

KRYOSÄILYTYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN PENSASMUSTIKALLE

Heidi Pantsu

Opinnäytetyö
Marraskuu 2010

Laboratorioala
Tekniikan ja liikenteen ala





Tekijä(t) PANTSU, Heidi	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 12.11.2010
	Sivumäärä 63	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (x)
Työn nimi KRYOSÄILYTYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN PENSASMUSTIKALLE		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) VÄRTÖ-NIEMI, Merja		
Toimeksiantaja(t) MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, vanhempi tutkija NUKARI, Anna, tutkija		
Tiivistelmä <p>Työn tavoitteena oli luoda toimiva kryosäilytysmenetelmä pensasmustikoiden (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) silmuille. Opinnäytetyön toimeksiantaja oli Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus eli MTT ja työ toteutettiin MTT:n tiloissa Laukaan toimipisteessä. Koska pensasmustikalle ei ollut aiemmin testattu MTT:lla mitään kryosäilytysmenetelmää, päätettiin sille kokeilla muunneltua pisara-vitrifikaatiomenetelmää, joka on MTT:lla käytössä esimerkiksi mansikalla ja vadelmalla. Menetelmän kehitystä varten valittiin kolme lajiketta, joiden <i>in vitro</i> -viljelmistä eristettyjä silmuja käytettiin kokeissa. Optimoitavia muuttujia olivat silmun tyyppi ja koko, silmujen eristämispäivä, aktiivihieien käyttö esikäsitteilyalustalla ja esikäsitteilyn välttämättömyys, sokerikäsitteilyt sekä PVS2 (plant vitrification solution 2) -käsitteilyaika.</p> <p>Työn aikana silmuja eristettiin sekä maanantaisin että perjantaisin, yhteensä noin 1200 kappaletta. Hankasilmujen pienen koon vuoksi päädyttiin eristämään vain kärkisilmuja, jotka olivat kooltaan 0,5–1,0 mm. Kokeet aloitettiin optimoimalla PVS2-käsitteilyaika kahden koe-erän avulla. Koe-erissä testattiin neljää eri PVS2-käsitteilyaikaa (30–60 min) kahdella lajikkeella. Parhaisiin tuloksiin molemmilla lajikkeilla päästiin 60 minuutin käsitteilyajalla. Aktiivihieiltä sisältävän ja aktiivihielettömän esikäsitteilyn eroja ja esikäsitteilyn välttämättömyyttä testattiin ja tulokseksi saatiin, että pensasmustikoiden silmut kannattaa eristää perjantaina ja esikäsitellä kolmen vuorokauden ajan aktiivihieiltä sisältämättömällä sakkaroosipohjaisella esikäsitteilyalustalla. Lisäksi ne hyötyvät kasvavasta sokerikon-sentraatiosta eli ne tulisi käsitellä vuorokauden ajan kullakin kolmesta sakkaroosipohjaisesta soke-rialustasta, joiden konsentraatiot ovat 0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M.</p> <p>Työn aikana ongelmiksi muodostuivat versoontuneiden silmujen luokitus, jossa ei ollut huomioitu joidenkin lajikkeiden punasävytteisyyttä, sekä kalluksen muodostus. Täydentävät kokeet olisivat tarpeen, mutta tulokseksi saatiin kuitenkin menetelmä, jolla pensasmustikan silmut saadaan kryosäilytettyä.</p>		
Avainsanat (asiasanat) Pensasmustikka, mikrolisäys, kryosäilytys, vitrifikaatio, geenipankki, kallus		
Muut tiedot		



Author(s) PANTSU, Heidi	Type of publication Bachelor's / Master's Thesis	Date 12/11/2010
	Pages 63	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (x)
Title DEVELOPMENT OF A CRYOPRESERVATION METHOD FOR HIGHBUSH BLUEBERRIES		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) VÄRTÖ-NIEMI, Merja		
Assigned by MTT Plant Production Research, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, Senior Research Scientist NUKARI, Anna, Research Scientist		
Abstract <p>The goal of this research was to develop an operational cryopreservation method for highbush blueberries (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.). This thesis was executed for MTT Agrifood Research Finland at Laukaa. Modified droplet vitrification method was used because MTT had not tested any methods for cryopreserving highbush blueberries before and they already had this method in use for strawberries and raspberries. For the development of this method three cultivars of highbush blueberries were chosen and buds were isolated from <i>in vitro</i> -grown cultures of these cultivars. The variables that had to be optimized were the bud type and size, the isolation day of the buds, the use of active charcoal in the pretreatment and the necessity of pretreatment, sugar treatments and the PVS2 (plant vitrification solution 2) treatment time.</p> <p>During the research buds were isolated on both Mondays and Fridays, altogether about 1200 pieces. Because of the small size of axillary buds only apical buds, sized 0.5-1.0 mm, were isolated. The first variable to be tested was the PVS2-time. It was tested using four different times (30-60 min) and two blueberry cultivars. Both cultivars gave the best result with 60 minutes in PVS2. The pretreatment with and without active charcoal was studied as was the necessity of the pretreatment. The result was that buds should be isolated on Friday and pretreated for three days without active charcoal on a sucrose-based culture medium. They also benefit from increasing sugar concentration which means they should be treated with the 0.25 M, 0.50 M and 0.75 M sucrose-based culture medium for one day each.</p> <p>There were some problems during the research. The classification of sprouted buds did not take into account the natural redness of the highbush blueberries. Buds were also growing a lot of callus. Complementary tests are necessary but a functional method was created and the buds of highbush blueberries can now be cryopreserved.</p>		
Keywords Highbush blueberry, micropropagation, cryopreservation, vitrification, gene bank, callus		
Miscellaneous		

Blueberries

Upon the hills of Garlingtown
Beneath the summer sky,
In many pleasant pastures
On sunny slopes and high,
Their skins abloom with dusty blue,
Asleep, the berries lie.

And all the lads of Garlingtown,
And all the lasses too,
Still climb the tranquil hillsides,
A merry barefoot crew;
Still homeward plod with unfilled pails
And mouths of berry blue.

And all the birds of Garlingtown,
When flocking back to nest,
Remember well the patches,
Where berries are the best;
They pick the ripest ones at dawn,
And leave the lads the rest.

Upon the hills of Garlingtown,
When berry-time was o'er,
I looked into the sunset,
And saw an open door,
And from the hills of Garlingtown
I went and came no more.

Frank Prentice Rand

SISÄLTÖ

KÄSITTEET	5
1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT	6
2 PENSASMUSTIKKA	7
2.1 Pensasmustikka kasvina	7
2.2 Työssä käytetyt lajikkeet	9
2.2.1 'North Blue'	9
2.2.2 'Aino'	10
2.2.3 'Saani'	10
2.3 Pensasmustikoiden kasvitaudit	11
2.4 Lehtien pigmentit ja punasävytteisyys mustikoilla	12
3 KASVIEN LISÄÄMINEN	13
3.1 Mikrolisäys	13
3.2 Kasvatusalustat	14
3.3 Kalluksen muodostuminen	16
4 KRYOSÄILYTYS	17
4.1 Kylmänkestävyys luonnossa	17
4.2 Kasvigeenivarojen säilytys	18
4.3 Kryosäilytyksen historia	19
4.4 Menetelmät	19
4.4.1 Kryosäilytyksen perusteet	19
4.4.2 Kontrolloitu asteittainen jäähdytys	20
4.4.3 Kapselointi-dehydraatio	21
4.4.4 Vitrifikaatiomenetelmät	22
5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	24
5.1 Opinnäytetyön rajaus	24
5.2 Alkuvalmistelut	25

	2
5.3 Silmujen eristäminen	26
5.4 Esikäsitely	27
5.5 Vitrifikaatiokäsittelyt ja pakastus	28
5.6 Sulatus.....	31
5.7 Havainnointi.....	32
6 TULOKSET	34
6.1 Tulokset lajikkeittain	34
6.2 Versoontuneiden silmujen havainnointien vertailu	36
6.3 PVS2-käsittelyajan määrittäminen	37
6.3.1 PVS2-käsittelyaika Saani-lajikkeella.....	37
6.3.2 PVS2-käsittelyaika North Blue -lajikkeella	38
6.4 Esikäsitelyiden merkitys	39
6.4.1 Toipumisalustan käyttö ja aktiivihiilen merkitys siinä	39
6.4.2 Sokerikäsitelyiden vaikutus	42
7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	46
7.1 Tuloksien tarkastelu.....	46
7.1.1 Yleiset huomiot tuloksista ja lajikkeiden väliset erot	46
7.1.2 PVS2-käsittelyajan testaaminen	46
7.1.3 MS-maljan käyttö ja aktiivihiilen merkitys.....	48
7.1.4 Sokerikäsitelyjen arviointi	49
7.1.5 Versoontuneiden silmujen havainnointiviikon merkitys	50
7.2 Työn aikana ilmenneet ongelmat	50
7.2.1 Versoontuneiden silmujen luokitus	50
7.2.2 Kallussolukon kasvaminen.....	51
7.2.3 Kosteuden tiivistyminen	52
7.2.4 Toipumisalustojen vertailukelpoisuus	53
7.3 Menetelmäsuositus	54
7.4 Suositeltavat jatkotutkimukset	55
LÄHTEET	56
LIITTEET	58

Liite 1. Työn aikana käytetyt liuokset ja kasvatusalustat	58
Liite 2. Kokeiden tulokset taulukoituna	61

KUVIOT

KUVIO 1. Pensasmustikan marjoja	9
KUVIO 2. Antosyaanin molekyyli rakenne, kun pH on alle 3.....	13
KUVIO 3. Elävää kallussolukkoa kasvuston reunoilla ja kuollutta keskemällä.	16
KUVIO 4. Kasvigeenivarojen säilytystavat	18
KUVIO 5. Kapseloituja silmuja.....	21
KUVIO 6. Työssä käytetyt pensasmustikalajikkeet mikropistokkaina.....	25
KUVIO 7. Silmun eristäminen	27
KUVIO 8. Eristetyt silmut.....	28
KUVIO 9. Silmut odottamassa siirtoa LS-liuoksesta PVS2-liukseen	29
KUVIO 10. Silmut pisaran sisällä foliosuikaleilla	30
KUVIO 11. Foliosuikaleiden siirtäminen kryoputkiin.....	30
KUVIO 12. Sakkaroosiliuoksen pipetoiminen kryoputkeen.....	31
KUVIO 13. Folioon kääriminen ja valmis paketti.....	32
KUVIO 14. Silmuesimerkkejä.....	32
KUVIO 15. Versoontuneiden silmujen havainnointi.....	33
KUVIO 16. Silmujen elpyminen ja versominen lajikkeittain	35
KUVIO 17. Versoontuneiden silmujen havainnoinnit neljän viikon välein	37
KUVIO 18. 'Saenin' elpyminen ja versoontuminen PVS2-käsittelyajan muuttuessa. 38	
KUVIO 19. 'North Bluen' elpyminen ja versoontuminen PVS2-käsittelyajan muuttuessa	39
KUVIO 20. Aktiivihiltä sisältävän (AC+) ja normaalin (AC-) MS-maljan vertailua 'North Bluella' ja 'Ainolla'	40
KUVIO 21. Aktiivihiltä sisältävän (AC+) ja normaalin (AC-) MS-maljan sekä kahden sokerikäsittelyn vertailua 'Saanilla'	41
KUVIO 22. Esikäsittelyn (aktiivihiletön malja) vaikutus tuloksiin 'North Bluella' ja 'Ainolla'	42
KUVIO 23. 'Saenin' elpyminen ja versoontuminen erilaisilla sokerikäsittelyillä aktiivihiltä sisältäneen esikäsittelyn jälkeen.....	43

KUVIO 24. 'Ainon' elpyminen ja versoontuminen erilaisilla sokerikäsittelyillä aktiivihiltä sisältämättömän esikäsittelyn jälkeen ja ilman	44
KUVIO 25. Kahden sokerikäsittelyn vertailua ilman aktiivihiltä 'North Bluella' ja 'Ainolla'	45
KUVIO 26. Esimerkkejä versoontuneista silmuista	51
KUVIO 27. Käsitellyt silmut kasvoivat runsaasti kallusta.....	52
KUVIO 28. Kosteuden tiivistyminen silmujen ympärille sulatuksen jälkeen	53

KÄSITTEET

+ LN	koe, jossa silmut käyvät läpi vitrifikaatiokäsittelyn ja ne käsitellään nestemäisellä tyellä
-LN	koe, jossa silmut käyvät läpi vitrifikaatiokäsittelyn, mutta niitä ei käsitellä nestemäisellä tyellä
AC	aktiivihiihi (active charcoal)
aseptinen	puhdas, ei sisällä tartunnanaiheuttajia
BAP	6-bentsyyliaminopuriini (6-benzylaminopurine), kasvihormoni
diffuusio	ilmiö, jossa molekyylit pyrkivät siirtymään suuremmasta pitoisuudesta pienempään tasoittaen pitoisuuseroja
<i>ex situ</i> -säilytys	kasvin säilytys tai kasvatus muualla kuin sen luonnonmukaisessa kasvuympäristössä
fenotyyppi	yksilön ilmiö: kaikkien havaittavien ominaisuuksien kokonaisuus, riippuu ympäristön ja geenien vuorovaikutuksesta
HS	hankasilmu
IBA	indoli-3-voihappo (indole-3-butyric acid), kasvihormoni
<i>in situ</i> -säilytys	kasvin säilytys tai kasvatus sen luonnonmukaisessa kasvuympäristössä tai ympäristöissä, joissa se on kehittänyt erikoisominaisuutensa
<i>in vitro</i>	”lasissa”, viljeltäessä <i>in vitro</i> kasvi kasvatetaan lasipurkissa steriileissä olosuhteissa
kallus	kasvin haavasolukkoa, joka ei ole vielä erilaistunut
KS	kärkisilmu
LN	nestemäinen typpi (liquid nitrogen)
LS	1. vitrifikaatioliuos (loading solution)
meristeemi	kasvin normaalia erilaistumatonta kasvusolukkoa
MS-alusta	kasvatusalusta, jonka kehittivät Murashige ja Skoog
PVS2	2.vitrifikaatioliuos (plant vitrification solution 2)

1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT

Opinnäytetyöni toimeksiantaja oli Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus eli MTT. Se on maa- ja metsätalousministeriön alaisuudessa toimiva laitos, joka on alallaan Suomen johtavia tutkimuskeskuksia. Tutkimus painottuu pääasiassa maatalouteen ja maatalousympäristöön sekä elintarvikkeisiin. MTT:n neljätoista toimipaikkaa sijoituvat eri paikkakunnille ympäri Suomea, ja sen päätoimipaikka on Jokioisissa. Kaikkiaan eri toimipaikoilla työskentelee noin 850 työntekijää (Innovaatioita uusiutuvista luonnonvaroista 2009). MTT:n toiminta voidaan jakaa kuuteen pääasialliseen tutkimusalaan, joita ovat biotekniikka- ja elintarviketutkimus, kotieläintuotannon tutkimus, kasvintuotannon tutkimus, maataloustutkimus, ympäristötutkimus sekä teknologiatutkimus. (Vuosikertomus 2009, 6–7) Laukaan toimipiste kuuluu kasvintuotannon tutkimuksen piiriin, ja sen vastuualueita ovat varmennetun taimituotannon menetelmäkehitys, ydinkasviaineiston puhdistus, ydinkasvipankki, taimien tuotantomenetelmät sekä geenivarojen kryosäilytys. (MTT Laukaa 2009)

Työn tavoitteena oli luoda pensasmustikan silmuille lajikohtainen kryosäilytysmenetelmä, joka toimisi mahdollisimman hyvin kaikilla testaukseen valituilla lajikkeilla. Lisäksi toiveena oli, että menetelmän avulla voitaisiin jatkossa säilyttää pensasmustikoita pitkäaikaissäilytyksessä. Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeissa vuodelta 2006 pensasmustikka mainitaan yhtenä sopivaa kryosäilytysmenetelmää odottavista kasveista. Lisäksi ohjeissa on alustavasti ehdotettu pitkäaikaissäilytettäväksi muun muassa lajikkeita 'Aino', 'Alvar', 'North Country' ja 'North Blue' (Aaltonen, Antonius, Hietaranta, Karhu, Kinnanen, Kivijärvi, Nukari, Sahramaa, Tahvonen & Uosukainen 2006, 3).

Kryosäilytykseen testattaviksi lajikkeiksi valikoituivat 'North Blue', 'Aino' ja 'Saani'. 'North Blue' on ollut jo pitkään markkinoilla, ja sillä on pitkä historia myös Pohjois-Amerikassa, kun taas kaksi muuta lajiketta edustavat suomalaista jalostustyötä. 'Ainon' käyttäminen testauksessa kiinnosti, koska se on markkinoille tultuaan noussut yhdeksi Suomen suosituimmista pensasmustikkalajikkeista. Kaikkein kiinnostavin oli kuitenkin 'Saani', joka oli mielenkiintoinen jo pelkästään sen vuoksi, että se on vasta kehitetty lajike.

Koska MTT:lla oli jo Laukaan toimipisteessä toimivat menetelmät muun muassa mansikalle ja vadelmalle, aloitettiin menetelmän kehittäminen muokkaamalla niille suunniteltuja olosuhteita toimivampaan suuntaan pensasmustikkaa varten. Pensasmustikalle ei ollut aiemmin kokeiltu kryosäilytystä lainkaan pisara-vitrifikaatiomenetelmällä, joten sen perusteella minkäänlaisia suuntaviivoja ei voitu asettaa.

2 PENSASMUSTIKKA

2.1 Pensasmustikka kasvina

Pensasmustikka, tieteelliseltä nimeltään *Vaccinium corymbosum* L., kuuluu *Vaccinium*-sukuun (puolukat) ja *Ericaceae*-heimoon (kanervakasvit). Samaan heimoon kuuluvat esimerkiksi Suomessa kasvava luonnonvarainen mustikka sekä juolukka. Nykyisistä pensasmustikkalajikkeista suurin osa on jalostettu Yhdysvaltojen ja Kanadan luonnonvaraisista, pensasmaisina kasvavista mustikoista. Pohjois-Amerikassa pensasmustikan viljelyllä on huomattavasti pidemmät perinteet kuin Suomessa, ja siellä pensasmustikan viljelyä kokeiltiin jo 1900-luvun alussa. (Kasurinen, Helppi, Holopainen & Anttonen 1998, 6)

Erityisesti viime vuosikymmeninä Pohjois-Amerikassa on risteytetty ahkerasti keskenään korkea- ja matalakasvuisia kanadanmustikoita. Näin ovat syntyneet puolikorkeat eli ”halfhigh bush”-lajikkeet, joissa on myös joitakin talvenkestäviä lajikkeita, jotka pystyvät selviytymään Suomen talvesta (Saario 2008, 169–175). Suomeen pensasmustikat saapuivat vuonna 1948 tutkimukselliseen koeviljelyyn. Kun kymmenen vuoden tutkimuksen jälkeen todettiin, että ulkomaiset lajikkeet eivät soveltuneet Suomen oloihin talvehtimisen, sadon myöhästymisen ja versosyövän vuoksi, aloitettiin suomalainen jalostustyö. Ammattimainen viljely alkoi Suomessa kuitenkin vasta vuoden 1998 jälkeen. (Aaltonen ym. 2006, 143)

Koska myös pensasmustikat ovat tavallisten mustikoiden tapaan alun perin metsäkasveja, niiden kasvupaikkavaatimukset poikkeavat tavanomaisempien puutarhamarjakasvien vaatimuksista. Pensasmustikka menestyy pH:n ollessa alle 5,5, ja se viihtyy parhaiten lämpimillä, loivilla rinteillä tai metsänreunoilla, joilla se on suojassa tuu-

lelta. Joitakin matalakasvuisia lajikkeita voi käyttää myös aluskasveina alppiruusuille, sillä myös alppiruusut suosivat hapanta maaperää. Koska pensasmustikka on hyvin matala- ja pienijuurinen, vaatii se jatkuvaa kosteutta ja kastelemista, jotta se ei kuivahda. Kuivuneen kasvin virvoittaminen on erittäin vaikeaa. (Saario 2008, 169–175)

Talvenkestävyys on tärkeä ominaisuus Suomessa viljeltäville pensasmustikkalajikkeille. Talvenkestävyydeltään hyviä lajikkeita onkin enemmän puolikorkeissa lajikkeissa kuin korkeissa, sillä puolikorkeat lajikkeet ovat jo kokonsa puolesta edullisemmassa asemassa. Ne peittyvät useimmiten lumen alle, joten ne ovat suojassa kovimmilta pakkasilta. Talven aikana lumipeitteen yläpuolelle jäävät versot voivat kuivua, ja mikäli lunta ei ole lainkaan, pakkasvauriot ovat hyvin todennäköisiä. (Saario 2008, 169–175)

Pensasmustikoiden sato voi yhden pensaansa osalta nousta useaan litraan ja sama pensas saattaa marjoja jopa parinkymmenen vuoden ajan. Parhaaseen satoikään pensaatsa ennätävät noin kuuden vuoden ikäisinä. Metsämustikkaan verrattuna sato kypsyy hieman myöhemmin eli elo- ja syyskuun aikana. Pensasmustikoiden marjat (ks. kuvio 1) voivat kasvaa lajikkeesta riippuen jopa kolminkertaisiksi verrattuina suomalaiseseen metsämustikkaan. Marjat myös kasvavat metsämustikasta poiketen tertuissa, mikä helpottaa niiden poimimista. Maultaan marjat ovat vähemmän happoisia, mikä saa ne maistumaan makeammilta. Merkittävin ero metsämustikkaan verrattuna on mallon väri, joka pensasmustikalla on vaalea. Marjat eivät myöskään värjää metsämustikan lailla. (Puutarha.net. 2009) Tämä johtuu marjoissa olevien antosyaanien eli punaisen värin aiheuttavien väriaineiden puutteesta. (Saario 2008, 169, 175)



KUVIO 1. Pensasmustikan marjoja. Malto on vaalea ja koko vaihtelee lajikkeidenkin sisällä. Kuvassa North Blue -lajike.

2.2 Työssä käytetyt lajikkeet

2.2.1 'North Blue'

'North Blue' on alkujaan pohjoisamerikkalainen lajike, jonka viljelyä ryhdyttiin kokeilemaan Suomessa vuonna 1987. Se on yksi talvenkestävistä lajikkeista, joiden kehittämisen aloitti Cecil Stushnoff vuonna 1968. 'North Blue' on syntynyt villin mustikan (*Vaccinium angustifolium* Aiton) sekä viljeltyjen mustikoiden (*V. corymbosum* ja *V. australe* Small) välisestä risteytyksestä. (Banttari, 1987)

'North Blue' on kasvutyybiltään puolikorkea eli niin sanottu "half-high bush", joka Suomen olosuhteissa tarkoittaa 50–80 cm:n korkeutta. Suomen oloissa pienempi korkeus on kuitenkin etu, sillä lumipeitteen ollessa riittävä pensas kestää jopa 35 asteen pakkasta. Leveydeltään 'North Blue' on poikkeuksellisen isokokoinen. Sen marjat ovat melko suuria, tummansinisiä ja maultaan happamahkoja, mutta myös kiinteitä ja kestävät näin ollen hyvin pakastusta. Keskimääräinen sato on 3–5 litraa pensasta kohti, mutta esimerkiksi North Country -lajikkeen istuttaminen 'North Blue'n' läheisyyteen auttaa pölytyksessä ja suurentaa satoa. (Lehmushovi, Tahvonen & Ylämäki, 2000)

2.2.2 'Aino'

'Aino' on suomalainen pensasmustikkalajike vuodelta 1998 ja se on risteytys 'Arnesta' ja 'Augustasta'. 'Arne' on suomalainen lajike vuodelta 1995, ja se on risteytys lajikkeista 'Rancocas' ja [juolukka (*V. uliginosum* L.) x 'Rancocas'], kun taas 'Augusta' on kehitetty matalasta kanadanmustikasta. (Lajikekuvaus/Aino, n.d.)

Kasvutavaltaan 'Aino' (half-high bush) on matalampi ja leveämpi kuin varsinaiset pensasmustikat (high bush), ja se versoaa runsaasti. Pensas kasvaa noin 70–80 cm:n korkuiseksi ja noin metrin levyiseksi. Aino-lajikkeen lehdet ovat suuria ja päältä kiiltävän vihreitä. Huomattavaa on, että uusissa, nuorissa lehdistä esiintyy usein punasävytteisyyttä. Marjat kypsyvät elokuussa muutaman viikon aikana ja ne ovat isokoisia ja maultaan makeita ja melko mietoja. 'Ainoa' suositellaan ristipölytettäväksi Alvar-lajikkeen kanssa. (Lehmushovi, Tahvonen & Ylämäki, 2000)

2.2.3 'Saani'

'Saani' on uusimpia pensasmustikkalajikkeita ja se on tullut jalostukseen vasta äskettäin samaan aikaan Jorma-lajikkeen kanssa. (Kaskinen 2007)

'Saani' on kooltaan matalakasvuinen, vain noin 60 cm korkea. Matalakasvuisuus edistää pensaan talvenkestävyyttä ja 'Saani' onkin Suomessa tunnetuista lajikkeista tähän mennessä talvenkestävin. Sen arvioidaan pystyvän talvehtimaan runsaslumisilla alueilla myös Pohjois-Suomessa. 'Saani' on erittäin satoisa, mutta sen marjat ovat kooltaan vain hiukan tavallista mustikkaa suuremmat. Marjat ovat maultaan aromikkaita ja vähähappoisia ja ne kypsyvät syksyllä yhtä aikaa, mikä helpottaa niiden keräämistä. (Tahvonen, n.d.)

2.3 Pensasmustikoiden kasvitaudit

Suomessa pensasmustikalla ei toistaiseksi ole esiintynyt kovinkaan paljon tauteja. Muiden marjojen tapaan pensasmustikoilla tiedetään esiintyvän niin harmaahometta kuin muumiotautiakin, mutta tähän asti merkittävimpiä ovat olleet *Colletotrichum gloeosporioides* -sieni sekä mustikkasyöpä (Karhu & Parikka 2004, 6). Koska kryosäilytyksen tavoitteena on säilyttää lajien geneettinen puhtaus ja etenkin saada säilytykseen terveysstatukseltaan mahdollisimman puhdasta materiaalia, säilytykseen valitaan vain taudittomia, puhtaita kasveja. Tämän vuoksi on tärkeää tietää pensasmustikoille ominaisista kasvitaudeista.

Colletotrichum gloeosporioides kuuluu samaan sienisukuun kuin esimerkiksi mansikan mustalaikun aiheuttaja. Sieni tartuttaa mustikan joko kukinnan aikana tai sen jälkeen. Mikäli tartunta tapahtuu kukinnan aikana, kukinnot ruskettuvat tai tartunta jää piileväksi eli ei aiheuta mitään näkyviä oireita mustikalle ennen sadon valmistumista. Tartunta on mahdollista 15–27 asteen lämpötiloissa ja lisäksi kasvin on oltava märkänä yhtäjaksoisesti kaksitoista tuntia. Tartunta ilmenee vasta sadon kypsyttyä, jolloin marjat muuttuvat kurtteisiksi ja niiden pintaan erittyy oranssin värisiä nestepisaraita, jotka ovat sienien itiömassaa. Sieni voi tarttua myös mustikan lehtiin, joihin ilmestyy erikokoisia laikkuja. (Karhu & Parikka 2004, 6)

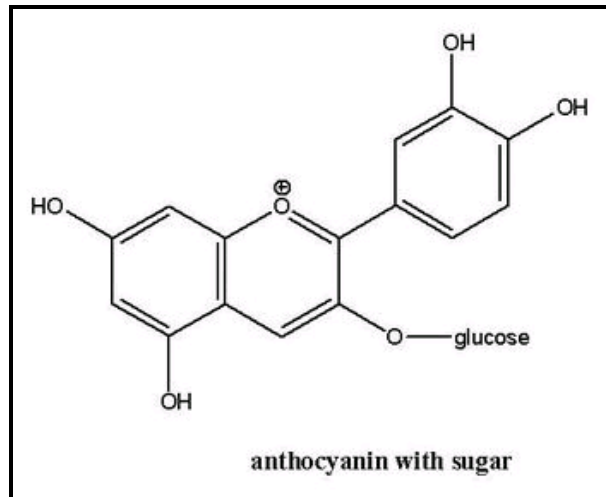
Mustikkasyöpä, *Fusicoccum putrefaciens*, on pensasmustikalle ominainen tauti, joka tuhoaa pensaansa versoja. Tautia esiintyy erityisesti pohjoisilla viljelyalueilla, koska kasvit saavat viileässä ilmanalassa vähemmän energiaa. Mustikkasyöpä on haitallinen korkeille ja puolikorkeille pensasmustikoille, kun taas varpumustikoille sillä ei ole juurikaan merkitystä. Mustikkasyöpä tuhoaa kasvin vanhempia versoja kehittäen niihin ensin pieniä vetisiä laikkuja, jotka muuttuvat syksyn aikana punertaviksi ja laajenevat entisestään seuraavana keväänä ja kesänä. Laikut pysyvät reunoiltaan punaruskeina, mutta keskelle kehittyy vaaleampi alue, johon kertyy myös taudinaiheuttajan itiömiä. Itiöt kulkeutuvat veden mukana tartuttaen muita kasveja silmujen puhkeamisesta syksyyn saakka. Tautia voidaan ehkäistä varmistamalla taimien puhtaus ja alkuperä sekä poistamalla ja polttamalla sairaat kasvinosat. (Parikka 1996, 208)

2.4 Lehtien pigmentit ja punasävytteisyys mustikoilla

Joillakin pensasmustikkalajikkeilla on toisia enemmän taipumusta muodostaa punaista pigmenttiä lehtiinsä. Yksi näistä lajikkeista on 'Aino', joka mikrolisättyinä muodosti työn aikana punaista pigmenttiä etenkin varteensa ja kryosäilytyksen jälkeen myös lehtiinsä. Tämän vuoksi on tärkeää tietää, mistä tämä ilmiö johtuu.

Kasvin lehtien väri muodostuu kasvin tuottamien eri pigmenttien keskinäisestä vuoro-vaikutuksesta, niiden määrästä ja laadusta. Lehtien väriin vaikuttavat myös kasvin sisäiset kemialliset reaktiot. Pigmentit voidaan jakaa kolmeen ryhmään, jotka ovat porfyriinit, karotenoidit ja flavonoidit. Porfyriineistä tärkein on klorofylli, joka aiheuttaa vihreän värin ja joka osallistuu fotosynteesiin. Karotenoidit, kuten lykopeeni ja ksantofylli, aiheuttavat punaisen ja erityisesti keltaisen värin. Voimakkaan punaisen värin aiheuttaa kolmannen pigmenttiryhmän, flavonoidien, yhdiste, antosyaani. Riippuen pH:sta antosyaani voi ilmentyä joko punaisena, sinisenä tai violettina. Mikäli pH-arvo jää kolmen alapuolelle, näkyy antosyaani punaisena (ks. kuvio 2). Antosyaanin tuotanto riippuu suuresti kasvin saatavilla olevan sokerin määrästä, sillä se on liittyneenä sokeriin. (Helmenstine, A. n.d.) Tämän lisäksi antosyaaniväritystä voi esiintyä kasveissa myös muista syistä, joita ovat esimerkiksi fosforin puute, sienitaudit ja tuholaiset. (Pankakoski, A. 1990. 15–16)

Joillekin pensasmustikkalajikkeille, esimerkiksi Aino-lajikkeelle, on tyypillistä varsinkin nuorten lehtien punertuminen ja voimakkaan punainen syysväri (Lajikekuvaus/Aino, n.d.). Tämä johtuu juuri antosyaanin suuresta määrästä kasvissa: se on hallitsevana väriaineena ja peittää alleen muut värit.



KUVIO 2. Antosyaanin molekyyli rakenne, kun pH on alle 3. (Leaf Pigments. 2008)

3 KASVIEN LISÄÄMINEN

3.1 Mikrolisäys

Erilaisia kasvien lisäysmenetelmiä on useita. Opinnäytetyön kryosäilytettävänä aineistona toimivat valittujen pensasmustikan lajikkeiden mikrolisätyt *in vitro*-mikropistokkaat, minkä vuoksi tässä luvussa on keskitytty selvittämään mikrolisäyksen perusteita.

Solukkolisäys eli niin sanottu mikrolisäys on menetelmä, joka perustuu solun totipotenssiin. Teorian kehittivät Schleiden ja Schwann vuonna 1838, ja teorian mukaan jokainen kasvisolu sisältää kaiken tiedon kasvista. Näin ollen jokainen kasvisolu kykenee kasvamaan omaksi kasvukseksi. Mikrolisäyksessä kasvin soluja, solukkoja tai osia kasvatetaan irrallaan kasvista steriileissä olosuhteissa kasvatusalustalla, joka sisältää kaiken kasville elämisen kannalta tarpeellisen aineen, kuten sokeria ja vitamiineja. (Haapala & Niskanen 1992. 13, 22–26)

Kasvatusalustalla kasvin osa muodostaa puuttuvat osansa joko organogeneesin tai embryogeneesin kautta. Organogeneesissä puuttuvat osat muodostuvat suoraan aloituspalaista tai siitä kasvaneesta kalluksesta, kun taas embryogeneesissä muodostuu alkiio, josta myöhemmin kehittyy kasvi. Tällainen kasvullisesta solukosta aloitettu lisäys

tuottaa emokasviin verrattuna samanlaisia kasveja, minkä vuoksi menetelmää kutsutaan myös kasvien kloonaukseksi. Kun kasvi on kasvanut tiettyyn mittaun, voidaan jakaminen suorittaa uudestaan. Normaalisti kasvit paloitellaan noin neljän viikon välein mikropistokkaiksi, jotka siirretään uusille alustoille. Irrotetut meristeemit voivat kuitenkin helposti alkaa erittää fenoleja. Fenolit ovat kasvien kemikaaleja, joita ne käyttävät normaalisti vaaratta, mutta jotka ovat vapaina niille myrkyllisiä. (Haapala & Niskanen, 1992. 13, 15–17). Fenolien muodostuksen aiheuttamia haittoja voidaan ehkäistä esimerkiksi lisäämällä kasvatusalustan sekaan aktiivihiihtä (Nukari & Uosukainen 2006, 16).

Mikrolisäys on hyvä vaihtoehto perinteisille kasvullisen lisäämisen muodoille (varttaminen, pistokaslisäys), varsinaisia eroja ovat vain kasvinosien koko ja aseptinen työskentelytapa. Muihin menetelmiin verrattuna mikrolisäyksessä on monia etuja, joista tärkein on sen nopeus; yksittäisestä kasvista voidaan jakaa rajattomasti uusia kasveja. Mikrolisäys ei vaadi läheskään niin paljon tilaa kuin vastaava pistokaslisäys kasvihuoneessa ja kasveja ei tarvitse kastella tai hoitaa. Lisäksi kasveja voidaan lisätä vuodenajasta riippumatta. Kasvien kannalta etuna on haaromisen lisääntyminen ja parempi pistokasjuurtuvuus. (Haapala & Niskanen, 1992. 27–29)

3.2 Kasvatusalustat

Kasvatusalusta on pääasiassa vedestä, agarista, ravinteista, sokerista, kasvunsäätteistä ja erilaisista orgaanisista aineista koostuva seos, joka sisältää kaiken kasville tarpeellisen aineksen. Kasvatusalustojen valmistuksessa käytetään tislattua vettä, joka on riittävän puhdasta tähän tarkoitukseen. Agaria lisätään pääasiassa kiinteyttämään seosta, mutta koska se sisältää erilaisia orgaanisia ja epäorgaanisia aineita, agarin valinnalla on merkitystä valmistettaessa alustoja. (Haapala & Niskanen, 1992. 40)

Sokeri on erittäin tärkeä osa kasvatusalustan koostumusta. Koska kasveja mikroviljeltäessä kasvien yhteyttäminen jää normaalia vähäisemmäksi tai se loppuu kokonaan, sokeri on tärkeä energian lähde kasveille. Yleisimmin käytetty sokeri kasvatusalustoja valmistettaessa on sakkaroosi (jota käytettiin myös tässä työssä). Sen lisäksi, että so-

keri on kasvin energian lähde, se säätelee myös solujen osmoottista potentiaalia. (Haapala & Niskanen, 1992. 41) Tämä on tärkeää etenkin kryosäilytyksen kannalta.

Kasvatusalustoihin lisättävät ravinteet voidaan jakaa pää- ja hivenravinteisiin. Pääravinteita ovat esimerkiksi kalium, magnesium ja typpi. Niitä lisätään alustaan epäorgaanisina suoloina ja kasvi tarvitsee niitä melko suuria määriä. Päinvastoin kuin pääravinteita, hivenravinteita kasvi tarvitsee suhteellisen vähän. Näihin ravinteisiin kuuluvat muun muassa mangaani, sinkki ja kupari. Ravinteiden lisäksi kasvatusalustoihin lisätään rautaa joko valmiina yhdisteenä tai liuosmuodossa. (Haapala & Niskanen, 1992. 41)

Kasvunsäätteinä käytetään yleensä kasvihormoneja, joita kasvit tuottavat myös itse ja jotka edistävät kasvin kasvua ja kehitystä. Kasvualustojen valmistuksessa käytetään sekä luonnon omia hormoneja että synteettisiä kasvihormoneja. Kasvihormoneja, joita kasvatusalustoissa käytetään, ovat muun muassa auksiinit, sytokiniinit ja gibberelliinit. Auksiinit edesauttavat juurten kasvamista ja niistä käytetään esimerkiksi IAA:a (indolietikkahappo) ja IBA:a. Sytokiniinit taas estävät juurten muodostumista ja edistävät versojen kasvua. Paljon käytettyjä sytokiniineja ovat zeatiini ja BAP. Gibberelliinit edistävät solunjakautumista. (Haapala & Niskanen, 1992. 42)

Kasvatusalustoihin lisättäviä orgaanisia aineita ovat esimerkiksi erilaiset vitamiinit, aminohapot sekä aktiivihiili. Vitamiinit ovat kasveille välttämättömiä, sillä ne osallistuvat muun muassa entsyymien toimintaan. Aminohapot taas toimivat orgaanisen tyypin lähteinä kasveille. Aktiivihiili estää myrkyllisten aineiden vaikutusta kasviin. Aineet voivat olla peräisin niin kasvista itsestään kuin esimerkiksi agarista. Valitettavasti aktiivihiili vaikuttaa samalla hormonien tehokkuuteen pienentäen sitä. (Haapala & Niskanen, 1992. 43)

3.3 Kalluksen muodostuminen

Kallus on kasvin erilaistumatonta tylppysolukkoa, jota muodostuu kasvin haavapinoille. Kallussolukolle on tyypillistä melko löyhä rakenne ja erityisesti nopea ja säännötön jakautuminen (ks. kuvio 3), jonka seurauksena kasvin kromosomiluvuissa saattaa ilmetä muutoksia. Kallus on siis taipuvainen perimän muutoksiin, mikä tarkoittaa, etteivät kasvin ominaisuudet aina säily muuttumattomina. Erilaisten kasvihormonien avulla kallussolukko voidaan saada erilaistumaan tietyllä tavalla. Esimerkiksi auksiinit indusoivat juurenaiheiden kasvua, kun taas sytokiniinit edesauttavat versonaiheiden muodostumista. (Pankakoski, A. 1990. 126, 142, 148, 229) Tässä työssä käytetyissä regeneraatioalustoissa on käytetty sytokiniineista yleisintä eli zeatiinia.



KUVIO 3. Elävää kallussolukkoa kasvuston reunoilla ja kuollutta keskemällä. Kesällä myös verson alkuja.

Kryosäilytyksen kannalta kalluksen muodostuminen ei ole toivottavaa. Kalluksessa mahdollisesti tapahtuvat muutokset johtavat siihen, että siinä mahdollisesti syntyvät versot eivät perimältään vastaa emokasvia. Tämä taas ei ole suotavaa, koska kryosäilytyksen nimenomainen tavoite on saada elvytetty silmut tuottamaan identtisiä kasveja verrattuna käsittelemättömiin fenotyyppeihin eli saada aikaan perimältään emokasvin kaltaisia uusia versoja.

4 KRYOSÄILYTYS

4.1 Kylmänkestävyys luonnossa

Kryosäilytyksessä pyritään siedättämään kasvia kestämään kylmää ja saavuttamaan sama kylmänkestoisuuden tila, jonka kasvi saavuttaa luonnossa itsestään. Kryosäilytyksen ymmärtämisen kannalta on tärkeää käsittää, mitä kasville luonnossa tapahtuu.

Luonnossa kasvin elintoiminnot hidastuvat ja vilkastuvat joko sitä mukaa kun ulkoiset olosuhteet muuttuvat tai kasvihormonien toimesta. Yleensä jonkinlainen lepotila kuuluu kasvin vuosittaiseen kiertokulkuun ja se on kasvihormonien säätelemää. Useimilla kasveilla talveentumisen eli karaistumisen käynnistää päivän lyheneminen, joka laukaisee tiettyjä hormonaalisia reaktioita. Ensimmäisenä muuttuvat kasvihormonien keskinäiset suhteet. Auksiinien, gibberelliinien ja sytokiniinien, jotka säätelevät pääasiassa kasvin pituuskasvua ja solunjakautumista, määrä vähenee ja abskissihapon ja etyleenin määrä kasvaa. Abskissihappo on kasvua hillitsevä hormoni, jota syntyy etenkin talvilepoon valmistautuvissa silmuissa ja sitä kutsutaan myös stressihormoniksi. Etyleeni taas ei ole varsinainen kasvihormoni, mutta se abskissihapon ohella edesauttaa talveentumisprosessia. Talveentumisen kehitystä säätelee lämpötilojen vaihtuminen; alhaiset, hieman 0 °C yläpuolella olevat lämpötilat kiihdyttävät talveentumista. (Pankakoski, A. 1990. 122–123, 136–141)

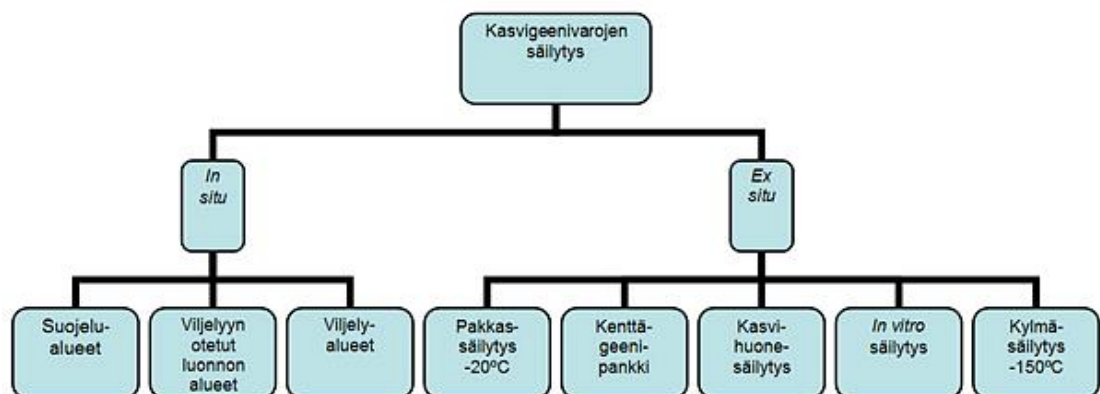
Mikäli jäätyminen ei talven tullessa tapahdu yhtäkkiä, se alkaa soluväleistä, joissa vesi on puhtainta. Soluväleihin alkaa muodostua jääkiteitä, jolloin soluseinistä höyrystyy lisää vettä. Höyrystynyt vesi korvautuu imeytymällä solulimasta ja -nesteestä, mikä johtaa solunesteen konsentroitumiseen. Pitkällä aikavälillä tämä johtaa solun kuivamiin, koska nestettä ei voi haihtua solusta loputtomiin, mutta ennen korkeampia pakkaa tämä auttaa kasvin talveentumisessa. Lopuksi kasvin elintoiminnot hidastuvat. Parhaan kylmänkestävyyden saavuttavat kasvin pintasolukot ja kasvulliset silmut. (Pankakoski, A. 1990. 136–141)

4.2 Kasvigeenivarojen säilytys

Suomen kansallinen kasvigeenivaraohjelma perustettiin vuonna 2003 ja sen tavoitteena on tehostaa Suomen maa- ja metsätalouden geenivarojen suojelua. Geenivaraohjelma perustuu kansainvälistä biologista monimuotoisuutta koskevaan yleissopimukseen (v. 1993) sekä elintarvikkeiden ja maatalouden kasvigeenivaroja koskevaan sopimukseen (v. 2004). Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus vastaa erityisesti maatalous- ja puutarhakasvien suojelusta. (Aaltonen ym. 2006, 13)

Kasvigeenivaroilla tarkoitetaan kasviperäistä geneettistä materiaalia, jolla voi tulevaisuudessa olla arvoa erityisesti elintarviketuotannon ja maatalouden kannalta. Geenivarrat koostuvat lajeista ja niiden villeistä sukulaisista sekä lajikkeista ja maatiaiskan- noista. Perimä tallennetaan joko kasvin osien, siemenien tai solukoiden muodossa. (MTT:n Internet sivustot. Kasvigeenivarat)

Kun valitaan kasvin säilytystapaa (ks. kuvio 4), otetaan huomioon sen oma lisääntymisbiologia. Tällä menettelyllä pyritään takaamaan näytteiden geneettinen aitous ja elinkykyisyys. Toinen huomioon otettava asia on säilytysmenetelmän varmuus. Kryosäilytyksen on todettu olevan hyvä menetelmä erityisesti kasvullisesti lisättäville lajeille. (Kasvigeenivaraohjelma. n.d.)



KUVIO 4. Kasvigeenivarojen säilytystavat. (Veteläinen, n.d.)

Tällä hetkellä hedelmä- ja marjakasveja säilytetään pääasiassa kenttäkokoelmissa ja *in vitro* -viljelminä. Koska erityisesti kenttäkokoelmat ovat alttiita taudeille, tuholaisille ja säälle, on tarpeen kehittää kullekin kasville sopiva kryosäilytysmenetelmä. Näitä

menetelmiä kehitetäänkin juuri MTT:n Laukaan toimipisteessä. (Aaltonen ym. 2006, 7)

4.3 Kryosäilytyksen historia

Kasvien kryosäilytys on vielä nykyäänkin suhteellisen uutta. Ensimmäisenä onnistumisesta raportoi vuonna 1960 Sakai, joka onnistui kryosäilyttämään rauduskoivun oksia ja sittemmin, vuonna 1968, Quatrano onnistui *in vitro* -viljeltyjen pellavan solujen kanssa. Vielä 1980-luvun puoliväliin asti kontrolloitu asteittainen jäähditys oli kuitenkin ainoa olemassa oleva tekniikka kryosäilytykseen. Koska kyseinen menetelmä ei kuitenkaan sopinut etenkin trooppisen alueen kasveille, jouduttiin miettimään muita tapoja säilyttää kasvimateriaalia. (Reed 2008, 59)

Uusia, vitrifikaatioon perustuvia menetelmiä, kuten kapselointi-dehydraatio ja PVS2-liuokseen perustuva vitrifikaatio, kehitettiin 1990-luvun alkupuolella. Uusien menetelmien kehittämisen jälkeen kryosäilytettävien lajien määrä on noussut nopeasti. Viimeisen kahdenkymmenen vuoden aikana pelkästään vitrifikaatioon perustuvia, uusia menetelmiä on kehitetty yli 200 lajille. (Reed 2008, 33, 50–51)

4.4 Menetelmät

4.4.1 Kryosäilytyksen perusteet

Kryosäilytys on menetelmä, jossa näyte pitkäaikaissäilytetään nestemäisessä työssä -196 °C :ssa tai sen kaasufaasissa alle -170 °C :ssa (Nukari & Rantala 2009, 4). Kryosäilytysmenetelmiä on useita erilaisia, mutta ne kaikki koostuvat osioista, jotka kehitetään empiiristen testien avulla kullekin kasville sopiviksi. Tärkeimpiä tekijöitä ovat kryosuojaus ja etenkin solunsisäisen veden määrä. Kaikissa menetelmissä pyritäänkin joko välttämään tai kontrolloimaan solunsisäistä jäänmuodostusta. (Reed 2008, 15)

Käsittelystä selviytymistä voidaan parantaa tekemällä aineistolle sokerikäsittely etukäteen, sillä sokeri kertyy soluihin ja kasvattaa osmoottista kestävyyttä parantaen

kylmänkestävyyttä. Myös kylmäkaraistus parantaa kasvien kestävyyttä huomattavasti. Kylmäkaraistuksessa kasveja pidetään ennen muita käsittelyjä alhaisissa lämpötiloissa lähellä 0 °C:ta. (Reed 2008, 77–87)

Kryosäilytysmenetelmät voidaan jakaa kahteen pääryhmään. Perinteisiä menetelmiä ovat näytteen upottaminen suoraan nestemäiseen tyypeen ilman erityisiä käsittelyjä, vaiheittainen jäädyttäminen (–20 °C:sta –196 °C:seen) sekä kontrolloitu asteittainen jäädytys. Uudempiin vitrifikaatiomenetelmiin kuuluvat perinteinen vitrifikaatio, kapselointi-dehydraatio ja kapselointi-vitrifikaatio. (Nukari & Uosukainen 2006, 4–5) Seuraavissa luvuissa selvitetään näitä menetelmiä sekä kerrotaan myös edellä mainitsemattomasta pisara-vitrifikaatiomenetelmästä, jota tässä työssä käytettiin.

4.4.2 Kontrolloitu asteittainen jäädytys

Kontrolloitu asteittainen jäädytys oli pitkän aikaa lähes ainoa olemassa oleva kryosäilytysmenetelmä, ja vielä nykyäänkin sen etu on, että se sallii suuret käsiteltävän aineiston määrät. Se perustuu solun osmoottiseen säätelyyn ja jäätyksen aiheuttamaan kuivamiseen. Menetelmä soveltuu erityisen hyvin lauhkean ja subtrooppisen alueen *in vitro* -viljelmien säilyttämiseen, sillä näiden alueiden kasvit ovat luontaisesti karaistuneempia. Menetelmän aikana näytteet käsitellään ensin suoja-aineilla ja jäädytetään sitten tasaisella nopeudella alkaen 0–4 asteesta ja jatkuen 35–40 pakkasasteeseen, minkä jälkeen ne upotetaan nestemäiseen tyypeen. Tavallinen jäädytysnopeus on 0,1–5 °C minuutissa, ja siihen käytetään yleensä ohjelmoitavaa laitteistoa. Tällaisen laitteiston kustannukset voivat kuitenkin nousta korkeiksi. (Reed 2008, 77–87)

Jäädytyksen aikana solun ulkoinen jää muodostuu ensin, jolloin solumembraaniin syntyy vesigradienetti ja solun sisäinen vesi siirtyy ulkopuolelle. Näin saadaan jäänmuodostukseen osallistuva vesi vähentymään. Mikäli jäähtyminen on liian nopeaa, ei solu ehdi kuivaa tarpeeksi. Jos jäähtyminen taas on liian hidasta, se aiheuttaa solujen liiallista kuivamista ja elektrolyyttien konsentroituamista. Optimaalisesti jäädytetyssä solussa vesi vitrifioituu solun koskettaessa nestemäistä tyypeä. (Reed 2008, 77–87)

Kontrolloidun asteittaisen jäädytyksen metodilla on vuonna 1989 saatu säilytettyä myös pensasmustikan meristeemejä. Tällöin käytettiin erittäin hidasta (0,1 °C/min) jäädyttämisenopeutta –40 °C:seen asti. (Reed 2008, 334, 340)

4.4.3 Kapselointi-dehydraatio

Kapselointi-dehydraatio on 1990-luvun alkupuolella kehitetty menetelmä, joka perustuu synteettisten siementen tuottamiseen kehitettyyn teknologiaan. Kapselointi-dehydraatiossa kasvimateriaali upotetaan kalsiumittomaan nestemäiseen basaalikasvu-alustaliuokseen, joka sisältää 3% natriumalginaattia. Seoksessa olevaa kasvimateriaalia pudotetaan pipetillä vahvaan kalsiumkloridiliuokseen, jolloin alginaatti polymerisoituu ja kapseli muodostuu (ks. kuvio 5). Kapseleita pidetään liuoksessa 20–30 minuuttia, jotta voidaan varmistua polymerisaation onnistumisesta. (Reed 2008, 59–68)



KUVIO 5. Kapseloituja silmuja (1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species. 2009)

Seuraava vaihe on osmoottinen suojaus, joka saadaan aikaan käsittelemällä helmet sokeriliuoksilla. Osmoottisen suojauksen jälkeen helmet kuivataan nopeasti steriilillä suodatinpaperilla ja jätetään sitten kuivamaan joko laminaarivirtaukseen tai suljettuun astiaan silikageelin kanssa. Silikageelin käyttö on suositeltavaa, sillä se takaa tasaisemmat ja toistettavat olosuhteet. Viimeisenä näytteet upotetaan nestemäiseen tyypeen joko suoraan tai kontrolloidun asteittaisen jäädytyksen kautta, riippuen kasvista. (Reed 2008, 59–68)

Kapselointi-dehydraatio sallii melko rajutkin käsittelyt, jotka olisivat kapseloimattomille näytteille erittäin haitallisia tai jopa tappavia. Koska käsittelyillä saadaan kasvista lähes kaikki vesi pois, voidaan näytteiden sulatuskin suorittaa hitaasti huoneenlämmössä, sillä uudelleenkristallisoitumisen vaaraa ei ole. (Reed 2008, 59–68)

4.4.4 Vitrifikaatiomenetelmät

Vitrifikaatiomenetelmät tähtäävät kasvinosan elinkelpoisuuden säilymiseen pyrkien välttämään solunsisäistä jäänmuodostusta jäähdytyksen aikana. Kaikki vitrifikaatiomenetelmät perustuvat nimensä mukaisesti vitrifikaatioilmiöön, jossa neste kiinteytyy ilman kristallisoitumista amorfiseen, lasimaiseen muotoon. Kiinteytyneellä nesteellä on kaikki kiinteän aineen mekaaniset ja fyysiset ominaisuudet, mutta ei organisoitunutta rakennetta. Lasimainen olomuoto pysäyttää kaikki kemialliset reaktiot, joihin vaaditaan molekyylidiffuusiota, ja sen muodostuminen johtaa lepotilan syntymiseen. (Reed 2008, 21–22, 33–34)

Vitrifikaatio voidaan saada aikaan useilla eri tavoilla, mutta yleensä ne kaikki tähtäävät liuenneiden aineiden konsentraation nostamiseen siten, että saavutetaan kriittinen viskositeetti. Kun viskositeetti kasvaa, se estää vesimolekyylejä kerääntymästä yhteen ja muodostamasta jäätä, jolloin tapahtuu vitrifikaatio. Solun viskositeettia voidaan kasvattaa kahdella tavalla; lisäämällä suoja-aineita siten, että niiden konsentraatiot nousevat suuriksi, tai poistamalla soluista vettä. Saavutettu olomuoto on kuitenkin melko epävakaata ja se voi suhteellisen helposti muuttua takaisin nesteeksi tai muodostaa jäätä. (Reed 2008, 21–22, 33–34)

Ensimmäiset vitrifikaatiomenetelmät suunniteltiin eläinsoluille, mutta myöhemmin niitä sovellettiin onnistuneesti myös kasvisoluille. Vitrifikaatiota ehdotettiin käytettäväksi kasveilla, koska sen avulla voitaisiin välttää mahdolliset haitalliset ulkoisen ja sisäisen jäänmuodostuksen vaikutukset. Kapselointi-dehydraatiotekniikat ja vitrifikaatiomenetelmät, joissa käytettiin erityisiä vitrifikaatioliuoksia, kehitettiin 1990-luvulla. (Reed 2008, 21, 33)

Perinteisessä vitrifikaatiossa pääosassa ovat jäänesto- ja vitrifikaatioliuokset, jotka voidaan jakaa kolmeen luokkaan; soluseinän läpäisemättömät (PEG₆₀₀₀, PVP), vain soluseinän läpäisevät (proliini, PEG₁₀₀₀, oligosakkaridit) ja soluseinän sekä -membraanin läpäisevät liuokset (DMSO, glyseroli). Useat vitrifikaatioliuokset koostuvat edellisten sekoituksista, sillä useampien aineiden käyttäminen vähentää yksittäisen aineen myrkyllisyyttä ja auttaa stabiloimaan syntyvää lasimaista olomuotoa. Paljon käytetty vitrifikaatioliuos on PVS2-liuos, joka toimii solussa kahdella tavalla. PVS2 korvaa solunsisäisen veden ja muuttaa jäljelle jäävän veden jäätyiskäyttäytymistä. PVS2-liuos alijäähtyy helposti alle $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ asteeseen ja vitrifioituu noin $-115\text{ }^{\circ}\text{C}$ asteessa. (Reed 2008, 33–48)

Perinteisen vitrifikaatiomenetelmän alussa kasvin meristeemit esikäsitellään sokerialustalla, minkä jälkeen alkaa varsinainen käsittely. Ensin näytteet käsitellään latausliuoksella (LS), joka kasvattaa näytteiden osmoottista suojausta, jonka jälkeen niistä poistetaan vettä PVS2-liuoksella. Näytteet ovat molemmissa liuoksissa tietyn aikaa ja tämä aika on optimoitava jokaiselle kasvilajille erikseen. Lopuksi näytteet jäähdytetään joko asteittain tai upottamalla ne suoraan nestemäiseen tyypeen siten, että näytteet ovat kryoputkissa tietyssä määrässä PVS2-liuosta. Kun näytteet halutaan sulattaa, ne lämmitetään nopeasti, jotta vältetään uudelleen-kristallisoituminen. Sulatuksen jälkeen PVS2-liuos poistetaan putkista ja näytteet käsitellään sokeriliuoksella, jotta näytteissä vielä olevat myrkylliset aineet laimeneisivat eivätkä aiheuttaisi näytteille tuhoa. Lopuksi näytteet siirretään maljalle toipumaan. (Reed 2008, 33–48)

Kapselointi-vitrifikaatiossa meristeemit suljetaan alginaattihelmien sisään ja ne käsitellään normaalin vitrifikaatiomenetelmän mukaisesti LS- ja PVS2-liuoksilla. Kapselointi-vitrifikaatio kehitettiin, jotta PVS2-liuoksen tietyt toksiset vaikutukset voitaisiin välttää. Kapselointi-dehydraatioon verrattuna kapselointi-vitrifikaatio taas vie vähemmän aikaa, kun vältetään helmien kuivattamiseen kuluva aika. (Reed 2008, 47, 334)

Pisara-vitrifikaatiomenetelmässä, jota tässäkin työssä sovellettiin, meristeemit käsitellään kuten muissakin vitrifikaatiomenetelmissä ensin LS-liuoksella ja sitten PVS2-liuoksella. Muista menetelmistä eroten, pisara-vitrifikaatiossa meristeemit siirretään PVS2-käsittelyn jälkeen alumiinifoliosuikaleen päälle tietyn kokoisen PVS2-pisaran sisään. Meristeemien pakastus tapahtuu joko upottamalla foliosuikale suoraan nestemäiseen tyypeen (Panis, Piette & Swennen 2004, 2–3) tai laittamalla se ensin pakas-

tusputkeen ja upottamalla vasta sen jälkeen. Opinnäytetyössä käytettiin tämän menetelmän variaatiota, jossa pisara muodostui silmujen ympärille niiden mukana siirtyvästä PVS2-liuoksesta. Pisara muodostuu, kun silmujen ympärille jää pintajännityksen ansiosta PVS2-liuosta nostettaessa niitä pinseteillä foliosuikaleille.

5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

5.1 Opinnäytetyön rajaus

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää toimiva kryosäilytysmenetelmä pensasmustikoiden meristeemeille. Jotta tämä voitaisiin täydellisesti toteuttaa, se vaatisi lukemattomat määrät kokeita, joiden avulla optimoitaisiin kaikki ne lukuisat muuttujat, joita tällainen menetelmä pitää sisällään. Jotta opinnäytetyön toteutus saatiin mahtumaan annettuihin aikarajoihin, optimoitavia muuttujia oli vähennettävä ja toistoja sekä rinnakkaiskokeita oli karsittava. Itse vitrifikaatiokäsittelystä päätettiin optimoida vain PVS2-käsittelyaika, sillä PVS2-liuos oli potentiaalisesti eniten haittaa aiheuttava tekijä menetelmän toteutuksessa. Vitrifikaatiokäsittelyn muuttujien optimoinnin sijaan keskityttiin löytämään optimaalisia olosuhteita silmujen esikäsittelyille kokeilemalla erilaisia toipumisalustoja ja sokerikäsittelyjä.

5.2 Alkuvalmistelut

Opinnäytetyön toteutus aloitettiin tutustumalla aiheena olevaan kasviin ja suunnittelemalla aikataulu, jonka mukaisesti kasvien mikrolisäys aloitettaisiin ja pakastukset suoritettaisiin. Pensasmustikan normaali lisäysväli on neljä viikkoa, joten silmut päätettiin eristää neljän viikon ikäisistä mikropistokkaista. Koska kaikkien silmujen tuli olla samanikäisiä vertailukelpoisuuden takaamiseksi, piti aikataulu suunnitella erittäin tarkasti ottaen huomioon muun muassa työpäiville sattuvat arkipyhät. Lisäysaikataulun lisäksi tuli ottaa huomioon sulatukset ja etenkin pakastukset, jotka suoritettaisiin tiettyinä päivinä. Tämän vuoksi koe-eriä ei myöskään voitu ottaa niin monta, kuin olisi haluttu.

Pensasmustikan mikrolisäykset suoritettiin maanantaisin neljä viikkoa ennen silmujen eristämistä. Mikropistokkaat pistettiin foliokantiseen lasipurkkiin ja jokaiseen purkkiin laitettiin 15 pistokasta. Koska kaikki lajikkeet eivät versoneet yhtä hyvin, oli esimerkiksi 'North Blueta' lisättävä enemmän kuin kahta muuta lajiketta (ks. kuvio 6). Silmujen oton lisäksi pensasmustikkaa piti lisätä myös uusia lisäysjakoja silmällä pitäen. Kaikki pensasmustikkalajikkeet esikasvatettiin samalla sakkaroosipohjaisella lisäysalustalla.



KUVIO 6. Työssä käytetyt pensasmustikkalajikkeet mikropistokkaina; 'Aino', 'North Blue' ja 'Saani'

Kolmas huomioon otettu asia oli kasvatusalustojen valmistaminen ja valaminen maljoille ja erlenmeyer-pulloihin. Koska etenkin erlenmeyer-pulloja oli käytössä vain rajallinen määrä ja koska niiden ja maljojen lopullista menekkiä ei alussa tiedetty, oli

molempia tehtävä koko työn ajan tarpeen mukaan. Kokeiden loputtua tarvittavien maljojen määrä pystyttiin arvioimaan, mutta erlenmeyereiden määrää ei edelleenkään voitu arvioida tarkasti.

5.3 Silmujen eristäminen

Silmuja eristettiin kaiken kaikkiaan noin 1200 kappaletta. Silmut eristettiin neljän viikon ikäisistä pensasmustikan mikropistokkaista. Ennen varsinaisten pakastusten aloittamista eristettiin harjoituksen vuoksi sekä erikokoisia kärkisilmuja että erikokoisia hankasilmuja. Harjoituksen aikana kuitenkin todettiin hankasilmujen olevan liian pieniä menetelmän järkevän toteuttamisen kannalta. Liian pienet silmut olisivat hankalia käsitellä ja etenkin kasvupiste voisi rikkoutua, jolloin silmu ei selviytyisi pakastuksesta eikä lähtisi kasvuun. Koska näin ollen käytettiin vain kärkisilmuja, lisättiin mikropistokkaita vastaavasti enemmän.

Silmut eristettiin pääasiassa perjantaisin sekä kahtena maanantaina riippuen siitä, minkälaisia esikäsittelyjä niille oli tehty. Koska eristettiin vain kärkisilmuja, työskentely oli suhteellisen nopeaa ja silmuja voitiin eristää kerralla enemmän. Silmujen eristäminen suoritettiin steriileissä olosuhteissa laminaarikaapissa mikroskoopin avulla. Eristäminen tapahtui katkaisemalla ensin mikropistokkaasta kärkiosa petrimaljalla, minkä jälkeen katkaistu osa siirrettiin mikroskoopin alle ja silmun ympäriltä poistettiin yksitellen ylimääräiset lehdet siten, että kasvupiste oli vielä osittain nuorten lehti-aiheiden peitossa. Ylimääräiset lehdet voivat häiritä vitrifikaatioliuosten imeytymistä ja etenkin silmujen kasvuunlähtöä sulatuksen jälkeen. Varsinainen silmu irrotettiin katkaisemalla se mahdollisimman läheltä kasvupistettä kuitenkin tuhoamatta sitä (ks. kuvio 7). Mikäli kasvupiste tuhoutuu, ei silmu voi lähteä enää uudestaan kasvamaan. Eristetyt kärkisilmut olivat erittäin tasakokoisia ja niiden pituuden vaihteluväli oli 0,5–1,0 mm.



KUVIO 7. Silmun eristäminen. Ensimmäinen kuva: mikropistokkaan kärkiosa. Toinen kuva: silmun ympärillä olevat lehdet poistettu. Kolmas kuva: varsinainen silmu, koko noin 1 mm.

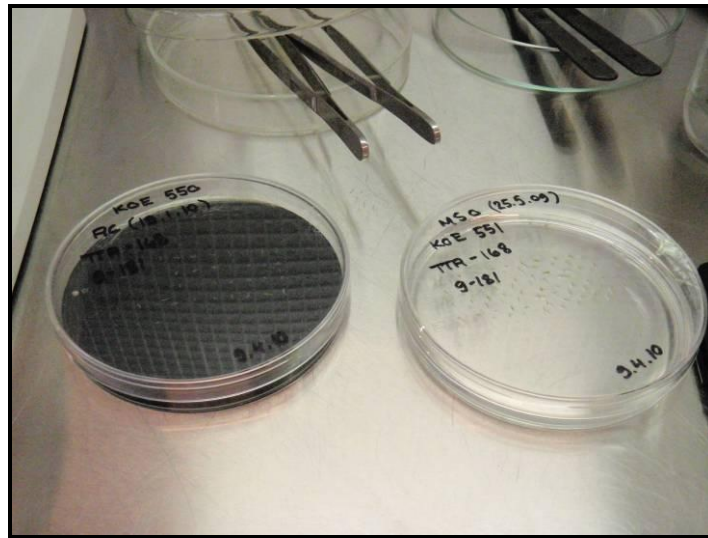
5.4 Esikäsittely

Silmuille tehtiin työn aikana erilaisia esikäsittelyjä, joissa testattiin muun muassa toipumisalustan tarpeellisuutta ja sokerikäsittelyjen eri variaatioita. Koska pensasmustikalle ei ollut aikaisemmin testattu kryosäilytystä pisara-vitrifikaatiomenetelmällä, kokeiltiin näissä testeissä sekä aktiivihiiltä ja kasvihormoneja sisältävää Murashige–Skoog-kasvatusalustaa että hormonitonta Murashige–Skoog-kasvatusalustaa. Lisäksi kokeiltiin useampia erilaisia sokerikäsittelyjä.

Kasvatusalustan sisältämä aktiivihiili ehkäisee kasvien fenolien muodostamisen aiheuttamia haittavaikutuksia. Fenolien muodostaminen on tyypillistä kasveille etenkin mikrolisäyksen yhteydessä (Nukari & Uosukainen 2006, 16). Kaikki kasvit eivät kuitenkaan muodosta fenoleja haitallisia määriä, ja näin ollen ne eivät välttämättä hyödy aktiivihiilen käytöstä tai siitä voi olla niille jopa haittaa.

Perjantaina eristetyt silmut siirrettiin MS-maljoille (ks. kuvio 8) siten, että ne saivat toipua viikonlopun yli. Maanantaina eristetyt silmut eivät käyneet läpi tätä toipumisvaihetta, vaan ne siirrettiin suoraan sakkaroosimaljalle, jolle myös perjantaina eristetyt silmut siirrettiin maanantaina. Koska sokerin tiedetään auttavan kasvin kylmänkestävyyttä ja etenkin nousevan sokerikonsentraation on aikaisemmissa tutkimuksissa todettu auttavan, aloitettiin myös tässä tapauksessa tutkimus perustuen sille oletukselle, että nouseva konsentraatio olisi hyvä. Kokeissa käytettiin aiemmissa tutkimuksissa hyviksi todettuja sakkaroosialustoja, joiden konsentraatiot olivat 0,25 M, 0,50 M sekä 0,75 M. Silmut siirrettiin maljoille siten, että ne olivat kullakin maljalla yhden vuoro-

kauden. Tämän vuoksi silmut pyrittiin siirtämään maljalta toiselle joka päivä samaan aikaan.



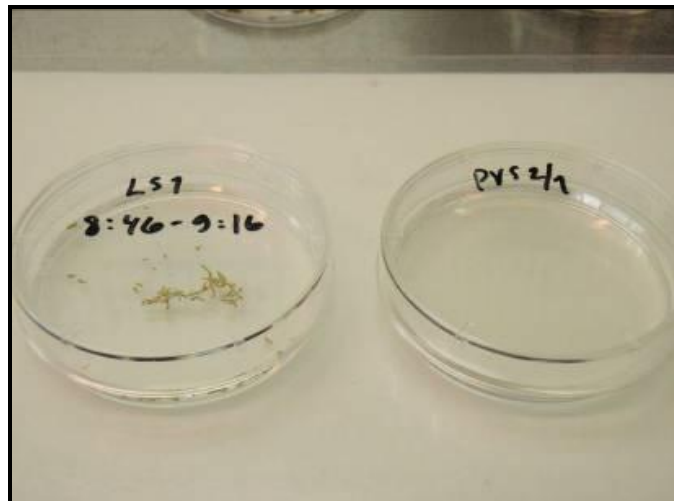
KUVIO 8. Eristetyt silmut aktiivihiltä ja hormoneja sisältävällä ja hormonittomalla MS-maljalla

Joillekin silmuerialueille tehtiin myös edellisestä poikkeavia sokerikäsittelyjä, koska haluttiin tietää, parantaisiko silmun kryokestävyyttä esimerkiksi suora siirtäminen korkeamman sokerikonsentraation omaavalle alustalle. Poikkeavissa käsittelyissä silmut siirrettiin maanantaina joko 0,50 M tai 0,75 M sokerialustalle siten, että ne olivat maljalla pakastukseen asti eli kolme vuorokautta. Lisäksi yhdelle erälle kokeiltiin vielä kolmatta käsittelyä, jossa silmut siirrettiin maanantaina 0,25 M maljalle ja tiistaina 0,50 M maljalle, jolla ne olivat kaksi vuorokautta.

5.5 Vitrifikaatiokäsittelyt ja pakastus

Ainoa vitrifikaatiokäsittelyihin ja pakastukseen liittyvä muuttuja oli aika, jonka silmut olivat PVS2-liuoksessa. Tätä muuttujaa testattiin kahdessa ensimmäisessä testierässä, jotta aika saataisiin optimoitu ja jatkossa voitaisiin käyttää vain parhaimmaksi todettua PVS2-käsittelyaikaa. Testattuja PVS2-käsittelyaikoja olivat 30, 40, 50 ja 60 minuuttia. Lukuun ottamatta PVS2-käsittelyaikaa, vitrifikaatiokäsittelyt ja pakastus pyrittiin suorittamaan aina samalla tavalla.

Kaikki vitrifikaatiokäsittelyt suoritettiin huoneenlämmössä (+25 °C). Pakastus aloitettiin käsittelemällä silmut latausliuoksella (LS). Silmut nostettiin maljalta liuokseen pienillä pinseteillä mahdollisimman nopeasti, jotta silmujen liuoksessa olema aika olisi lähes sama kaikilla silmuilla. Silmut olivat LS-liuoksessa 30 minuuttia, jonka jälkeen ne siirrettiin suoraan PVS2-liuokseen (ks. kuvio 9). Aikaisemmissa pisaravitrifikaatiomenetelmissä silmut on LS-liuoksen jälkeen kuivattu imupaperiin, mutta nyt todettiin siirtyvän LS-liuoksen määrän olevan niin pieni, ettei se juurikaan muuta PVS2-liuoksen konsentraatiota ja koska silmuja siirrettiin yleensä suurin piirtein saman verran, oli konsentraation muutos joka tapauksessa lähes saman suuruinen. PVS2-liuoksessa silmut olivat erästä riippuen eri aikoja.



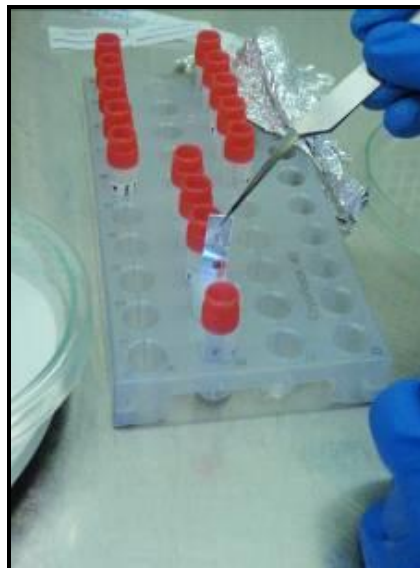
KUVIO 9. Silmut odottamassa siirtoa LS-liuoksesta PVS2-liuokseen

PVS2-liuoksesta silmut nostettiin pinseteillä alumiinifoliosta leikatuille suikaleille (ks. kuvio 10), jotka oli steriloitu lämpökaapissa. Jokaiselle foliosuikaleelle laitettiin yleensä kymmenen silmua siten, että silmujen ympärille muodostui pisara PVS2-liuoksesta.



KUVIO 10. Silmut pisaran sisällä foliosuikaleilla

Jokainen suikale siirrettiin omaan kryoputkeensa (ks. kuvio 11) ja kontrolliputkea (-LN) lukuun ottamatta kaikki putket nostettiin nestemäiseen tyyppeen. Kontrolliputkelle tehtiin sulatusvaiheen mukaiset käsittelyt lukuun ottamatta varsinaista sulatusta. Vaiheet selitetään tarkemmin seuraavassa luvussa.

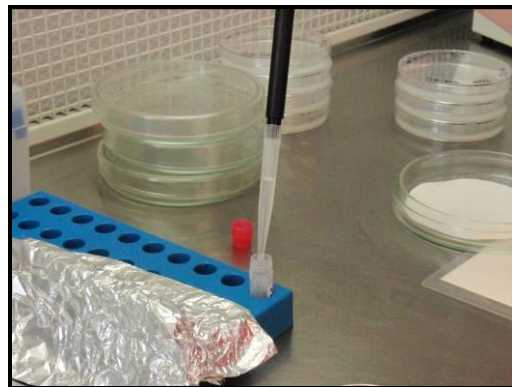


KUVIO 11. Foliosuikaleiden siirtäminen kryoputkiin

5.6 Sulatus

Sulatukset suoritettiin keskiviikkoisin, koska se sopi parhaiten muihin aikatauluihin. Tällöin putket ehtivät olla nestetyypitankissa kuusi vuorokautta.

Nopean sulatuksen on aikaisemmin todettu olevan hyväksi kasveille, sillä näin vähennetään uudelleen-kristallisoitumisen vaaraa. Nopea sulatus saatiin aikaan siirtämällä kryoputki nestetyypistä vesihauteeseen, jonka lämpötila oli 40 °C. Putkea pidettiin vesihauteessa kolme minuuttia, minkä jälkeen putki siirrettiin laminaarikaappiin ja se pintasteriloitiin alkoholilla. Putkeen pipetoitiin 2 millilitraa 1 M sakkaroosipohjaista pesuliuosta (ks. kuvio 12), jonka annettiin vaikuttaa 30 minuuttia folion alla ja lopuksi silmut siirrettiin imupaperin kautta sakkaroosipohjaiselle regeneraatioalustalle. Kun sulatuskäsittelyä tehdään kontrolliputkelle, tulee olla erityisen nopea pipetoitaessa pesuliuosta, sillä PVS2-liuoksen vaikutus jatkuu, kunnes silmu jäätyy tai se laitetaan sokeriliuokseen. Nopealla toiminnalla vältetään PVS2-liuoksen vaikutuksien muuttuminen haitalliseksi.



KUVIO 12. Sakkaroosiliuoksen pipetoiminen kryoputkeen

Sakkaroosimaljoille siirretyt silmut suljettiin folioon (ks. kuvio 13), jossa ne saivat olla keskiviikosta maanantaihin eli viisi vuorokautta. Koska silmut ovat tässä vaiheessa vasta palautumassa kryokäsittelyn aiheuttamasta stressistä, on niille hyödyksi olla pimeässä, jolloin ne eivät yritä yhteyttää. Maanantaisin maljat siirrettiin vielä kahdeksi vuorokaudeksi harson alle, jossa ne olisivat varjossa ja alkaisivat yhteyttää vähitellen.



KUVIO 13. Folioon kääriminen ja valmis paketti

5.7 Havainnointi

Maljalla olevat silmut (ks. kuvio 14) havainnoitiin yleensä mikroskoopilla, sillä varsinkaan heti sulatuksen jälkeen mahdollista viherrystä on erittäin vaikeaa tai mahdotonta nähdä paljaalla silmällä. Silmut havainnoitiin ensimmäisen kerran harson poistamisen jälkeen. Ensimmäiset neljä havainnointia tehtiin viikon välein ja neljännellä viikolla silmut siirrettiin uudelle sakkaroosimaljalle ja versoneet silmut siirrettiin erlenmeyerpulloihin, joissa oli samaa sakkaroosialustaa kuin maljoilla. Jokaiseen erlenmeyeriin siirrettiin enintään neljä versoa. Sen jälkeen, kun silmut oli ensimmäistä kertaa siirretty uudelle maljalle, maljat tarkkailtiin kahden viikon välein ja joka neljäs viikko silmut siirrettiin joko uudelle maljalle tai erlenmeyerpulloon.

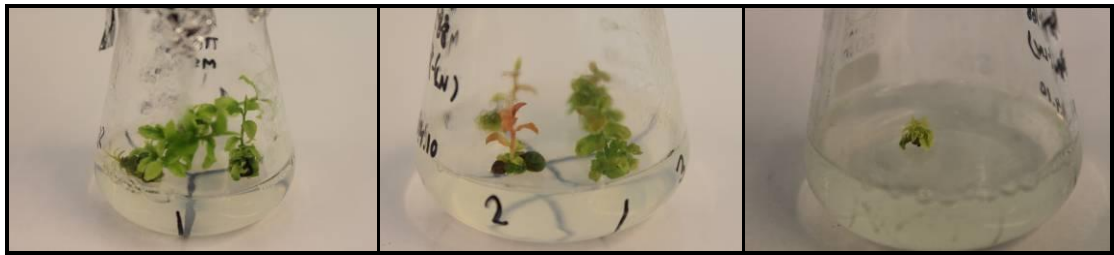


KUVIO 14. Silmuesimerkkejä. Vasemmalla juuri sulatetut silmut. Oikealla harson alta otetut ja ensimmäistä kertaa havainnoidut silmut.

Silmu laskettiin etenkin alkuvaiheessa elpyneeksi, mikäli siinä näkyi vähänkään viherrystä. Tarkkailun edetessä havaittiin, että useissa silmuissa ei välttämättä näkynyt

lainkaan viherrystä vaan ne olivat enemmänkin punaisia. Myös nämä silmut laskettiin elpyneiksi, koska tiedettiin pensasmustikalla ja etenkin joillakin tietyillä lajikkeilla olevan taipumusta punasävyisyyteen.

Versoontuneet silmut havainnoitiin erlenmeyerpulloissa neljän viikon päästä siirtämisestä ja ne luokiteltiin neljään luokkaan sen mukaan, minkä kokoisia ja näköisiä ne olivat. Luokitus (ks. kuvio 15) määriteltiin ensimmäisten, –LN-kokeista saatujen versoontuneiden silmujen kunnon perusteella. Ensimmäiseen luokkaan määriteltiin kuuluvaksi versot, jotka ovat jaettavissa ja joiden väri ja kasvu on hyvää. Hyvällä värillä tarkoitettiin pääasiassa vihreää väriä. Toiseen luokkaan määriteltiin hyvännäköiset, mutta vielä liian pienet versot, jotka vaativat jatkokasvatusta sekä hyvänkokoiset versot, jotka olivat kuitenkin väriltään huonoja. Kolmanteen luokkaan kuuluivat todella pienet ja hyvänväriset versot sekä pienet ja huonon väriset versot. Neljäs luokka tarkoitti kuolleita versoja.



KUVIO 15. Versoontuneiden silmujen havainnointi. Vasemmalta: 1. luokka, 3. ja 2. luokka sekä oikealla 3. luokka.

Versoontuneille määritelty neljän viikon tarkkailuaika perustui alun perin pensasmustikan normaaliin lisäysväliin ja siihen, että arveltiin, ettei useammille tarkkailuille olisi aikaa. Kun kaikki kokeet oli suoritettu ja tarkkailut pääsivät vauhtiin, päätettiin kuitenkin tarkkailla +LN-kokeita vielä 8 ja 12 viikon päästä siirtämisestä erlenmeyereihin. Näin saataisiin tietää, paranisiko versojen luokitus, kun ne saisivat kasvaa pidempään. Versoja ei kuitenkaan enää siirretty uusiin erlenmeyereihin ajan ja resurssien puutteen vuoksi.

6 TULOKSET

6.1 Tulokset lajikkeittain

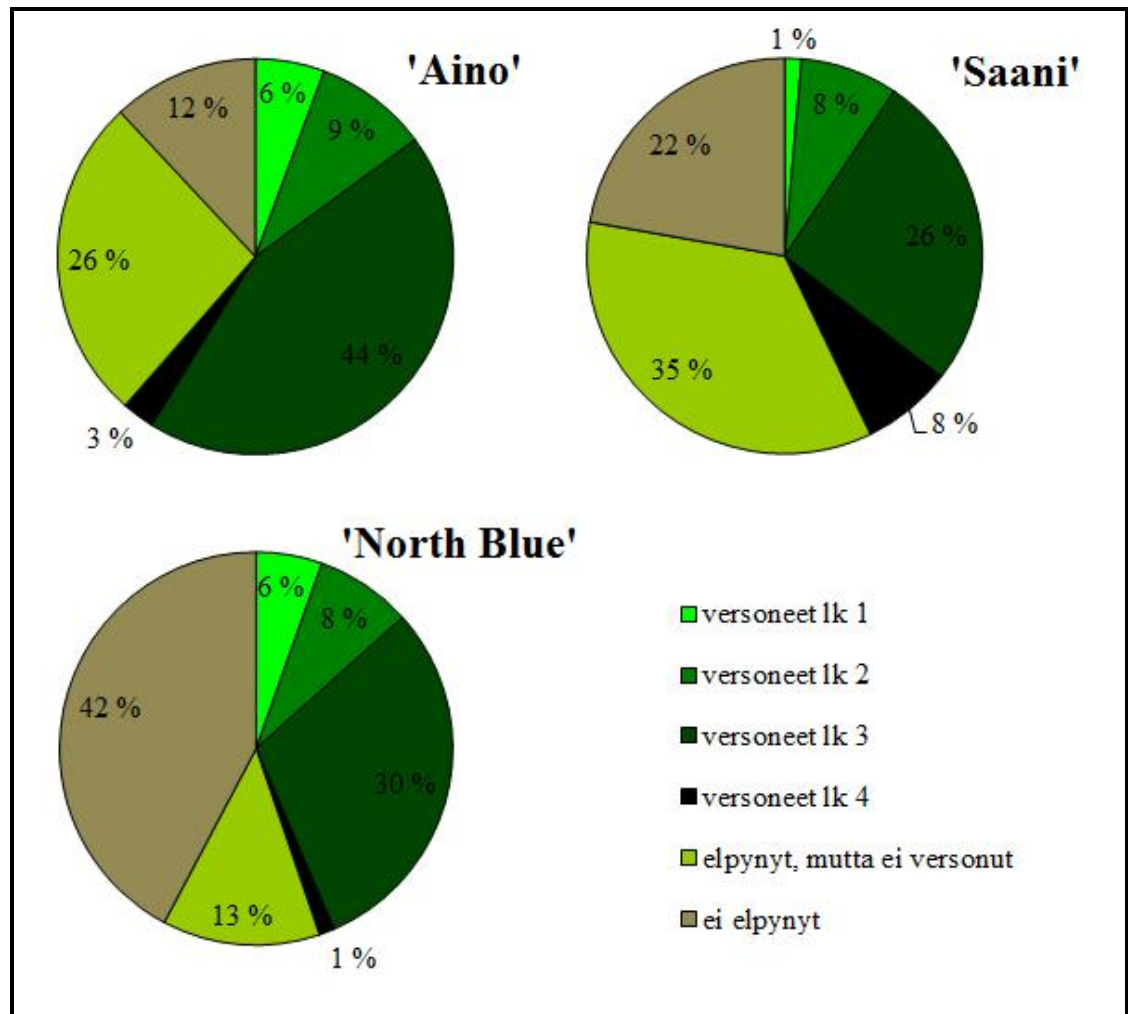
Tässä työssä käsitellyistä tuloksista +LN-kokeiden antamat tulokset kuvaavat, kuinka hyvin silmut selviytyivät pakastuksesta ja sulatuksesta, kun taas –LN-kokeiden tulokset kuvaavat, kuinka silmut ovat selviytyneet vitrifikaatioliuoksista. Kaikki tässä työssä esitetyt graafit ja diagrammit on laadittu perustuen +LN-kokeiden elpyneisiin silmuihin sekä versoontuneisiin silmuihin, jotka on tarkkailtu neljän viikon päästä siirtämisestä erlenmeyereihin. –LN-kokeiden tuloksia ei ole analysoitu enempää, koska ne elpyivät ja versooutuivat lähes poikkeuksetta hyvin. Missään kokeessa ei tapahtunut erityistä notkahdusta tältä osalta.

Tutkimuksessa käytettyjen kolmen eri lajikkeen elpyminen ja versominen poikkesivat toisistaan suuresti. Kuviossa 16 nähdään, kuinka silmut elpyivät ja lähtivät versomaan sekä mihin versoontuneiden luokkaan ne sijoittuivat. Tulokset eivät ole suoraan vertailukelpoisia keskenään, sillä eri koe-erille on tehty erilaisia käsittelyjä. Tilastoista saadaan kuitenkin joitain suuntaa antavia tuloksia.

Kuvion 16 mukaan kolmesta valitusta lajikkeesta parhaiten selviytyi 'Aino', joka elpyi 88-prosenttisesti, kun taas 'Saani' elpyi vain 78-prosenttisesti ja 'North Blue' peräti vain 58-prosenttisesti. Myös versoontumisen kannalta 'Ainon' kryokestävyys oli parasta, sillä sen +LN-silmuista 62 % versoontui. 'North Blue' ja 'Saani' olivat molemmat omalla tavallaan kryokestävyydeltään huonompia kuin 'Aino'. 'North Bluen' silmuista huomattavan suuri osa (42 %) ei elpynyt lainkaan ja 'Saanin' tapauksessa lähes puolet elpyneistä silmuista ei versoontunut lainkaan. Tämä voi johtua niille tehdyistä mahdollisesti epäsuotuisammista käsittelyistä, mutta todennäköisesti kyseessä ovat lajikkeiden väliset erot.

Luokkiin I ja II määritellyjä versoja voitaisiin jatkossa käyttää mikroviljelmien perustamiseen, kun luokkiin III ja IV kuuluvat versot hylättäisiin. Tämän vuoksi on tärkeää kiinnittää huomiota myös versoontuneiden luokituksiin ja niiden suuruuteen suhteessa toisiinsa ja elpyneisiin silmuihin yleensä. 'Ainon' ja 'North Bluen' luokkien I ja II yhteenlasketut prosenttiosuudet kaikista silmuista olivat samaa luokkaa; 'Ainon' sil-

muista 15 % ja 'North Bluen' silmuista 14 % kuuluivat joko luokkaan I tai II. 'Saaniin' silmuista vain 9 % kuuluu luokkiin I tai II. Merkittävin ero kahteen muuhun lajikkeeseen verrattuna oli nimenomaan luokan I prosenttiosuus. 'Ainolla' ja 'North Bluella' luokan I osuus oli 6 %, mutta 'Saaniilla' vain 1 %.



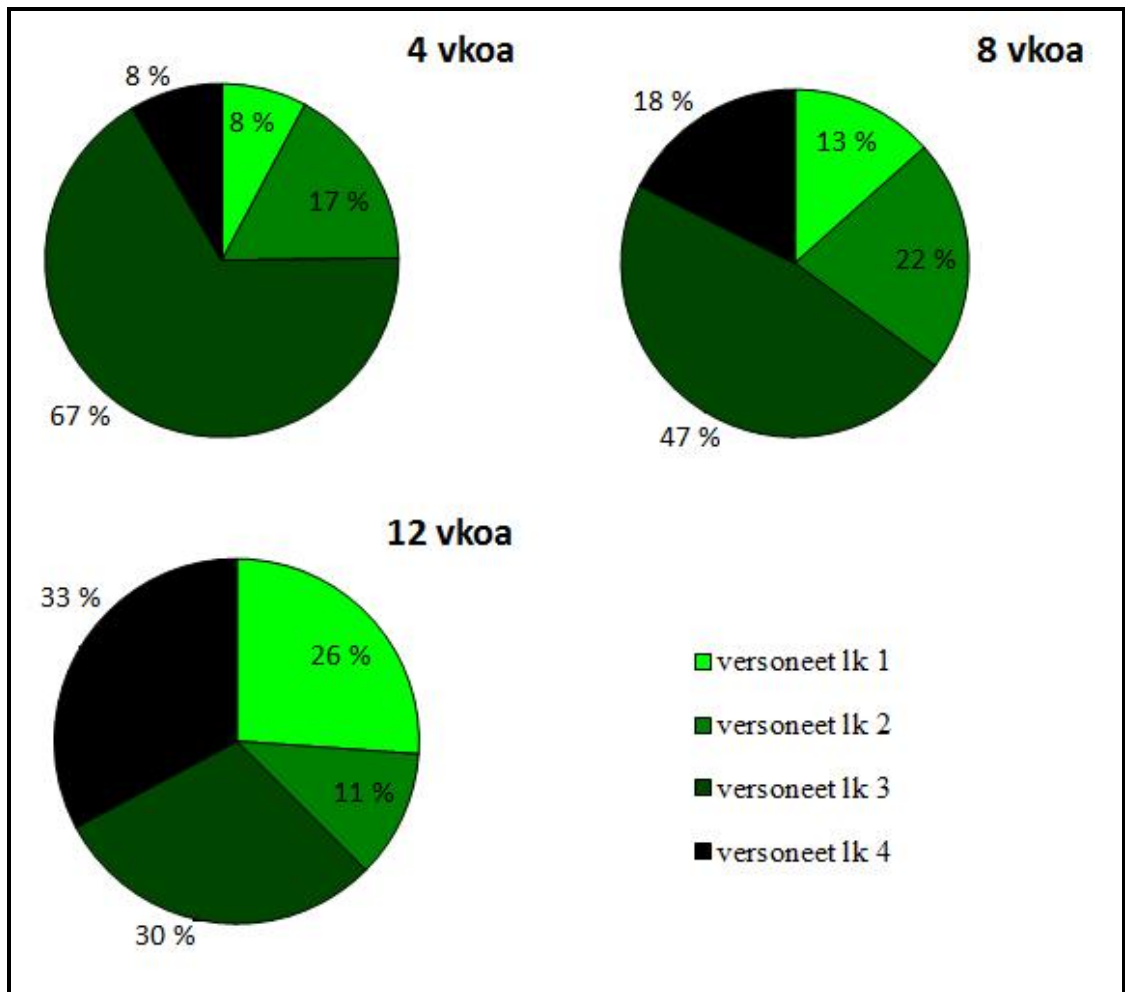
KUVIO 16. Silmujen elpyminen ja versominen lajikkeittain

6.2 Versoontuneiden silmujen havainnointien vertailu

Tässä työssä esitetyt tulokset perustuvat elpyneiden ja versoontuneiden silmujen määrään sekä erityisesti versoontuneiden silmujen kuntoon. Versoontuneista silmuista havainnointituloksena on käytetty tulosta, joka on saatu 4 viikon päästä siirtämisestä erlenmeyeriin.

Kuviossa 17 nähdään versoontuneiden silmujen jakautuminen luokkiin I–IV havainnointiviikon mukaan. Kaavioissa otettiin huomioon +LN-kokeiden versoontuneet silmut kaikilta lajikkeilta. Neljän viikon päästä erlenmeyeriin siirtämisestä tehdyissä havainnoissa voitiin havaita luokan III huomattavan suuri osuus kaikista versoontuneista silmuista. Kaiken kaikkiaan luokkaan III jäi 67 % versoontuneista. Luokkiin I ja II arvioitiin 25 % versoneista ja 8 % kaikista versoneista oli kuolleita. Kun verrattiin näihin tuloksiin 8 ja 12 viikon jälkeisiä tuloksia, voitiin havaita tiettyjä johdonmukaisuuksia. Luokan IV osuus versoontuneista silmuista kasvoi noin kaksinkertaistuen neljän viikon välein. Kuitenkin myös luokkien I ja II yhteenlaskettu osuus kasvoi nouden ensin 25 prosentista 35 prosenttiin ja lopulta 37 prosenttiin. Tässä tapauksessa 8 ja 12 viikon jälkeen tehtyjen havainnointien välillä ei kuitenkaan ollut suurta eroa.

Havainnointiviikkojen 4 ja 8 välillä noin 41 prosentissa versoontuneista silmuista ei tapahtunut minkäänlaista muutosta, 32 prosentissa luokitus nousi ja 27 prosentissa luokitus laski. Kun vertaillaan havainnointiviikkoja 8 ja 12, muuttumattomien määrä pysyi suunnilleen samana (42 %), mutta positiivisesti reagoineiden määrä pienentyi 25 prosenttiin ja taantuneiden määrä taas nousi 33 prosenttiin.



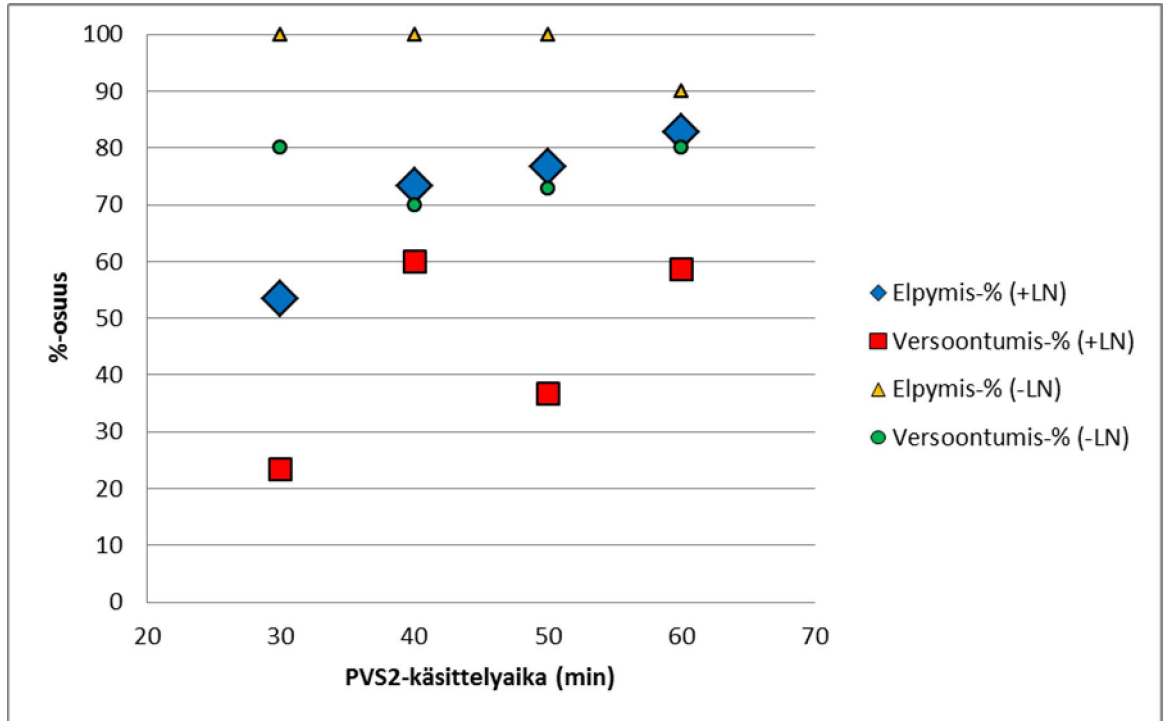
KUVIO 17. Versoontuneiden silmujen havainnointit neljän viikon välein

6.3 PVS2-käsittelyajan määrittäminen

6.3.1 PVS2-käsittelyaika Saani-lajikkeella

'Saaniilla' testattiin neljää eri PVS2-käsittelyaikaa; 30, 40, 50 ja 60 minuuttia (ks. kuvio 18). Paras kryokestävyys saavutettiin 40 minuutin PVS2-käsittelyajalla, jolloin silmut versooutuivat parhaiten. Tällöin versoontumisen kannalta saavutettiin prosentuaalisesti lähes yhtä hyvät tulokset kuin elpymisenkin kannalta. Tulos oli kuitenkin todennäköisesti tilastollinen poikkeama, sillä se poikkeaa muiden tuloksien muodostamasta lineaarisesta suorasta melko paljon. 'Saaniilla' saavutettiin 40 minuutin käsittelyajalla +LN-kokeissa 73 prosentin elpyminen ja 60 prosentin versoontuminen. Myös 60 minuutin käsittelyajalla saatiin hyviä tuloksia; elpyminen oli parempaa kuin 40 minuutin käsittelyajalla nousten 82 prosenttiin ja silmut myös versooutuivat

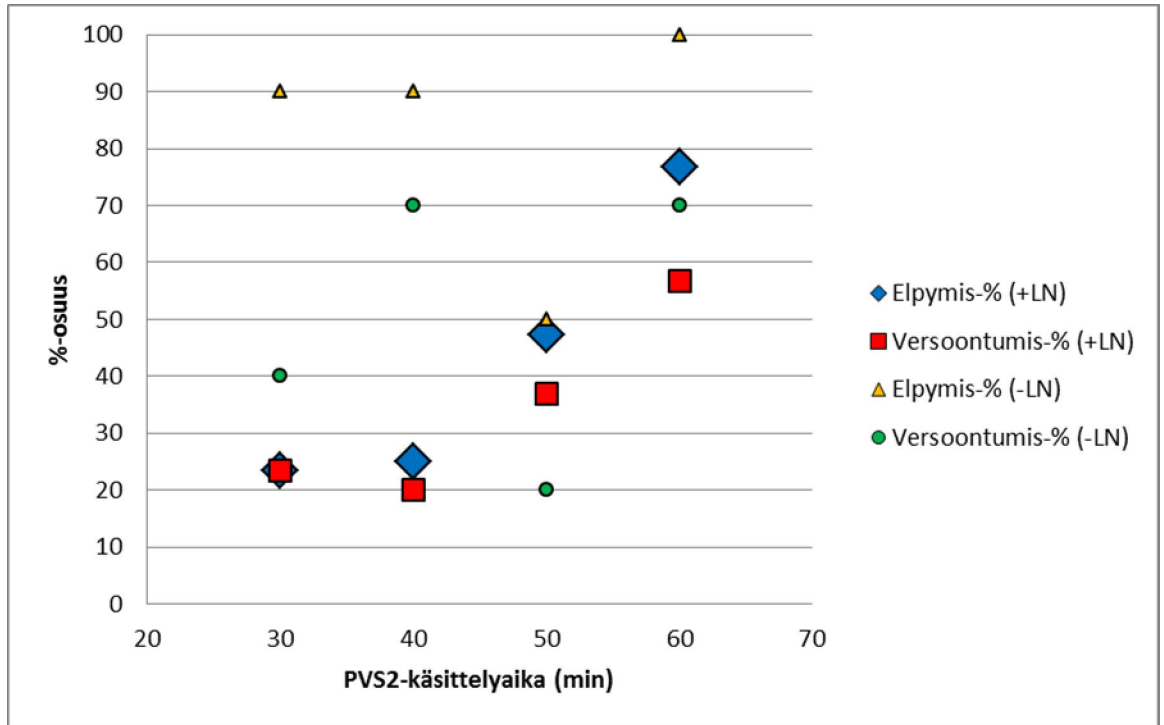
lähes yhtä hyvin eli 58-prosenttisesti. –LN-kokeiden silmut selviytyivät hyvin eli lähes 100-prosenttisesti kaikilla käsittelyajoilla (poikkeuksena oli 60 minuutin käsittelyaika, jolloin silmut selviytyivät vain 90-prosenttisesti).



KUVIO 18. 'Saenin' elpyminen ja versoontuminen PVS2-käsittelyajan muuttuessa

6.3.2 PVS2-käsittelyaika North Blue -lajikkeella

'North Bluella', kuten 'Saanillakin', testattiin neljää eri PVS2-käsittelyaikaa, jotka olivat samat kuin 'Saanilla'. Tuloksien perusteella 'North Bluen' paras kryokestävyys saatiin aikaan 60 minuutin käsittelyajalla, jolla saavutettiin +LN-kokeissa 76 prosentin elpyminen ja 56 prosentin versoontuminen (ks. kuvio 19). Versoneista silmuista 58 % kuului joko luokkaan I tai II. Erässä, jossa käytettiin 50 minuutin PVS2-käsittelyaikaa, sekä elpymis- että versoontumisprosentit jäivät –LN-silmuilla poikkeuksellisen alhaisiksi. Tämä voitiin kuitenkin jättää huomiotta yksittäisenä poikkeamana.

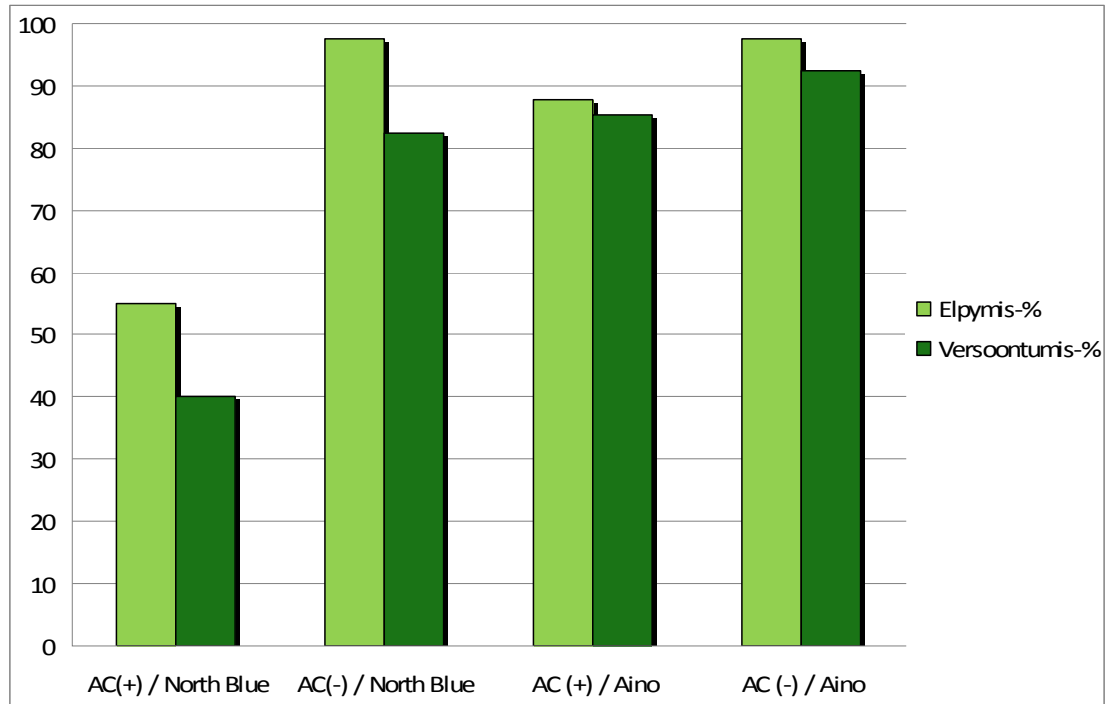


KUVIO 19. 'North Bluen' elpyminen ja versoontuminen PVS2-käsittelyajan muuttuessa

6.4 Esikäsittelyiden merkitys

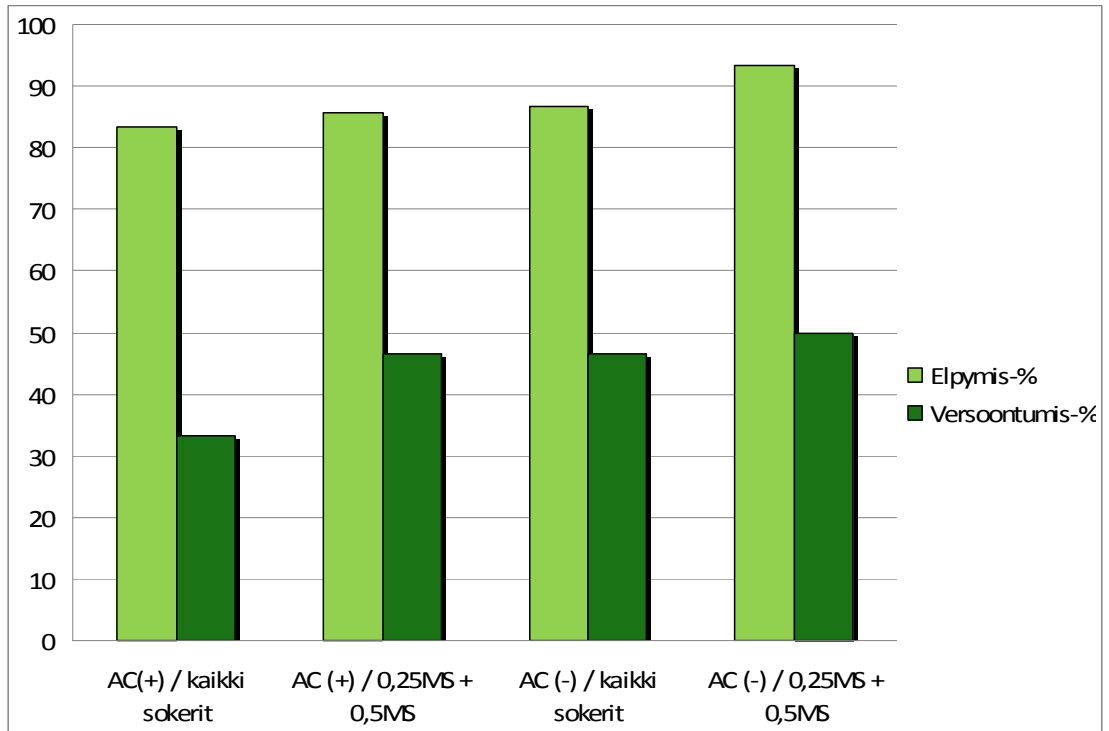
6.4.1 Toipumisalustan käyttö ja aktiivihiihen merkitys siinä

Aktiivihielettömän (AC-) ja aktiivihiehellisen (AC+) MS-maljan vaikutusta silmujen elpymiseen ja versoontumiseen testattiin kahdessa testierässä. Ensimmäisessä testierässä (ks. kuvio 20) kokeiltiin, miten 'North Blue' ja 'Aino' reagoivat aktiivihiehelliseen maljaan verrattuna normaaliin maljaan. Kuviosta näkyy, että etenkin 'North Bluen' elpyminen ja versoontuminen heikkenevät runsaasti aktiivihiihen läsnä ollessa. Aino-lajikkeella sama ei ole näkyvissä aivan yhtä selkeästi, mutta myös sillä on havaittavissa samansuuntaista taipumusta. Sekä 'North Bluen' että 'Ainon' +LN-silmut ylsivät aktiivihielettömällä alustalla yli 80 %:n, 'Aino' jopa yli 90 %:n versoontumiseen.



KUVIO 20. Aktiivihieiltä sisältävän (AC+) ja normaalin (AC-) MS-maljan vertailua 'North Bluella' ja 'Ainolla'

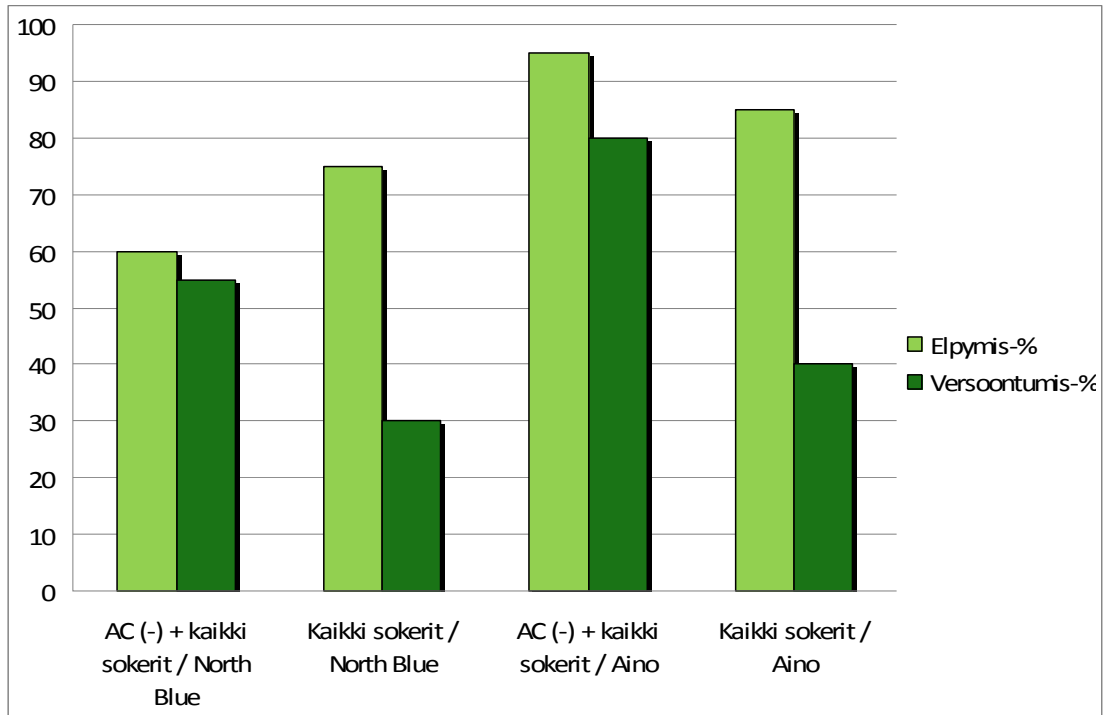
Toisessa testierässä testattiin 'Saenin' reagoimista aktiivihieiden lisäämiseen esikäsittelyalustaan sekä kahta erilaista sokerikäsittelyä (ks. kuvio 21). Molemmilla sokerikäsittelyillä 'Saani' ylsi parempiin tuloksiin, kun käytettiin aktiivihieletöntä kasvatusalustaa. Suuremman eron aktiivihielettömän ja aktiivihiehellisen alustan välille sai aikaan kolmen eri pitoisuuksisen sokerialustan käyttäminen, kun kahta alustaa käytettäessä ero oli vain 4 prosentin luokkaa. Parhaimmillaan 'Saenin' +LN-silmut saavuttivat kuitenkin vain 50 %:n versoontumisen, vaikka ne elpyivätkin yhtä hyvin kuin 'Ainon' ja 'North Bluen' silmut edellisessä koe-erässä.



KUVIO 21. Aktiivihiihtä sisältävän (AC+) ja normaalin (AC-) MS-maljan sekä kahden sokerikäsittelyn vertailua 'Saanilla'

Aktiivihiihden merkityksen lisäksi tutkittiin esikäsittelyn tarpeellisuutta (ks. kuvio 22). Tätä varten otettiin silmuja sekä perjantaina että maanantaina 'Ainosta' ja 'North Bluesta'. Perjantaina eristetyt silmut esikäsiteltiin viikonlopun yli aktiivihiilettömällä maljalla, jonka jo tässä vaiheessa tiedettiin olevan hyödyllisempi silmujen elpymisen ja versoontumisen kannalta. Maanantaina kaikki silmut (sekä perjantaina että maanantaina eristetyt) siirrettiin 0,25 M sakkaroosimaljalle ja silmut kävivät läpi kaikki sokerikäsittelymaljat (0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M) ollen jokaisella yhden vuorokauden.

Kuviosta 22 nähdään, että maanantaina eristetyt, esikäsittelemättömät +LN-silmut elpyivät lähes yhtä hyvin ja 'North Bluen' tapauksessa jopa paremmin kuin aktiivihiilettömällä maljalla esikäsitellyt. Pelkkä elpyminen ei kuitenkaan riitä, sillä kuviosta nähdään myös, että esikäsittelemättömien silmujen versoontuminen on huomattavasti heikompaa. Esikäsitellyt silmut yltyvät lajikkeesta riippuen 55–80 %:n versoontumiseen, kun taas esikäsittelemättömät silmut jäävät vain 30–40 %:in.



KUVIO 22. Esikäsitellyn (aktiivihieletön malja) vaikutus tuloksiin 'North Bluella' ja 'Ainolla'

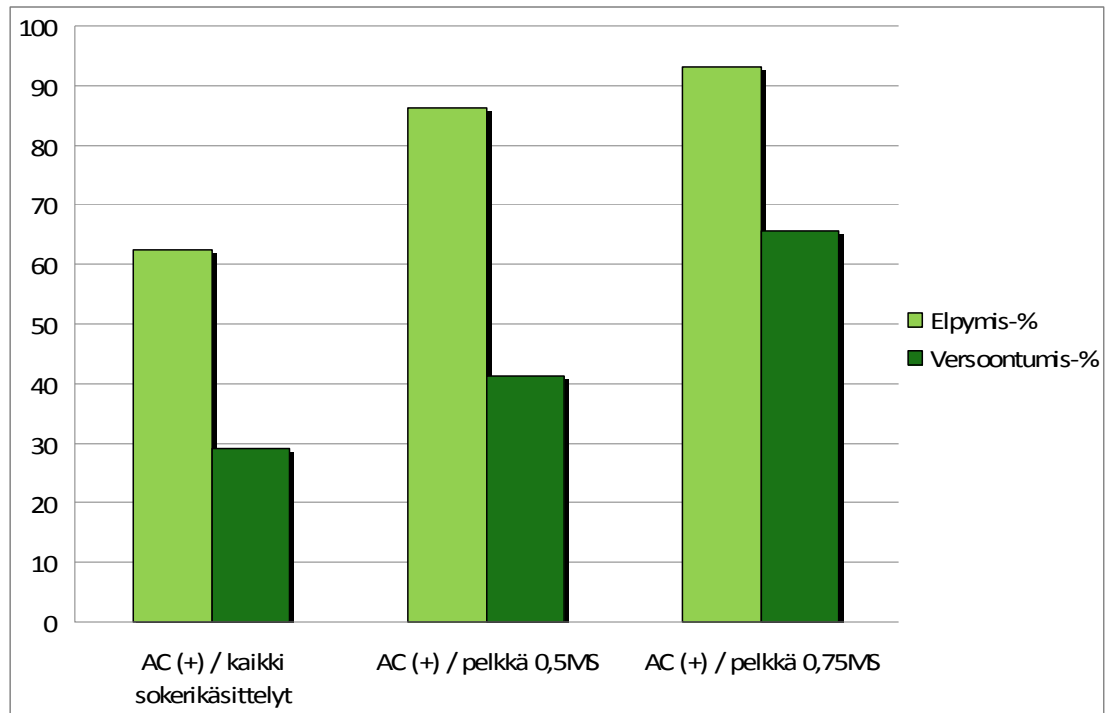
6.4.2 Sokerikäsitelyiden vaikutus

Erilaisten sokerikäsitelyiden vaikutuksia testattiin neljässä eri koe-erässä sekä aktiivihieletön sisältävän että aktiivihielettömän esikäsitelyalustan kanssa. Lisäksi yhdessä koe-erässä verrattiin esikäsittelemättömiä ja aktiivihielettömällä maljalla esikäsiteltyjä silmuja.

Ensimmäisessä testissä kokeiltiin 'Saanilla' mikä olisi paras kolmesta vaihtoehdosta käytettäessä aktiivihieletön sisältävää sakkaroosipohjaista esikasvatusalustaa (ks. kuvio 23). Ensimmäinen vaihtoehto oli käyttää kaikkia kolmea sokerikäsitelyalustaa eli 0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M alustaa, jolloin silmut olivat kaikilla alustoilla yhden vuorokauden. Toisena vaihtoehtona käytettiin pelkkää 0,50 M esikasvatusalustaa ja kolmantena vaihtoehtona oli 0,75 M alusta. Molemmilla alustoilla silmut olivat kolme vuorokautta.

+LN-silmut, jotka oli esikäsitelty kolmen vuorokauden ajan 0,75 M sakkaroosialustalla, sekä elpyivät että versoivat kaikkein parhaiten. Niiden elpyminen ylsi 93 %:iin

ja versominen 65 %:iin. Silmuilla, jotka oli esikäsitelty vain 0,50 M alustalla tai jotka olivat olleet kaikilla sokerikäsitteilyalustoilla, elpyminen ja versoontuminen jäivät huomattavasti vähäisemmiksi ja versoontuminen väheni suhteessa elpyneisiin silmuihin.

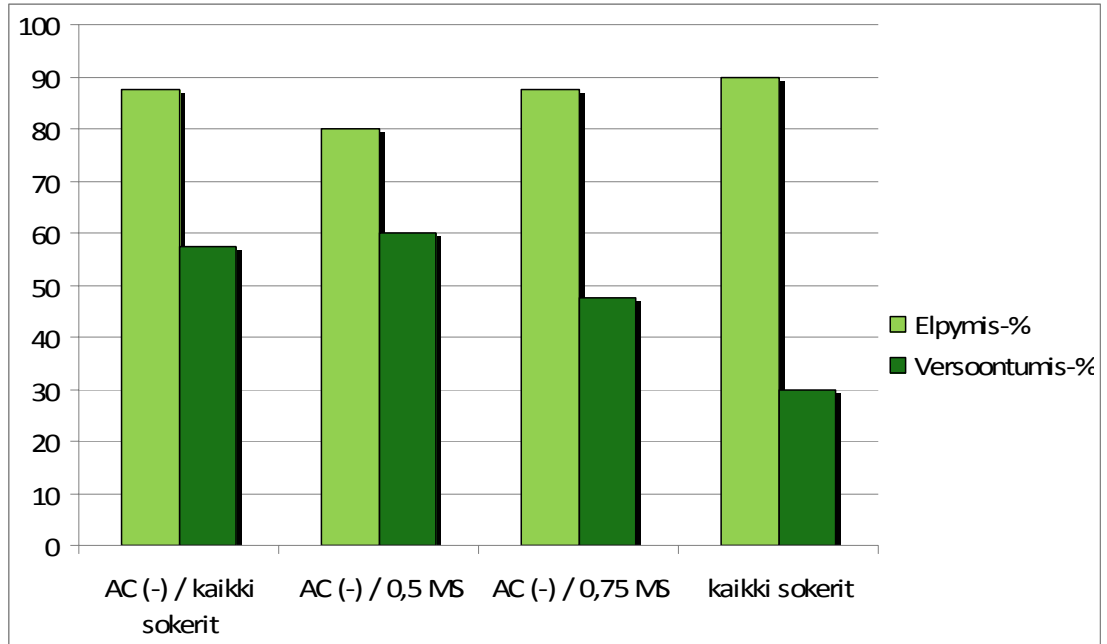


KUVIO 23. 'Saarin' elpyminen ja versoontuminen erilaisilla sokerikäsitteilyillä aktiivihiihtä sisältäneen esikäsitteilyn jälkeen

Toisessa testissä kokeiltiin 'Ainolla' erilaisia sokerikäsitteilyjä käytettäessä aktiivihiihtöntä esikäsitteilyalustaa (ks. kuvio 24). Lisäksi testattiin maanantaina otettujen, esikäsittelemättömien silmujen elpymistä verrattuna esikäsitteilyihin. Erilaisia sokerikäsitteilyjä oli kolme erilaista; käytettiin joko kaikkia sokerikäsitteilyalustoja (0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M), kutakin yhden vuorokauden ajan tai joko pelkästään 0,50 M tai 0,75 M alustaa kolmen vuorokauden ajan. Tässä tapauksessa käsitteilyjen väliset erot eivät kuitenkaan olleet niin selviä kuin edellisessä testissä.

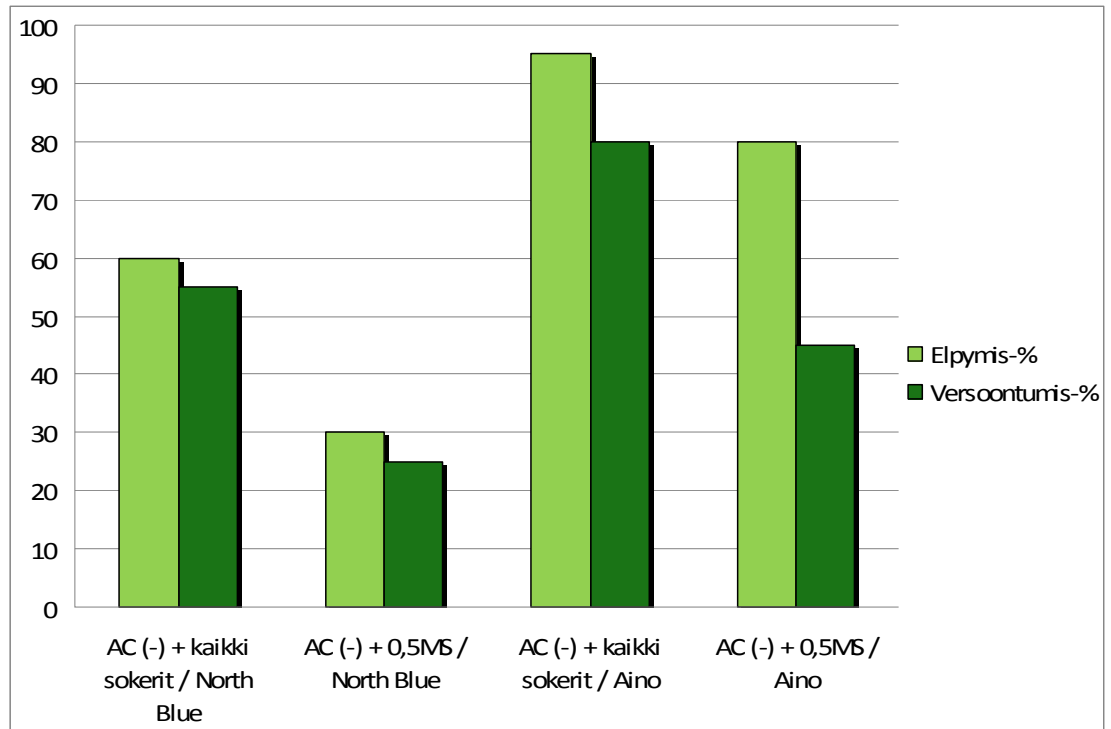
Toisen testierän tuloksista erottuu muista selkeästi maanantaina otettujen silmujen erä (äärimmäisenä oikealla). Vaikkakin ne ovat elpyneet parhaiten, on niiden versoontuminen jäänyt muita huomattavasti alhaisemmaksi, noin 30 %:iin. Parhaat tulokset tässä testierässä sen sijaan antavat +LN-silmut, joilla käytettiin joko kaikkia sokerialustoja tai pelkkää 0,50 M alustaa. Kaikkia sokerialustoja käytettäessä saavutettiin 87 %:n elpyminen ja 57 %:n versoontuminen. Kun taas käytettiin pelkkää 0,50 M

alustaa saatiin tulokseksi 80 %:n elpyminen ja 60 %:n versoontuminen. Pelkän 0,75 M alustan käyttö johti kyllä yhtä suureen elpymiseen, mutta versoontuminen kärsi jääden vain 47 %:iin.



KUVIO 24. 'Ainon' elpyminen ja versoontuminen erilaisilla sokerikäsittelyillä aktiivihiihtä sisältämättömän esikäsitellyn jälkeen ja ilman

Viimeisessä sokerikäsitteilytestissä kokeiltiin, minkälaisia eroja kaksi erilaista sokerikäsitteilyä saisi aikaan käytettäessä aktiivihiihtä sisältämättömää esikäsitteilyalustaa (ks. kuvio 25). Tätä testattiin kahdella lajikkeella, 'North Bluella' ja 'Ainolla'. Erässä testattiin sekä kaikkien sokerialustojen käyttöä että pelkästään 0,50 M sokerialustan käyttöä. 'North Bluella', käytettäessä vain 0,50 M alustaa, sekä elpyminen että versoontuminen jäivät noin puoleen verrattuna +LN-silmuihin, joilla käytettiin kaikkia sokerialustoja. 'Ainon' tapauksessa +LN-silmut elpyivät lähes yhtä hyvin käytettäessä pelkkää 0,50 M alustaa kuin käytettäessä kaikkia sokerialustoja, mutta versoontuminen jäi vain noin puoleen verrattuna toisiin silmuihin. Kaiken kaikkiaan 'North Blue' ylsi 60 %:n elpymiseen ja 55 %:n versoontumiseen ja 'Aino' 95 %:n elpymiseen ja 80 %:n versoontumiseen käytettäessä aktiivihiihtä sisältämättömää esikäsitteilyalustaa ja kaikkia kolmea sokerikäsitteilyalustaa.



KUVIO 25. Kahden sokerikäsittelyn vertailua ilman aktiivihäiltä 'North Bluella' ja 'Ainolla'

7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

7.1 Tuloksien tarkastelu

7.1.1 Yleiset huomiot tuloksista ja lajikkeiden väliset erot

Tulokset olivat erittäin onnistuneet usealtakin kannalta. Ensinnäkin, viittä 10 silmun koe-erää lukuun ottamatta, kaikissa erissä silmujen versoontuminen oli 10 % tai enemmän. Näistä viidestä ”epäonnistuneesta” erästä kahdessa oli hometta ja kahdessa bakteeri eli ainoastaan yksi koe-erä jäi kokonaan versomatta. Lisäksi kaikista +LN-kokeiden silmuista yhteensä keskimäärin 12 % versoi siten, että ne voitiin luokitella luokkiin I tai II.

Lajikkeiden välillä huomattavat eroavaisuudet (ks. kuvio 16) voivat johtua joko niille tehdyistä keskenään vaihtelevista käsittelyistä, lajike-eroista tai todennäköisesti molemmista. ’North Bluen’ silmuista suuri osa jäi elpymättä, mikä voi johtua esimerkiksi siitä, ettei se mikrolisäysolosuhteissakaan versoonnu yhtä hyvin kuin ’Aino’ ja ’Saani’. Toisaalta myös ’Saaniin’ silmuista viidesosa jäi elpymättä ja versoontuneisakin oli paljon kuolleita, vaikka ’Saaniin’ pitäisi olla Suomessa tähän asti tunnetuista lajikkeista talvenkestävin. Tämä johtuu todennäköisesti ’Saanille’ tehdyistä epäedullisemmista käsittelyistä, sillä ’Saanilla’ testattiin paljon muun muassa aktiivihiielen sopivuutta esikasvatukseen. Kun taas tarkastellaan ’Ainon’ tuloksia, voidaan havaita versoontuneiden silmujen luokan III olevan melko suuri suhteessa muihin luokkiin. Tämä johtuu todennäköisesti myöhemmin mainittavasta versoontuneiden luokituksen epäso- pivuudesta.

7.1.2 PVS2-käsittelyajan testaaminen

Yksi tärkeimmistä kryosäilytyksen onnistumiseen vaikuttavista tekijöistä on PVS2-käsittelyaika. Myös tässä työssä vitrifikaation onnistuminen riippui käsittelyn pituudesta eli siitä, kuinka hyvin silmujen sisältämä solunsisäinen vesi ehti korvautua. PVS2-käsittelyajan jäädessä liian lyhyeksi tätä ei tapahdu, jolloin solut kuolevat vitrifikaation epäonnistuessa ja veden kristallisoituessa. Mikäli käsittelyaika taas on liian

pitkä, altistuvat silmut PVS2-liuoksen toksisille vaikutuksille, mikä johtaa silmujen kuolemaan. Oikean pituisen käsittelyajan määrittäminen onkin menetelmän onnistumisen kannalta ehkä tärkein vaihe.

Aikataulun kiireellisyyden ja koe-erien vähäisen määrän vuoksi PVS2-käsittelyaikaa testattiin vain kahdella lajikkeella kolmesta. Koska yksi muuttuja oli eliminoitava aikaisessa vaiheessa pois, jotta muitakin muuttujia ehdittäisiin tutkimaan, jouduttiin jatkossa tehtävien kokeiden PVS2-käsittelyaika päättämään näiden kahden koe-erän antamien tuloksien perusteella. Päätöstä vaikeutti lisäksi se, että päätös jouduttiin perustamaan pelkästään elpyneiden silmujen määrään, koska ei ollut aikaa odottaa, että silmut alkaisivat versoa. Kahdella lajikkeella tehdyt tutkimukset olivat kuitenkin suuntaa antavia ja niiden perusteella pystyttiin näkemään, mikä käsittelyaika antaisi todennäköisesti parhaita tuloksia. Kuvioden 18 ja 19 perusteella voidaan todeta 60 minuutin PVS2-käsittelyajan olevan edullisin perjantaina eristetyille silmuille. Vaikka 'Saanilla' 40 minuutin käsittelyaika antoikin hiukan parempia tuloksia versoontumisen osalta, voidaan se laskea tilastolliseksi poikkeamaksi ja pitää 60 minuutin käsittelyaikaa merkittävämpänä tuloksena. Molemmilla testatuilla lajikkeilla saavutetaan tällä 60 minuutin käsittelyllä todella hyviä tuloksia. Myös muiden työn aikana suoritettujen kokeiden onnistumisen perusteella lopuissa kokeissa käytetty 60 minuutin käsittelyaika oli onnistunut valinta.

PVS2-käsittelyaikojen sopivuutta maanantaina otetuille silmuille ei testattu lainkaan. Koska silmuissa oleva meristeemisolukko jatkaa kasvuaan myös maljalla ollessaan, on hyvin mahdollista, että silmut kasvavat kokoa viikonlopun aikana ollessaan toipumisolustalla. Suuremmat silmut vaativat pidemmät käsittelyajat ja pienemmille riittäisi hieman lyhyempikin. Perjantaina otetuille silmuille sopiva käsittelyaika voikin siis olla maanantaina otetuille silmuille liian pitkä. Koska muiden testauksien yhteydessä todettiin perjantaina eristettyjen silmujen selviävän paremmin, ei tällä ole juurikaan merkitystä tämän tutkimuksen kannalta. Jatkotutkimuksissa tähän voitaisiin kuitenkin kiinnittää enemmän huomiota.

7.1.3 MS-maljan käyttö ja aktiivihiihden merkitys

PVS2-käsittelyajan tapaan myös toipumisalustan valinta ja sen tarpeellisuus olivat tulosten perusteella melko yksiselitteisiä jopa näinkin suppealla testauksella. Niiden merkitystä koko kryosäilytysprosessissa ei tulisikaan vähätellä, sillä kolmen vuorokauden toipuminen voi olla ratkaiseva tekijä silmujen kryokestävyyden kannalta.

Kuvioiden 20 ja 21 tulosten perusteella voitiin havaita aktiivihiihden läsnäololla olevan epäsuotuisa vaikutus silmujen selviytymiseen. 'Ainolla' ja 'Saaniilla' erot aktiivihiilettömään alustaan eivät kuitenkaan olleet huomattavia vaan jäivät muutama prosenttiin sekä elpymisen että versoontumisen osalta. Todennäköisesti sekä 'Aino' että 'Saani' selviytyisivät lähes yhtä hyvin niin aktiivihiilettömällä kuin aktiivihiihdeillä maljallakin. 'North Bluen' selviytyminen oli kuitenkin paljon heikompaa aktiivihiihdeillä maljalla; sekä elpyminen että versoontuminen putosivat noin puoleen aktiivihiihdeillä alustaa käytettäessä. On siis suositeltavaa käyttää aktiivihiihdeillä toipumisalustaa kaikilla lajikkeilla, koska se ei kahdelle muulle lajikkeelle ole haitaksi.

Työn aikana tutkittiin myös mahdollisuutta jättää toipumisalusta kokonaan pois ja eristää silmut maanantaina. Tämäkin variaatio voitiin tulosten perusteella hylätä, sillä molemmilla kerroilla sitä testattaessa, tulokset olivat muihin verrattuna selvästi huonompia versoontumisen kannalta. Koska kryosäilytyksen jälkeen tavoitteena on saada silmut nimenomaan versomaan, ei tämä ollut toivottavaa. Kuvioissa 22 ja 24 on tutkittu maanantaina eristettyjen silmujen elpymistä ja versoontumista. Kaikissa kokeissa silmut elpyivät lähes yhtä hyvin kuin perjantaina eristetyt, mutta versoontuminen jäi noin puoleen. Tämän perusteella silmuja ei siis kannata eristää maanantaisin vaan on suositeltavaa eristää ne perjantaisin ja käsitellä viikonlopun yli aktiivihiilettömällä Murashige–Skoog-esikasvatusalustalla. Tällä tavalla silmut toipuvat kolmen vuorokauden (ma–to) sijasta kuusi vuorokautta (pe–to), mikä on ratkaisevaa niiden kryokestävyyden kannalta.

7.1.4 Sokerikäsittelyjen arviointi

Parhaan sokerikäsittelyn määrittäminen oli valituista muuttujista ehdottomasti vaikein optimoitava. Erilaisten sokerikäsittelyjen määrä vaikeutti asiaa ja lisäksi työn aikana ei ollut tarpeeksi aikaa suorittaa tarvittavia toistoja ja rinnakkaiskokeita. Jotta saataisiin kokonaisvaltainen yleiskuva siitä, mikä sokerikäsittely sopisi kaikille lajikkeille, tulisi erilaisia sokerikäsittelyjä tutkia lisää. Tämän työn puitteissa tehtyjen testien perusteella voidaan kuitenkin laatia tiettyjä suosituksia.

Kuvioiden 21, 24 ja 25 perusteella voitaisiin melko hyvin perustein suositella aktiivihielettömän esikäsittelyalustan kanssa käytettäväksi kaikkia sokerikäsittelyalustoja. Vaikka kuvion 24 mukaan pelkkä 0,50 M alustan käyttö antoi paremman tuloksen, eivät kuvion 25 tulokset tukeneet tätä päätelmää. Lisäksi kuviossa 24 kaikilla sokerialustoilla olleet silmut versoivat lähes yhtä hyvin kuin pelkällä 0,50 M alustalla olleet ja elpyivät paremmin. Kuviossa 21 taas parhaan tuloksen antoi käsittely, jossa silmut olivat ensin vuorokauden 0,25 M alustalla ja sitten kaksi vuorokautta 0,50 M alustalla. Tässä kokeessa ei kuitenkaan ylletty kuin korkeintaan 50 %:n versomiseen, kun taas muut kuvaajat antoivat parempia tuloksia muilla sokerikäsittelyillä. Kaiken kaikkiaan kolmen, konsentraatioiltaan nousevan sokerialustan käyttö on suositeltavaa.

Kuvion 23 mukaan 0,75 M sokerialustan käyttö olisi hyödyllistä aktiivihielettöisellä maljalla olleille silmuille. Tulokset poikkesivat selvästi muiden kokeiden antamista suuntaviivoista. Näillä tuloksilla ei kuitenkaan tämän työn lopputuloksen kannalta ollut juurikaan merkitystä, koska työn aikana päädyttiin käyttämään aktiivihielettöistä sisältämätöntä esikäsittelyalustaa. Mikäli aktiivihielettöisen alustan käyttö ei esimerkiksi sovi kaikille lajikkeille, voidaan näitä tuloksia kuitenkin käyttää hyväksi kehitettäessä parempia menetelmiä niille.

Kaiken kaikkiaan eri sokerikäsittelyiden tuloksien erot eivät ole tarpeeksi selvät, jotta niistä voitaisiin tehdä yksiselitteisiä johtopäätöksiä. Työn aikana saatujen tulosten perusteella kolmen, konsentraatioiltaan nousevan (0,25 M, 0,50 ja 0,75 M) sokerialustan käyttö on suositeltavaa. Etenkin sokerikäsittelyjä tutkittaessa jatkotutkimukset olisivat hyödyllisiä.

7.1.5 Versoontuneiden silmujen havainnointiviikon merkitys

Versoontuneiden silmujen havainnointien kehitystä havainnollistettiin kuviossa 17. Kuvion mukaan sekä luokkien I ja II yhteenlaskettu osuus että kuolleiden osuus kasvoivat sen mukaan mitä pidempi aika oli erlenmeyeriin laittamisesta. Viikkojen 8 ja 12 välillä luokkien I ja II osuus ei kuitenkaan kasvanut kuin 2 prosentilla, toisin kuin kuolleiden versojen osuus, joka kasvoi 15 prosentilla. Tuloksissa todettiin myös, että viikkojen 8 ja 12 välillä luokan I suhteellinen osuus kasvoi merkittävästi, vaikka luokkien I ja II yhteenlaskettu osuus ei juuri kasvanutkaan. Näennäisesti olisi siis hyvä havainnoida versoontuneet silmut vasta 12 viikon päästä erlenmeyeriin laittamisesta. Koska myös kahdeksannella viikolla havainnoidut luokan II versot kuitenkin riittäisivät viljelmän perustamiseen, ei kannata ottaa turhaa riskiä versojen kuolemista, mikä on erittäin varteenotettava riski havainnoitaessa vasta 12 viikon päästä. Suositeltavaa olisi siis tarkkailla versoontuneet silmut kahdeksan viikon kuluttua niiden laittamisesta erlenmeyeriin.

7.2 Työn aikana ilmenneet ongelmat

7.2.1 Versoontuneiden silmujen luokitus

Työn aikana ilmenneistä ongelmista suurin ja tulosten kannalta todennäköisesti vaikuttavin oli versoontuneiden silmujen luokituksen määrittämisen yhteydessä tapahtunut virhearviointi. Tähän vaikutti suuresti se, että pensasmustikoiden luontaista punasävytteisyyttä ei ymmärretty ottaa tarpeeksi hyvin huomioon alusta alkaen. Versoontuneiden luokitus perustettiin ensimmäisten kahden koe-erän tuloksille ja näissä koe-erissä käytettiin juuri niitä kahta lajiketta, joissa punasävytteisyys ei ilmene niin vahvasti kuin kolmannessa lajikkeessa. Tästä johtuen luokitus perustui pitkälti versojen niin sanottuun hyvään väriin, jonka oletettiin olevan vihreä. Tämä aiheutti sen, että osa versoista, jotka olisivat muuten kuuluneet luokkiin I tai II, olikin nyt luokiteltu luokkiin II ja III (ks. kuvio 26). Mikäli luokitus olisi ollut kohdallaan, olisivat tilastolliset tulokset voineet parantua huomattavasti.

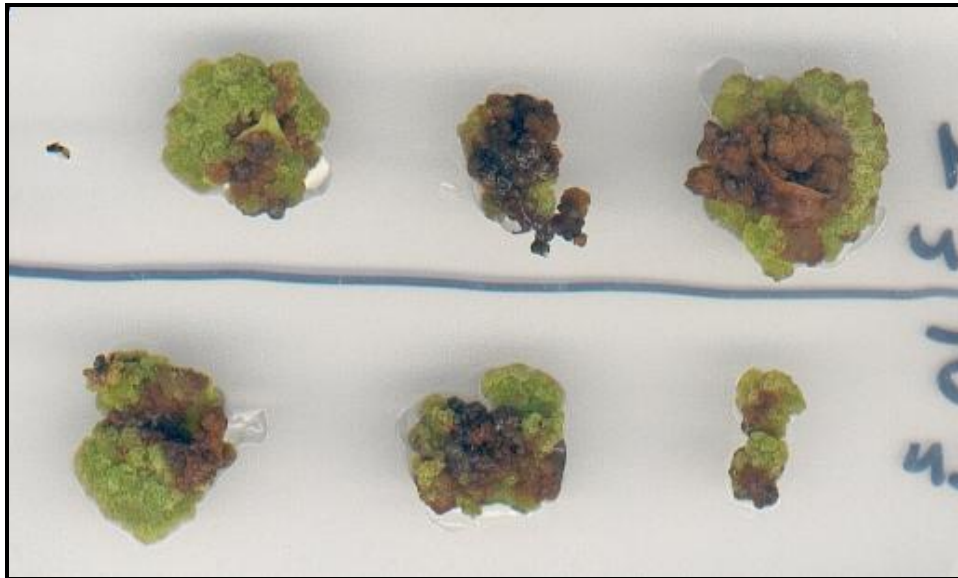
Havainnointiin vaikutti myös kasvatusalustojen vanheneminen. Kasvi kuluttaa kasvatusalustalla ollessaan alustalla olevia kasvihormoneja ja jossain vaiheessa ne käyvät vähiin. Tällöin kasvi alkaa nuupahtaa ja sen normaali kasvu kääntyy, kuten kuvion 26 ensimmäisessä kuvassa. Tätä esiintyi versoontuneiden toisella ja kolmannella havainnointikerralla (8 ja 12 viikon päästä siirtämisestä erlenmeyeriin).



KUVIO 26. Esimerkkejä versoontuneista silmuista. Vasemmalla luokan I verso, joka on kooltaan hyvä, mutta alkanut jo haalistua vanhuuttaan. Keskellä luokan I (takana) ja II (edessä) versot, joissa näkyy selvästi 'Ainolle' tyypillinen punasävyteisyys. Oikealla luokan III erittäin pieniä versoja.

7.2.2 Kallussolukon kasvaminen

Toinen huomattava työn aikana esiintynyt ongelma oli kallussolukon kasvaminen. Kuten jo aiemmin todettiin, kallussolukon muodostuminen ei ole suotavaa, koska kallussoluille ovat tyypillisiä perimän muutokset, jotka taas ovat kryosäilytyksen tavoitteen kannalta erittäin ei-toivottuja. Sekä -LN-kokeet että +LN-kokeet kehittivät kokeiden aikana yhtäläillä kallusta ja, kuten kuvioista 27 voidaan huomata, on kokoero normaalikokoisen silmun (maljalla vasemmassa laidassa ylhäällä) ja kallusta kehittäneen silmun välillä huomattavan suuri.

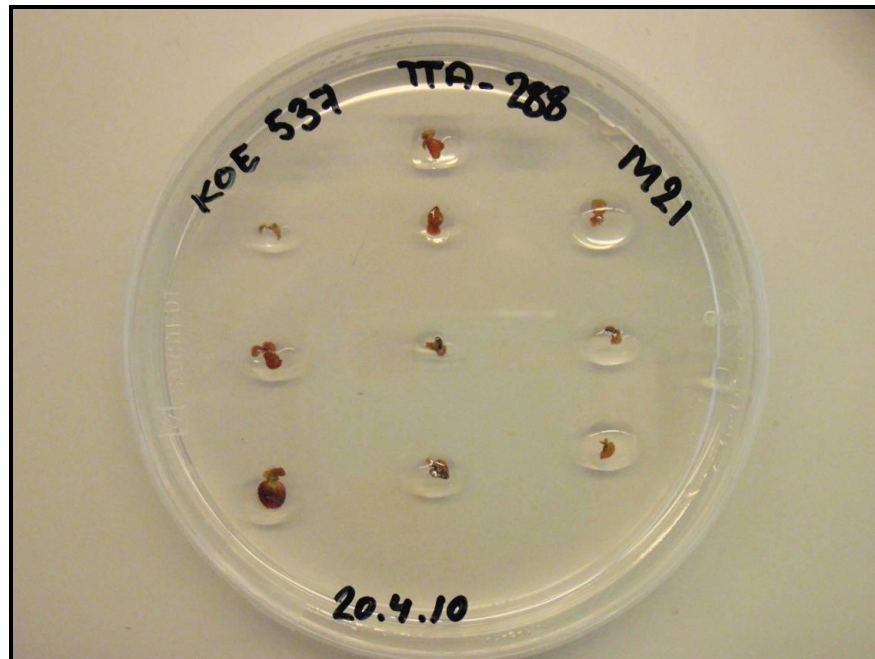


KUVIO 27. Käsittelyt silmut kasvoivat runsaasti kallusta (Kuva: Anna Nukari)

Silmut olisi mahdollista saada versomaan paremmin käyttämällä toisenlaista regeneraatioalustaa, jossa hormonipitoisuudet olisivat erilaiset kuin tässä työssä käytetyissä alustoissa.

7.2.3 Kosteuden tiivistyminen

Kolmas työn aikana ilmennyt ongelma oli maljoilla olleen kosteuden tiivistyminen silmujen ympärille. Tämä ongelma ei johtunut niinkään itse työstä tai sen vaiheista vaan harkitusta poikkeamisesta normaaleista työtavoista. Koska maljojen kulutus oli varsinkin kokeiden alkuvaiheessa todella suurta, jouduttiin niitä valamaan erittäin suuria määriä kerrallaan. Normaalisti maljat valetaan laminaarikaapissa siten, että ne jätetään kansi auki jäähtymään, jotta ylimääräinen kosteus pääsisi haihtumaan jo tässä vaiheessa. Koska maljoja valettiin työn aikana kuitenkin useita kymmeniä ellei satoja kerrallaan, ei niiden kuivattamiseen ollut tilaa vaan ne jouduttiin heti niiden jähmettyttyä laittamaan steriileihin pusseihin ja säilytykseen. Kun maljat otettiin käyttöön, niihin jäänyt kosteus kertyi maljoille asetettujen silmujen ympärille (ks. kuvio 28).



KUVIO 28. Kosteuden tiivistyminen silmujen ympärille sulatuksen jälkeen

Maljoille jäänyt kosteus huomattiin onneksi ajoissa ja asia saatiin korjattua. Ylimääräinen kosteus kuivattiin silmujen ympäriltä laminaarikaapissa imupaperisuikaleilla, joita leikattiin ja steriloidtiin varta vasten tähän tarkoitukseen. Jatkossa silmuja ei laitettu maljoille suoraan vaan maljojen annettiin olla laminaarikaapissa avoinna ennen silmujen asettamista niille. Näin saatiin ylimääräinen kosteus haihtumaan eikä silmujen ympärille enää tiivistynyt kosteutta.

7.2.4 Toipumisalustojen vertailukelpoisuus

Työn toteutuksen aikana käytettiin pensasmustikoiden silmuilla toipumisalustoina kryolaboratoriossa aikaisemmin käytössä olleita alustatyyppejä. Tämän ratkaisun taustalla oli oletus, jonka mukaan aktiivihieletön ja aktiivihieellinen toipumisalusta sisälsivät aktiivihieiltä lukuun ottamatta keskenään samoja aineita. Molempien oletettiin ennen kaikkea olevan hormonittomia. Tämä ei kuitenkaan pitänyt paikkaansa vaan aktiivihiealustaan oli lisätty myös IBA- (0,05 mg/l) ja BAP-kasvihormoneja (0,5 mg/l), joita ei normaalisti käytetä pensasmustikan kasvatusalustoissa. Työn toteutusta varten olisi siis pitänyt erikseen valmistaa aktiivihieellistä kasvatusalustaa, joka olisi aktiivihieiltä lukuun ottamatta vastannut hormonitonta alustaa. Pohdittaessa maljojen erilaisuuden vaikutusta työn tuloksiin päädyttiin siihen, ettei virheellä loppujen

lopuksi ollut kovin suurta vaikutusta silmujen selviämiseen kryokäsittelyistä. Koska silmut olivat toipumisalustalla vain kolme vuorokautta, eivät hormonit ehtineet vaikuttaa niihin kauaa. Lisäksi aktiivihieillä on taipumusta alentaa hormonien tehokkuutta, joten hormonit eivät tämänkään vuoksi vaikuttaneet paljon silmuihin.

7.3 Menetelmäsuositus

Tutkimuksen koetulosten perusteella pensasmustikoille voidaan laatia suositeltava kryosäilytysmenetelmä. Suositeltavan menetelmän mukaisesti silmut eristetään pensasmustikan neljän viikon ikäisistä *in vitro* -aineistoista perjantaisin. Eristettävien silmujen tulee olla kärkisilmuja, jotka ovat kooltaan 0,5–1,0 mm. Eristetyt silmut siirretään toipumaan aktiivihielettömälle, hormonittomalle MS-maljalle. Silmuja pidetään aktiivihielettömällä esikäsitteilyalustalla kolme vuorokautta, minkä jälkeen ne siirretään ensin 0,25 M sakkaroosimaljalle, sitten 0,50 M sakkaroosimaljalle ja lopuksi 0,75 M sakkaroosimaljalle. Silmut ovat kullakin sokerimaljalla yhden vuorokauden. Vitrifikaatiokäsittelyt ja pakastus suoritetaan torstaisin, jolloin silmuja pidetään LS-liuoksessa 30 minuuttia ja PVS2-liuoksessa 60 minuuttia. Siirtäminen liuksesta toiseen tehdään ilman imupaperia. Vitrifikaatiokäsittelyt tehdään huoneenlämmössä.

Sulatus suoritetaan laittamalla putki 3 minuutiksi lämpöhauteeseen, jonka lämpötila on 40 °C. Sulatuksen jälkeen kryoputkeen pipetoidaan laminaarikaapissa 2 ml 1 M sakkaroosiliuosta ja sen annetaan vaikuttaa 30 minuuttia pimeässä. Lopuksi silmut kaadetaan petrimaljalle, josta ne nostetaan imupaperin kautta sakkaroosipohjaiselle maljalle. Maljaa pidetään pimeässä folion alla viisi vuorokautta ja varjostuksessa harson alla kaksi vuorokautta.

Pensasmustikan silmut olisi hyvä havainnoida ensimmäisen kuukauden ajan viikon välein (lähinnä kontaminaatioiden varalta), jonka jälkeen ne havainnoidaan kahden viikon välein. Maljoilla olevien silmujen havainnointia jatketaan 4–6 kuukauden ajan. Versoontuneet silmut siirretään erlenmeyereihin (4 kpl/erlenmeyer) ja ne havainnoidaan sekä neljän että kahdeksan viikon päästä siirrosta.

7.4 Suositeltavat jatkotutkimukset

Jotta menetelmä voitaisiin ottaa täysimittaisesti käyttöön, olisi suositeltavaa tehdä jatkotutkimuksia. Työn toteutuksen aikana useita muuttujia testattiin vain yhdellä tai kahdella lajikkeella tai niitä testattiin vain kerran. Tulosten luotettavuuden kannalta kaikista testeistä tulisi suorittaa useita toistoja ja niitä tulisi testata ainakin kaikilla testeihin valituilla lajikkeilla, mieluummin useammallakin lajikkeella, jotta saataisiin varmistettua menetelmän sopivuus pensasmustikoille lajina.

Vaikka PVS2-käsittelyaika saatiin työn tulosten perusteella optimoituksi, sitä olisi hyvä testata vielä kolmannellakin lajikkeella 'Ainolla'. Näin saataisiin varmistettua ajan sopivuus myös 'Ainolle'. Mahdollisuuksien mukaan myös kahdella muulla lajikkeella tulisi tehdä toistokokeita.

Aktiivihieleistä toipumisalustaa kannattaisi vielä vertailla aktiivihielettömän kanssa alustojen hormonipitoisuuksissa sattuneen virheen vuoksi. Tätä varten tulisi valmistaa hormonittomia aktiivihieleistä alustoja, jotka muuten vastaisivat hormonitonta, aktiivihielettömää MS-alustaa. Samat testit, joita tehtiin tämän työn aikana, voitaisiin näillä alustoilla toteuttaa uudelleen käyttäen uusia, hormonittomia alustoja ja suorittaen useampia toistoja.

Sokerikäsittelyjen jatkotutkimuksissa kannattaisi keskittyä vertailemaan keskenään kaikkien sokerialustojen ja pelkästään 0,50 M sokerialustan käyttämistä. Tutkittaessa pelkän 0,50 M sokerialustan käyttämistä, tulokset olivat keskenään ristiriitaisia. Samalla lajikkeella saatiin toisessa koe-erässä yhtä hyvät tulokset kuin kaikkien sokerialustojen käytöllä, mutta toisessa erässä taas sekä elpyminen että versoontuminen olivat selvästi huonompia. Olisi mielenkiintoista kokeilla saataisiinko uusilla testeillä keskenään yhteneviä tuloksia.

Myös regeneraatioalustana käytetyn sakkaroosialustan sopivuutta tulisi testata lisää. Koska kalluksen muodostaminen osoittautui työn aikana ongelmaksi, olisi hyvä, jos sitä saataisiin vähennettyä toisenlaista kasvatusalustaa käyttämällä. Tämä vaatisi kasvatusalustan hormonipitoisuuksien muuttamista tai jonkin hormonin vaihtamista toiseen.

LÄHTEET

1st International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species. 2009. Tieteellisen kokouksen asialista. Viitattu 16.9.2010.

<http://www.biw.kuleuven.be/dtp/tro/ISHSPlantCryo/#>

Aaltonen, M., Antonius, K., Hietaranta, T., Karhu, S., Kinnanen, H., Kivijärvi, P., Nukari, A., Sahramaa, M., Tahvonen, R. & Uosukainen, M. 2006. Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet; hedelmä- ja marjakasvit. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.

Banttari, E. 1987. Viljeltyjen, talvenkestävien mustikoiden solukkoviljely, lisääminen, kasvatustavat ja taudit. Lajikekuvaus. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.

Haapala, T. & Niskanen, A.-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. Helsinki: Opetushallitus.

Helmenstine, A. n.d. Chemistry of Autumn Leaf Color. Viitattu 15.9.2010.

<http://chemistry.about.com/library/weekly/aa082602a.htm>

Innovaatioita uusiutuvista luonnonvaroista 2009. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen internet-sivustot. Viitattu 4.11.2010.

<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely>

Karhu, S. & Parikka, P. 2004. Pensasmustikan marjojen pilaaja on löytynyt. Puutarha & Kauppa 3/2004. 6–7.

Kaskinen H. 2007. Artosta tulee ykkösmarja. Koelypsy 2/2007. Viitattu 1.11.2010.

<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Koelypsy/22007/Artosta%20tulee%20ykk%F6s%20marja>

Kasurinen, A., Helppi, K., Holopainen, T. & Anttonen, S. 1998. Pensasmustikan mykorrhitsoja tutkittu. Puutarha & Kauppa 47/98. 6–7.

Kasvigeenivaraohjelma. n.d. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen internet-sivustot. Viitattu 4.11.2010.

<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Tietopaketti/Kasvigeenivarat>

Lajikekuvaus/Aino. n.d. Moniste. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.

Leaf Pigments 2008. Harvardin yliopiston Internet-sivustot. Viitattu 16.9.2010.

http://harvardforest.fas.harvard.edu/research/leaves/leaf_pigments.html

Lehmushovi, A., Tahvonen R. & Ylämäki A. 2000. Pensasmustikan lajikkeissa on valinnanvaraa. Puutarha & Kauppa 39. 18–20.

MTT Laukaa 2009. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen internet-sivustot. Viitattu 4.11.2010.

<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely/toimipaikat/laukaa>

- Nukari, A. & Rantala, S. 2009. Laukaan kryopankin menettelyohje. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.
- Nukari, A. & Uosukainen, M. 2006. Testattujen puutarhakasvien pitkäaikaisvarastointi kylmäsäilytyksen avulla. Loppuraportti. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema.
- Panis, B., Piette, B. & Swennen, R. 2004. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*.
- Pankakoski, A. 1990. Puutarhurin kasvioppi. Helsinki: Ammattikasvatushallitus.
- Parikka, P. 1996. Mustikkasyöpä pensasmustikan vaivana. Puutarha 4/96. 208.
- Pensasmustikka hurmaa. 2009. Puutarha-netin artikkeli.
<http://puutarha.net/index.asp?s=/artikkelit/127/pensasmustikka+hurmaa.htm>
- Reed, B. 2008. Plant cryopreservation; a practical guide. New York, USA: Springer.
- Saario, M. 2008. Kotipuutarhan marjat ja hedelmät. Hämeenlinna: Karisto Oy.
- Tahvonen R. n.d. Seuraavien vuosien kotimaiset marjalajikeuutuudet. Moniste. MTT puutarhatuotanto. Piikkiö.
- Veteläinen, M. n.d. Kasvigeenivarojen säilytys, MTT. Viitattu 14.10.2010.
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Tietopaketti/Kasvigeenivarat/Kasvigeenivarat/S%E4ilytysmenetelm%E4t>
- Vuosikertomus 2009. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. Viitattu 14.10.2010. <https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely/vuosikertomus>

LIITTEET

Liite 1. Työn aikana käytetyt liuokset ja kasvatusalustat

Loading solution eli LS-liuos (pH 5,8)

(käytössä ensimmäisenä vitrifikaatioliuoksena)

184 g/l	glyserolia
137 g/l	sakkaroosia
4,3 g/l	Murashige Skoog –jauhetta

Plant vitrification solution 2 eli PVS2-liuos (pH 5,8)

(käytössä toisena vitrifikaatioliuoksena)

300 g/l	glyserolia (30 %)
150 g/l	etyleeniglykolia (15 %)
150 g/l	dimetyylisulfoksidia (15 %)
137 g/l	sakkaroosia
4,3 g/l	Murashige Skoog –jauhetta

1M sakkaroosipohjainen pesuliuos (pH 5,8)

(käytössä silmujen sulatuksen yhteydessä)

342 g/l	sakkaroosia
4,3 g/l	Murashige Skoog –jauhetta

Sakkaroosipohjainen kasvatusalusta (1 litra)

(käytössä mikropistokkailla ennen silmujen eristystä sekä regeneraatioalustana)

Alusta sisältää suoloja, jotka lisätään seitsämän perusliuoksen muodossa sekä vitamiineja, kasvuhormonia, mesoinositolia, sakkaroosia ja agaria. Perusliuoksia, vitamiiniliuosta ja zeatiiniliuosta lisätään litraan kasvatusalustaliuosta seuraavasti:

Perusliuos 1 (25 ml)

16 g/l	NH_4NO_3
3,84 g/l	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Perusliuos 2 (50 ml)

0,78 g/l	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	laimennetaan litraan Na_2EDTA :lla
----------	--	--

Perusliuos 3 (50 ml)

19,8 g/l	K_2SO_4
----------	-------------------------

Perusliuos 4 (17 ml)10 g/l KH_2PO_4 **Perusliuos 5 (25 ml)**22,24 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ **Perusliuos 6 (10 ml)**0,62 g/l H_3BO_3
0,025 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ **Perusliuos 7 (10 ml)**37 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
2,23 g/l $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$
0,86 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
0,025 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ **Vitamiiniliuos (10 ml)**0,2 g/l glysiiniä
0,05 g/l nikotiinihappoa
0,05 g/l pyridoksiinihappoa
0,1 g/l tiamiinia**Zeatiiniliuos (10 ml)**

10 mg/l zeatiinia

Edellä mainittujen liuosten lisäksi seokseen lisätään myös

20 g/l sakkaroosia
0,1 g/l mesoinositolia
4 g/l Apteekin agaria
3,75 g/l Rothin agaria
0,27 g/l Bacto-peptonea

Kasvatusalustaliuoksen pH säädetään 5,2:een.

0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M Murashige–Skoog-alustat (pH 5,6-5,8)
(käytössä silmujen esikäsittelyssä nostettaessa silmujen sokeripitoisuutta)

Alustat sisältävät agaria, vitamiineja, myoinositolia, gelriittiä sekä vaihtelevan määrän sakkaroosia. Litra alustaa sisältää aineita seuraavasti:

4,3 g/l	MS-jauhetta (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture Plant Cell, Sigma Aldrich, USA)
0,10 g/l	myoinositolia
2,6 g/l	gelriittiä
10 ml/l	vitamiiniliuosta (koostumus mainittu kasvatusalustan ohjeen yhteydessä)

85,5 g/l tai 171 g/l tai 256,5 g/l sakkaroosia riippuen alustan sokeripitoisuudesta

Hormoniton Murashige–Skoog-alusta (pH 5,6-5,8)
(käytössä esikäsittelyn yhteydessä)

Alusta sisältää agaria, vitamiineja, myoinositolia, gelriittiä, Bacto-peptonea sekä sakkaroosia. Litra alustaa sisältää aineita seuraavat määrät:

4,3 g/l	MS-jauhetta
10 ml/l	vitamiiniliuosta (koostumus mainittu kasvatusalustan ohjeen yhteydessä)
0,10 g/l	myoinositolia
30 g/l	sakkaroosia
2,6 g/l	gelriittiä
0,27 g/l	Bacto-peptonea

Aktiivihiihtä sisältävä Murashige–Skoog-alusta (pH 5,6-5,8)
(käytössä esikäsittelyn yhteydessä)

Alusta sisältää agaria, vitamiineja, kasvihormoneja, aktiivihiihtä, gelriittiä sekä sakkaroosia. Litra alustaa sisältää aineita seuraavasti:

4,3 g/l	MS-jauhetta
10 ml/l	vitamiiniliuosta (koostumus mainittu kasvatusalustan ohjeen yhteydessä)
5 ml/l	BAP-liuosta
0,5 ml/l	IBA-liuosta
2,5 g/l	aktiivihiihtä
2,6 g/l	gelriittiä
30 g/l	sakkaroosia

BAP-liuos sisältää 100 mg/l BAP-hormonia. Samoin IBA-liuos sisältää 100 mg/l IBA-hormonia.

Liite 2. Kokeiden tulokset taulukoituna

Koeno	Lajike	Silmujen eristämispvm	-LN/+LN	Elpymis-%	Versoontumis-%
M1	NB	pe	-	90 %	40 %
M2	NB	pe	+	10 %	10 %
M3	NB	pe	+	40 %	40 %
M4	NB	pe	+	20 %	20 %
M5	NB	pe	-	50 %	20 %
M6	NB	pe	+	60 %	50 %
M7	NB	pe	+	HOME	
M8	NB	pe	+	33 %	22 %
M9	NB	pe	-	90 %	70 %
M10	NB	pe	+	20 %	20 %
M11	NB	pe	+	30 %	20 %
M12	NB	pe	+	HOME	
M13	NB	pe	-	100 %	70 %
M14	NB	pe	+	70 %	50 %
M15	NB	pe	+	90 %	60 %
M16	NB	pe	+	70 %	60 %
M17	S	pe	-	100 %	80 %
M18	S	pe	+	30 %	10 %
M19	S	pe	+	90 %	30 %
M20	S	pe	+	40 %	30 %
M21	S	pe	-	100 %	73 %
M22	S	pe	+	64 %	45 %
M23	S	pe	+	89 %	33 %
M24	S	pe	+	80 %	30 %
M25	S	pe	-	100 %	70 %
M26	S	pe	+	70 %	70 %
M27	S	pe	+	70 %	60 %
M28	S	pe	+	80 %	50 %
M29	S	pe	-	90 %	80 %
M30	S	pe	+	70 %	40 %
M31	S	pe	+	100 %	80 %
M32	S	pe	+	78 %	56 %
M33	NB	pe	-	BAKTEERI	
M34	NB	pe	+	60 %	30 %
M35	NB	pe	+	60 %	60 %
M36	NB	pe	+	50 %	30 %
M37	NB	pe	+	50 %	40 %
M38	NB	pe	-	100 %	60 %
M39	NB	pe	+	100 %	90 %

Koenro	Lajike	Silmujen eristämispvm	-LN/+LN	Elpymis-%	Versoontumis-%
M42	NB	pe	+	90 %	80 %
M43	A	pe	-	80 %	60 %
M44	A	pe	+	90 %	90 %
M45	A	pe	+	91 %	82 %
M46	A	pe	+	90 %	90 %
M47	A	pe	+	80 %	80 %
M48	A	pe	-	100 %	90 %
M49	A	pe	+	90 %	80 %
M50	A	pe	+	100 %	90 %
M51	A	pe	+	100 %	100 %
M52	A	pe	+	100 %	100 %
M53	S	pe	-	90 %	10 %
M54	S	pe	+	90 %	30 %
M55	S	pe	+	80 %	50 %
M56	S	pe	+	80 %	20 %
M57	S	pe	-	BAKTEERI	
M58	S	pe	+	89 %	33 %
M59	S	pe	+	90 %	70 %
M60	S	pe	+	78 %	33 %
M61	S	pe	-	100 %	90 %
M62	S	pe	+	90 %	0 %
M63	S	pe	+	80 %	60 %
M64	S	pe	+	90 %	80 %
M65	S	pe	-	100 %	100 %
M66	S	pe	+	100 %	30 %
M67	S	pe	+	90 %	40 %
M68	S	pe	+	90 %	80 %
M69	S	pe	-	100 %	40 %
M70	S	pe	+	80 %	30 %
M71	S	pe	+	50 %	20 %
M72	S	pe	+	60 %	30 %
M73	S	pe	+	60 %	30 %
M74	S	pe	+	70 %	40 %
M75	S	pe	+	60 %	30 %
M76	S	pe	+	56 %	22 %
M77	S	pe	-	70 %	50 %
M78	S	pe	+	90 %	40 %
M79	S	pe	+	80 %	40 %
M80	S	pe	+	89 %	44 %
M81	S	pe	-	100 %	60 %
M82	S	pe	+	100 %	70 %

Koenro	Lajike	Silmujen eristämispvm	-LN/+LN	Elpymis-%	Versoontumis-%
M85	A	pe	-	100 %	20 %
M86	A	pe	+	90 %	60 %
M87	A	pe	+	80 %	60 %
M88	A	pe	+	90 %	60 %
M89	A	pe	+	90 %	60 %
M90	A	pe	-	100 %	100 %
M91	A	pe	+	82 %	45 %
M92	A	pe	+	80 %	60 %
M93	A	pe	+	80 %	70 %
M94	A	pe	+	78 %	67 %
M95	A	pe	-	90 %	70 %
M96	A	pe	+	80 %	40 %
M97	A	pe	+	90 %	60 %
M98	A	pe	+	90 %	50 %
M99	A	pe	+	90 %	50 %
M100	A	ma	-	100 %	50 %
M101	A	ma	+	80 %	20 %
M102	A	ma	+	90 %	20 %
M103	A	ma	+	100 %	20 %
M104	A	ma	+	90 %	60 %
M105	NB	pe	-	60 %	40 %
M106	NB	pe	+	40 %	40 %
M107	NB	pe	+	80 %	70 %
M108	NB	pe	-	60 %	30 %
M109	NB	pe	+	30 %	20 %
M110	NB	pe	+	30 %	30 %
M111	A	pe	-	100 %	60 %
M112	A	pe	+	90 %	80 %
M113	A	pe	+	100 %	80 %
M114	A	pe	-	100 %	90 %
M115	A	pe	+	70 %	50 %
M116	A	pe	+	90 %	40 %
M117	NB	ma	-	80 %	50 %
M118	NB	ma	+	70 %	50 %
M119	NB	ma	+	80 %	10 %
M120	A	ma	-	100 %	100 %
M121	A	ma	+	80 %	50 %
M122	A	ma	+	90 %	30 %

Jokainen koenumero edustaa yhtä kymmenen silmun ryhmää. Lajiketunniste on kunkin lajikkeen alkukirjain (A='Aino', NB='North Blue' ja S='Saani').