempi, kuin jo pidemmälle ehtineiden silmujen.

Kolmannen erän silmuista osa oli jo kerkkävaiheessa, eikä pituuskasvu ollut enää niin kiihkeää. Vaikka kasvu oli jo pitkällä, sivuversoja ei silti muodostu-

nut. Juurenmuodostuksen kannalta olisi parempi, etteivät versot olisi aktiivisessa pituuskasvussa, jolloin energia suuntautuu siihen. Siitä syystä aiemmin kerätyt silmut haluttiin ensin venyttää ja juurruttaa sitten. Myöhemmin kerätyt jo venyneet silmut laitettiin suoraan juurrutusalueelle, kun energiaa ei enää kuluu niin paljon venymiseen.

6 POHDINTAA

Vaikka silmuvarteista osa onnistuikin, ei tulos vielä vakuuta massatuotantoa ajatellen, vaan tekniikassa on selkeästi kehittämisen tarvetta. Ruotsissa metsänviljelyaineistolla (Hajek 2009) saavutetut tulokset (yli 90 % onnistuminen) antavat kuitenkin viitteitä siitä, että silmuvartetekniikka saattaa soveltua myös kuusen erikoismuotojen lisäämiseen. Tämä edellyttää kuitenkin ainakin silmuvarttamisen ajoituksen tarkempaa selvittämistä, sekä teknisen taidon kehittämistä ja saannon vertailua perinteisen varttamistekniikan kanssa. Tällöin nähdään, onko lisäysmateriaalin tarve merkittävästi pienempi kuin normaalisti vartettaessa. Silmuvartteet vievät joka tapauksessa aikaa ja kysyvät taitoa aivan kuten muukin varttamistyö.

In vitro -oloissa tehtävää mikropistokaslisäystä ei tulosten perusteella voi pitää kuusen erikoismuodoille soveltuvana lisäysmenetelmänä. Silmujen tai kehittyvien versojen pintasterilointia ei saatu tutkimuksessa toimimaan niin hyvin, ettei lisäysaineistosta olisi menetetty kontaminaatioiden takia merkittävää osuutta. Suurimmaksi ongelmaksi kuitenkin osoittautui se, etteivät mikropistokkaat juurtuneet. Tähän vaikuttaneita syitä lienee useita, joista merkittävimpiä lienee emopuiden korkea ikä ja toisaalta sopimattomat juurrutusolosuhteet kuten liian korkea lämpötila. Kuusen mikropistokastekniikan kehittämiseen ei näillä näkymin kannata panostaa lisäresursseja. Tärkeämpää olisi saada kasvulisten alkuiden tuotantoon perustuva kuusen solukkolisäys (Varis ym. 2014) toimimaan myös aikuisista puista peräisin olevasta lähtöaineistosta, esim. silmuista aloitettuna.

7 KIITOKSET

Esitän kiitokseni Luonnonvarakeskuksen Punkaharjun toimipisteelle työn tilauksesta. Tuija Aroselle asiantuntevasta ohjauksesta, Teijo Nikkaselle valokuvista, Paula Matikaiselle laboratoriotyön ohjauksesta ja Jouko Lehdolle silmustustyön ohjauksesta. Hämeen ammattikorkeakoulun Lepaan yksikölle, yliopettaja Arto Vuolteelle hyvistä neuvoista ja ohjauksesta.

LÄHTEET

- Aronen, T. 2011. Erikoismuotojen lisäysmenetelmät. Teoksessa: Nikkanen & Velling, Metsäpuiden erikoismuodot – Koristepuita viherrakentamiseen. Metsäkustannus, Keuruu 2011, sivut 93–117
- Fagerstedt K., Linden L., Santanen A. & Väinölä A. 2008. Kasvioppi, Helsinki, Edita
- Haapala T. ja Niskanen A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikro-lisäys, Helsinki, Valtion painatuskeskus
- Hajek J. 2009. luku Chip-budding and apical grafting – breeder’s tools s.34–38, Vegetative propagation of conifers for enhancing landscaping and tree breeding 2009, Metla Punkaharju
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. ja Geneve R.L. 2014. Hartmann & Kester’s Plant Propagation, kahdeksas painos, Pearson, Essex, GB
- Kasvullinen lisäys – osaamista ja teknologiaa biotalouden tueksi 2011–2014. [http:// www.metla.fi/hanke/7479/index.htm](http://www.metla.fi/hanke/7479/index.htm)
- MacDonald P. T. 2014. The manual of plant grafting, Timber press
- Metsäkuusi 2016. Wikipedia
- Nikkanen T., Aronen T. & Heiska S. 2012. Kuusikon kummajaisista kestäviä koristepuita pistokaslisäyksellä, Taimi uutiset nro 1, Metla
- Nikkanen T., Heiska S. & Aronen T. 2012. New ornamental conifers for harsh northern conditions through cutting propagation of special forms of Norway spruce, konferenssi “Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management” June 25-28, 2012. Brno, Czech Republic
- Nikkanen T. & Velling P. 2011. Metsäpuiden erikoismuodot – Koristepuita viherrakentamiseen, Keuruu, Metsäkustannus Oy
- Piola F. & Rohr R. 1996. A method to overcome seed and axillary bud dormancy to improve Cedrus libani micropropagation, Plant Tissue Culture and Biotechnology 2(4): 199–201
- Relve H. 1997. Puiden juurilla, Jyväskylä, Gummerus
- Renau-Morata B., Nebauer S. G., Sales E., Allainguillaume J., Caligari P. & Segura J. 2005. Genetic Diversity and Structure of Natural and Managed Populations of Cedrus atlantica (Pinaceae) Assessed Using Random Amplified Polymorphic DNA, American Journal of Botany, Vol. 92, No. 5 (May, 2005) pp. 875–884

Selby C., Kennedy S.J. & Harvey B.M.R. 1991. Adventitious root formation in hopycotyl cuttings of *Picea sitchensis*, *New Phytologist*, vol. 120, Issue 4, April 1992, Pages 453–457

Varis, S., Heiska, S. & Aronen, T. 2014. Kuusen solukkolisäys. Metlan työraportteja / Working Papers of the Finnish Forest Research Institute 310. 50 s. ISBN 978-951-40-2500-6 (pdf), ISBN 978-951-40-2501-3 (paperback). Saatavissa: <http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/2014/mwp310.htm>.

MENETELMÄOHJE Liite 1
Ohjeen tunnus: PULMU600

Sivu: 11(10)

Versio: 1.0

Päivämäärä:

22.02.2006

Metsäntutkimuslaitos

Laatija(t): AV, TN

Punkaharjun toimintayksikkö/laboratorio

Hyväksyjä:

Kuusen organogeneesi
WPM hormoniton

_____	WPM-NO ₃ -stokki	20 ml	_____
_____	WPM-SO ₄ -stokki	20 ml	_____
_____	NaFe-EDTA-stokki	10 ml	_____
_____	WPM-Cl ₂ -stokki	5 ml	_____
_____	DCR-P + B + Mo-stokki	5 ml	_____
_____	WPM-Vitamiinit + Glysiini- stokki	5 ml	_____
	Sakkaroosi	0,09 M = 30 g	_____
	pH	5.8	
	Ad. Maxima vesi	1000 ml	_____
	Plant-agar S1000 (Italian Agar)	6 g	_____

Kas-
vualustojen teosta ja niiden sisältämistä aineista kerrotaan teoksessa Haapala ja Niskanen,
1992, Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys