

---

**KOREANVAAHTERAN (*ACER PSEUDOSIEBOLDIANUM*)  
MIKROVILJELMÄN ALOITUS**



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Puutarhatalouden koulutusohjelma

Lepaa, 13.1.2011

Emma Tuusa

---

Puutarhatalouden koulutusohjelma  
Lepaa

Työn nimi                      Koreanvaahteran (*Acer pseudosieboldianum*) mikroviljelmän aloitus

Tekijä                              Emma Tuusa

Ohjaava opettaja              Mona-Anitta Riihimäki

Hyväksytty                      \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.20\_\_\_\_

Hyväksyjä

LEPAA  
Puutarhatalouden koulutusohjelma  
Kasvihuone- ja taimitarhatuotanto

---

<b>Tekijä</b>	Emma Tuusa	<b>Vuosi</b> 2011
<b>Työn nimi</b>	Koreanvaahteran ( <i>Acer pseudosieboldianum</i> ) mikroviljelmän aloitus	

---

## TIIVISTELMÄ

Koreanvaahteraa (*Acer pseudosieboldianum*) lisätään tavallisesti varttamalla, eikä lajin mikrolisäyksestä ei ole aikaisempaa tietoa. Tästä syystä opinnäytetyöni pohjana käytetään muiden vaahteroiden mikrolisäystutkimusten tuloksia. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on selvittää koreanvaahteran mikrolisäystä ja erityisesti sitä, mikä aloitusalue sopii parhaiten koreanvaahteralle. Lisäysmateriaaliksi haettiin oksia kolmesta eri koreanvaahterayksilöstä Mustilan arboretumista. Koe tehtiin Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa 10.6.- 22.11.2010.

Kokeessa käytetyistä koreanvaahterakannoista ensimmäinen yksilö oli pienilehtinen pikkupuu (KOR A), toinen oli nuori puu, jolla on näyttävä syysväri (KOR B) ja kolmas oli vanhempi puu, joka jättää lehtensä talveksi oksille (KOR C). Viljelmien aloituksissa käytettiin neljää eri ravintoalustaa, WPM + Zeatiini 2 mg/l, WPM + Zeatiini 1,5 mg/l, DKW + Zeatiini 2 mg/l ja LS + BAP 1 mg/l. Kaikille aloituksille käytettiin samaa sterilointimenetelmää, johon kuului huuhtelu ensin saippuvedessä sitten etanolissa ja viimeiseksi natriumhypokloriitissa. Aloitusten tekemisen jälkeen viljelmiä seurattiin ja kaikki infektoituneet tai kuolleet yksilöt poistettiin. Versot siirrettiin tarvittaessa uusille alustoille.

Kokeen tulosten mukaan koreanvaahteran mikrolisäyksen aloitusvaiheeseen sopi parhaiten WPM-alusta, jossa oli 2 mg/l zeatiinia. Huonommiksi alustoiksi osoittautuivat DKW- ja LS-alustat, joilta yksikään aloituspala ei päässyt jatkokasvatukseen, vaan kaikki joko infektoituivat tai kuolivat. Prosentuaalisesti eniten eloon jääneitä versoja kokeen loppuvaiheessa oli KOR B-kannassa (16 %). KOR A-kannan aloituksista eloon jäi 6 % ja KOR C-kannan aloituksista vain 5 %. Jatkokasvatukseen saatiin lopulta viisi yksilöä, joista kolme oli KOR B-kantaa ja kaksi KOR C-kantaa.

**Avainsanat** Vaahtera, mikrolisäys, *Acer pseudosieboldianum*, ravintoalusta

**Sivut** 29 s + liitteet 3 s.

LEPAA  
Degree Programme in Horticulture  
Greenhouse and Nursery Production

---

<b>Author</b>	Emma Tuusa	<b>Year</b> 2011
<b>Subject of Bachelor's thesis</b>	Korean Maple ( <i>Acer pseudosieboldianum</i> ) – Starting a Microculture	

---

## ABSTRACT

Korean maple (*Acer pseudosieboldianum*) is usually propagated by grafting, and there is no knowledge of micropropagating the Korean maple before. That is why the results of micropropagation studies with other maple species were used as a base of this thesis. The goal of my thesis was to study micropropagating of the Korean maple, especially to conclude which culture media would be the best for the starting phase of this micropropagation. The propagation material (young sprouts) was taken from three different Korean maples growing in Mustila arboretum. The experiment was performed in the Lepaa micropropagation laboratory between 10 June and 22 November 2010.

The first one of the three used Korean maple populations used was a small tree with small leaves (KOR A), the other one was a young tree with a spectacular autumn color (KOR B) and the third one was an older tree, which leaves its leaves on for the winter (KOR C). Four growing media were used in the starting phase of these cultures, WPM + Zeatin 2 mg/l, WPM + Zeatin 1,5 mg/l, DKW + Zeatin 2 mg/l and LS + BAP 1 mg/l. The same sterilizing methods were used on all sprouts. These were rinsing first in soap water, then in ethanol and last in sodiumhypochlorite. After starting the cultures they were observed and all infected or dead cultures were removed. The sprouts were moved to a new medium when necessary.

According to the results of this experiment, the best growing media for the starting phase of the Korean maple micropropagation was WPM that included 2 mg/l of zeatin. The worst media were DKW ja LS, of which no sprouts survived, but all were infected or dead. The best percentage of surviving sprouts, were observed with KOR B population (16 %). From KOR A population's sprouts 6 % survived and of KOR C population's sprouts only 5 % survived. Finally only five individuals were moved to the multiplication phase. Three of these belonged to the KOR B population and two to the KOR C population.

**Keywords** Maple, micropropagation, *Acer pseudosieboldianum*, culture media

**Pages** 29 p + appendices 3 p.

---

## KÄSITTEET

Agar	Levästä saatava aine, jonka avulla kasvualusta voidaan hyödyttää.
Auksiinit	Kasvihormoneja, käytetään kasvun edistämiseen.
Autoklaavi	Laite, jonka avulla steriloidaan esimerkiksi laboratoriotarvikkeita.
Bacto Peptone	Valmiste jota lisätään alustoihin mahdollisten infektioiden havaitsemisen nopeuttamiseksi.
BAP	Synteettinen sytokiniini, bentsyyliaminopuriini.
DKW-alusta	Solukkoviljelyalusta.
<i>ex vitro</i>	Normaalissa kasvualustassa tapahtuvaa viljelyä.
Gibberelliinit	Kasvihormoneja, käytetään kasvun edistämiseen.
Infektio	Saastuminen/ tartunta.
<i>in vitro</i>	Esimerkiksi koeputkessa tai lasipurkissa tapahtuvaa viljelyä.
Kallus	Erilaistumatonta kasvisolukkoa.
Laminaari	Steriili työtila, jossa ilmavirta pitää partikkelit poissa ilmasta.
LS-alusta	Linsmaierin ja Folke Skoogen kehittämä solukkoviljelyalusta.
MS-alusta	Toshio Murashigen ja Folke Skoogen kehittämä solukkoviljelyalusta.
Sytokiniini	Kasvihormoneja, käytetään solujen jakautumisen edistämiseen.
WPM-alusta	Gregory Lloydin ja Brent McCownin kehittämä solukkoviljelyalusta puuvartisille kasveille.
Zeatiini	Luonnollinen sytokiniini.

---

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	1
2	VAAHTERAT .....	2
2.1	Vaahterat yleisesti .....	2
2.2	Koreanvaahtera .....	3
3	MIKROLISÄYS .....	4
3.1	Ravintoalustat .....	4
3.2	Kasvihormonit .....	6
3.3	Lisäyksen vaiheet .....	7
3.4	Vaahteroiden mikrolisäys .....	8
4	AINEISTO JA MENETELMÄT .....	11
4.1	Lisäysmateriaali .....	11
4.2	Sterilointi .....	14
4.3	Aloitusalustat .....	15
4.4	Jatkokasvatus .....	17
5	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	18
5.1	Pienilehtinen pikkupuu KOR A .....	18
5.2	Upean syysvärin koreanvaahtera KOR B .....	19
5.3	Talvilehtinen koreanvaahtera KOR C .....	19
5.4	Kasvikantojen ja -erien vertailu .....	21
5.5	Ravintoalustojen vertailu .....	23
5.6	Jatkokasvatus .....	24
6	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	26
	LÄHTEET .....	27

## LIITTEET

Liite 1	LS-alusta
Liite 2	WPM-alusta
Liite 3	DKW-alusta

## 1 JOHDANTO

Vaahterat ovat tärkeä osa koristepuupalikoimaa. Niihin kuuluu monia erikokoisia ja muotoisia lajeja, joiden lehdet voivat olla hyvinkin erilaisia. Esimerkiksi mongolianvaahtera (*Acer ginnala*) on suosittu pensasmainen vaahtera, jota viljellään sen kasvutavan ja hienon lehdistön vuoksi. Suosioon vaikuttaa myös lehtien kaunis oranssinpunainen syysväri. Samantapainen vaahtera, tataarivaahtera (*Acer tataricum*) puolestaan koreilee syksyisin keltaisella tai hieman punertavalla lehdistöllä. Metsävaahtera (*Acer platanoides*) taas on yksi suosituimpia piha- ja puistopuitamme. (Alanko 1988, 28–29.) Eri vaahteralajit myös sopivat hyvinkin erilaisiin käyttökohteisiin aina kaupunkipuutarhoista ja teollisuusalueista peltojen suojaistuksiin (Bridgeman 1979, 135–140).

Itse koreanvaahtera (*Acer pseudosieboldianum*) on tällä hetkellä varsinkin Suomessa melko harvinainen puulaji. Se olisi kuitenkin hyvä lisä suomalaiseseen koristekasvivalikoimaan, sillä koreanvaahtera on melko pieni puu, joten se sopisi pienempäänkin pihaan. Lisäksi koreanvaahteroilla on tavallisesti hyvinkin näyttävä syysväri. Koreanvaahtera on peräisin Korean ja Kiinan Matsurian alueilta (Van Gelderen 1999, 227).

Tavallisesti koreanvaahteraa on lisätty varttamalla (Van Gelderen, De Jong & Oterdoom 1994, 121), mutta nyt haluttiin tutkia onko sen lisääsmahdollisuuksia mikrolisäyksen avulla. Mikrolisäyksen avulla voidaan esimerkiksi tutkia puuvartisten kasvien ominaisuuksia jalostuksen aikana, lisätä hyviä kasvivyksilöitä laajassa mittakaavassa metsittämiseen tai tuottaa koristekasveja puutarhoihin ja puistoihin. (George 1993/1996, 970–974.) Tämän työn tarkoituksena oli löytää sopiva ravintoalusta koreanvaahteran mikrolisäyksen aloitusvaiheeseen sekä tuottaa lajista viljelmä Lepaan mikrolisäyslaboratoriolle, joka on myös työn tilaaja.

## 2 VAAHTERAT

Vaahterat ovat Aceraceae-heimoon (vaahterakasvit) ja *Acer*-sukuun kuuluvia puuvartisia kasveja. Parhaiten vaahterat tunnetaan loistavista, hohtavista syysväreistään, mutta koristearvon lisäksi jotkin vaahterat kelpaavat myös esimerkiksi puutavaraksi tai vaahterasiirapin tuotantoon. (Van Gelderen ym. 1994, 15.) Vaahteroista yleisin Suomessa on metsävaahtera (*Acer platanoides*), joka tuli Suomeen noin 4000 eKr. lounaasta ja kaakosta (Holmäsén 1991, 137).

### 2.1 Vaahterat yleisesti

Vaahterat ovat levinneet hyvin laajalle alueelle ympäri maapalloa. Eniten niitä tavataan lauhkean ilmaston vyöhykkeellä Pohjois-Amerikassa ja Euroasiassa, mutta erilaisia vaahteroita kasvaa myös välimerellisissä sekä trooppisissa ilmastoissa Amerikassa, Euroopassa ja Aasiassa. Vaahteroita on luultavasti alun perin viljelty niiden kauniiden kukkien sekä lehtien upeiden syysvärien vuoksi. Vaahteroiden viljelykelpoisuuteen vaikuttaa se, että vaahterat eivät kärsi kasvitaudeista ja tuholaisista yhtä paljon, kuin jotkin muut puulajit. *Acer*-suku on hyvin monimuotoinen ja siitä löytyy sopiva laji niin pieneen kuin isoonkin puutarhaan, niin kuivaan kuin kostean kasvupaikkaan. (Van Gelderen ym. 1994, 17–25.)

Vaahteroihin kuuluu joitain suuria lajeja, mutta monet lajeista ovat keskikokoisia puita tai pieniä ja pensasmaisia. Esimerkkejä isoista ja keskikokoisista vaahteroista ovat muun muassa *Acer heldreichii*, *Acer lobelii*, *Acer rubrum* ja *Acer saccharum* ja pienistä puu- ja pensasmaisista vaahteroista ovat muun muassa *Acer argutum*, *Acer forrestii*, *Acer pennsylvanicum* ja *Acer trifolium*. Suurin osa Etelä-Aasiasta tulleista vaahteroista on pieniä. Vaahteroiden kukat voivat olla kauniita, mutta silti vaahteroiden koristearvo perustuu tavallisimmin nimenomaan niiden lehdistöön. (Bean 1976, 185–186.) Eri vaahteroilla koristearvoa voivat lisätä esimerkiksi erityisen kaunis kaarna tai vaikka oksien erikoinen väritys (Bridgeman 1979, 124–128).

Vaahteroille on tyypillistä, että lehdet ovat aina vastakkain ja lapa on yleensä liuskainen. Joskus lehtilapa voi olla myös ehyt tai kerrannainen. Vaahteran kukinto on huiskilo ja itse kukat ovat yleisimmin kellertäviä tai vihertäviä. Joillakin lajeilla kukat voivat olla myös punaisia. Yksittäisessä kukassa on tavallisesti viisi terälehteä ja viisi verholehteä sekä kahdeksan hedettä ja kaksi emiä. Vaahteran hedelmä on 2-lohkoinen lohkohedelmä. Yksi vaahteroiden tuntomerkeistä ovat hedelmien lenninsiivet. (Hämet-Ahti, Palmén, Alanko & Tigerstedt 1992, 288; Bean 1976, 185–186.) Vaahteroita lisätään yleisesti joko siemenestä, pistokkaasta, tai varttamalla (Van Gelderen ym. 1994, 27–29). Beanin (1976, 185–186) mukaan kaikki vaahterat pitäisi lisätä siemenestä ja jos varttamiseen joudutaan turvautumaan, perusrunkona tulisi käyttää samaa lajia.



## 2.2 Koreanvaahtera

Koreanvaahtera (*Acer pseudosieboldianum*) on varsinkin Suomessa melko harvinainen kasvi. Koreanvaahteralla on ollut monta eri latinankielistä nimeä, eikä sitä ole pystytty määrittämään lajilleen. Koreanvaahteran sanotaan muistuttavan sirovaahteraa (*Acer sieboldianum*), jonka mukaan se on ilmeisesti saanut nimensäkin, sillä *pseudo* voidaan kääntää ”vale-” tai ”epä-”, jolloin koreanvaahteran latinankielinen nimi voitaisiin kääntää esimerkiksi: valesirovaahtera tai epäsirovaahtera. Koreanvaahtera muistuttaa ulkonäöltään myös hokkaidovaahtera (*Acer japonicum*), joka on sirovaahteran lisäksi ainoa laji, johon koreanvaahteran voi sekoittaa. Koreanvaahteraa kasvaa luonnonvaraisena Mantšuriassa Ussuri joella Kiinassa sekä myös Koreassa. Se viihtyy yleensä sekametsissä hyvin vettä läpäisevässä, kivisessä maassa. Kasvin alalajeja ovat ainakin ssp. *pseudosieboldianum* (tavallisin) ja ssp. *takesimensense* sekä lajikkeita var. *ambiguum* (lehdet tyipistettyjä tai herttamaisia), var. *koreanum* (hedelmät yhdensuuntaiset), var. *lanuginosum* (lehdet ja hedelmät villaisia) ja var. *macrocarpum* (hedelmät vaakatasossa). (Van Gelderen ym. 1994, 120.)

Koreanvaahtera on kohtalaisen pieni puu, sillä se kasvaa vain noin kahdeksasta kymmeneen metriä korkeaksi, joskin joskus korkeuttaan leveämmäksi. Puun oksisto on yleensä hyvinkin avonainen ja harva. Oksien väri vaihtelee harmaasta mustahkoon. Uudet versot ovat pitkiä, hentoja ja voivat joskus olla hieman tahmeita. Koreanvaahteran lehdet ovat sormihalkoisia, kuten kaikilla vaahteroilla, mutta koreanvaahteralla yhdessä lehdessä on 9–11 haaraa. Lehdet ovat halkaisijaltaan 10–14 cm leveitä, kerraten sahalaitaisia ja lehtiruodit ovat kolmesta viiteen senttimetriä pitkiä. Nuorena lehdet voivat olla alapinnaltaan vaaleankarvaisia, mutta lehden yläpuoli on yleensä syvän vihreä. (Van Gelderen ym. 1994, 120; Van Gelderen 1999, 272.) Koreanvaahteralla voi olla myös silkkisiä ruosteisen ruskeita karvoja silmun ja varren liittymiskohdassa (Dirr 1990, 55). Koreanvaahteralla on näyttävä syysväri, joka vaihtelee keltaisesta syvän purppuranpunaiseen. Lehdet varisevat myöhään syksyllä, mutta saattavat jopa jäädä talveksi puuhun leudon talven ajaksi. Kukinta tapahtuu keväällä, ennen lehtien kasvua. Kukintojen verholehdet ovat purppuranpunaisia, ja terälehdet kermanvalkoisia. Koreanvaahteran hedelmä on kaksilohkoinen lohkohedelmä, jossa muiden vaahteroiden tapaan on lenninsiivet. Hedelmä on kolme senttimetriä pitkä ja väriltään ruskea tai punertava. (Van Gelderen ym. 1994, 120; Van Gelderen 1999, 272.)

Koreanvaahteran lisäys onnistuu siemenestä, joskin siemeniä on vain harvoin saatavilla. Tavallisempi ja hyväksi todettu lisäysmenetelmä on varttaa koreanvaahteraa japaninvaahteran (*Acer palmatum*) perusrunkoon. Upeasta syysväristään huolimatta koreanvaahteran koristearvo kyseenalaistetaan, sillä sen kasvitapa on usein roikkuva ja löyhä. Syksyllä ruskeaksi muuttuneet lehdet jäävät puuhun pitkäksi aikaa, eivätkä ole kaikkien mielestä esteettisiä. (Van Gelderen ym. 1994, 121.)

### 3 MIKROLISÄYS

Mikrolisäys on yksi kasvien lisäysmenetelmistä. Siinä kasveja lisätään erilaisista kasvinosista *in vitro* olosuhteissa, eli ”lasin alla” esimerkiksi koeputkissa (George 1993, 1). Erilaisia mikroviljelmiä ovat esimerkiksi meristeemi-, versonkärki-, silmu-, kallus-, solu-, suspensio-, protoplasti-, he- de-, siitepöly- ja alkioviljelmät. Näiden lisäksi myös mikrovarttaminen on yksi solukkoviljelymenetelmä. (Haapala & Niskanen 1992, 15–20.) Mikrolisäystä varten emokasvista otetaan halutunlaisia aloituspaloja. Kasvista ja viljelmätyypistä riippuen aloituspalat ovat esimerkiksi verson kärkiä tai nivelvälejä, jotka sitten steriloidaan ja preparoidaan. Aloituspalat asetetaan kasvualustalle, ja jos ne alkavat kehittyä, niiden versoja voidaan monistaa ja lopulta juurruttaa. Juurrutusta tehdään sekä *in vitro*, että *ex vitro* olosuhteissa. (George 1993, 1.)

#### 3.1 Ravintoalustat

Mikrolisäyksessä kasvit kasvatetaan keinotekoisesti valmistetussa ravintoalustassa. Tämän alustan ominaisuudet vaikuttavat olennaisesti lisäyksen onnistumiseen. (George 1993, 273.) Yleisesti käytettyjä ravintoalustoja ovat muun muassa Murashigenin ja Skoogin kehittämä MS-alusta ja Lloydin ja McCownin kehittämä WMP-alusta. Alustojen erot mikrolisäyksessä johtuvat niiden ainesosien erilaisuudesta. Jokaisessa alustassa on ainakin joitain eroja esimerkiksi makro- ja mikroravinteissa sekä kasvuhormoneissa. (George 1993, 346–348.) Makro- ja mikroravinteet ovat välttämättömiä osia kasvualustassa. Makroravinteita ovat typpi, kalium, kalsium, fosfori, magnesium ja rikki. Mikroravinteita ovat esimerkiksi rauta, natrium, kloori, mangaani, sinkki, boori, kupari, koboltti ja molybdeeni. Näiden lisäksi kasvualustoihin lisätään sokereita hiilen lähteeksi. (George 1993, 273–274.) Muita kasveille tärkeitä alkuaineita ovat myös happi ja vety ja lisäksi joillekin kasveille tärkeitä tai hyödyllisiä aineita ovat myös alumiini ja jodi (George & Debergh 2008, 65). Kasvua parantamaan voidaan lisätä myös vitamiineja, aminohappoja sekä kasvunsäätöaineita. Kasvunsäätöaineen valinta ja pitoisuus riippuvat kyseessä olevasta kasvilajista ja lisäyksen tavoitteesta. Aloitus-, monistus- ja juurrutusaloistoilla on yleensä eri pitoisuudet kasvunsäätöaineita. (George 1993, 273–274; Smith 2000, 47–49.)

Kasvualustaan lisättävät makroravinteet saadaan tavallisimmin suoloista. Suolat liuotetaan veteen, jolloin ne saadaan muuttumaan kasveille käyttökelpoisiksi ioneiksi. Yleensä kasvit ottavat makroravinteensa seuraavainlaisina ioneina:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $(\text{HPO}_4)^{2-}$ ,  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$  ja  $(\text{SO}_4)^{2-}$ . Nämä saadaan annettua Na- tai Cl-suoloina, sillä kasvit kestävät hyvin suuria natrium- ja klooripitoisuuksia. Ravinteiden ottoon vaikuttavat esimerkiksi happamuus ja lämpötila. Lisäyksen alussa varsinkin metallionien määrä kasvissa voi jopa vähentyä, sillä niitä voi karata alussa vahingoittuneesta kasvisolukosta. Tavallisesti kasvit kestävät pH:n välillä 4,0–7,2, mutta yleensä kasvualustan pH säädetään 5,7:ään. Esimerkiksi

autoklavoinnin tai varastoinnin aikana pH voi kuitenkin vielä laskea. (George 1993, 274, 297–298.)

Mikroravinteita on tutkittu paljon ja niiden tärkeydestä ollaan yhtä mieltä. Siitä huolimatta tarvittavista pitoisuuksista on monta mielipidettä. Esimerkiksi koboltin tärkeydestä kasveille ei ole vielä varmaa tietoa. Kuitenkin mikroravinteet ovat tärkeitä solujen proteiinien osia, joista suurinta osaa tarvitaan esimerkiksi klorofyllin synteesiin sekä kloroplastien toimintaan. (George 1993, 302.)

Kasvualustaan tulee lisätä jokin hiilen lähde, josta kasvit saavat tarvitsemansa energian. Tavallisesti kasvin vihreät solut pystyvät itse yhteyttämään ravintonsa, mutta mikroviljelmässä nämä solut eivät ole fotosynteesistä aktiivisia. (Smith 2000, 50.) Yleisimmin mikrolisäyksessä käytetään hiilen lähteenä sakkaroosia, mutta myös muita sokereita voidaan käyttää. Kokeissa muiksi ainakin kohtalaisen hyviksi sokereiksi on todettu glukosi, maltoosi ja raffinoosi. Huonommiksi sokereiksi on havaittu fruktoosi, mannoosi ja laktoosi, sillä niistä mikrotaimet saavat huonommin hiiltä. Glukoosilla on saatu joissain tapauksissa jopa parempia tuloksia kuin sakkaroosilla, mutta sitä käytetään vähemmän sen korkeamman hinnan vuoksi. Myös joitain monosakkarideja kuten arabinoosia ja ksyloosia, ja disakkarideja kuten sellobioosia, maltoosia ja trehaloosia voidaan käyttää osittain korvaamaan sakkaroosia. Monia muitakin hiilen lähteitä, kuten maissi siirappia on myös tutkittu. (George 1993, 322.)

Mikroviljelyssä kasvien kasvua voidaan parantaa lisäämällä kasvualustaan vitamiineja. Toisin kuin eläimet, kasvit pystyvät tavallisesti itse tuottamaan tarvitsemansa vitamiinit, mutta mikrolisäyksessä kasvisolut tai kudokset voivat kärsiä vitamiinien puutteesta, sillä niiden tuotanto ei ole tehokasta. Aikaisemmin vitamiinien lähteenä on käytetty muun muassa hedelmämehuja, kookosmaitoa, hiiva- ja mallasuutteita, sekä kaseiinia. Tärkeimpiä mikrolisäyksessä käytettyjä vitamiineja ovat tiamiini (B<sub>1</sub>), niasiini ja pyridoksiini (B<sub>6</sub>). (George 1993, 313; Thorpe, Stasolla, Yeung, Klerk, Roberts & George 2008, 115.) Myös B<sub>3</sub> vitamiini on käytetty. Vitamiineja tulisi säilyttää aina pakastimessa valmiina annosliuksina. (Smith 2000, 49.) Joskus myös aminohappoja käytetään joskus kasvualustoissa. Aminohapot voivat lisätä joidenkin mikroravinteiden satavuutta, estää alustan pH-muutosta tai toimia ravinteina (George 1993, 313; Thorpe ym. 2008, 115.)

Aloitusaluustoilla viljelmiä voidaan tukea mekaanisesti erilaisten materiaalien avulla, tai ravintoalustasta voidaan tehdä geelimäinen esimerkiksi agarin avulla. Mekaanisessa tuennassa on yritetty käyttää hyväksi ainakin erilaisia muoveja ja paperia sekä muita huokoisia materiaaleja. Yleisesti ravintoalustan kiinteyttämiseen on käytetty agaria. Agar sopii tarkoitukseen hyvin sillä se sulaa 100 °C:ssa ja jähmettyy geeliksi 45 °C:ssa, eikä se reagoi voimakkaasti alustan muiden ainesosien kanssa. Muita käytettyjä geeli aineita ovat esimerkiksi agarooosi ja gelrite. Geelit ovat myös hyviä pysyviä alustoja, sillä kasvien entsyymit eivät sulata niitä. (George 1993, 337–341.)

### 3.2 Kasvihormonit

Kasvihormoneja esiintyy kasveissa luonnollisesti, mutta myös synteettisesti valmistettuja hormoneja käytetään kasvien lisäämisessä. Kuitenkin myös luonnollisia kasvunsäätöaineita voidaan tuottaa keinotekoisesti. Niiden tehtävänä kasvissa on ohjata kasvin kasvua ja kehitystä. Tärkeimpiä näistä aineista ovat auksiinit ja sytokiniinit. Muita kasvihormoneja ovat esimerkiksi gibberelliinit. (George 1993, 420.) Näiden lisäksi kasvunsäätöön voidaan käyttää myös etyleeniä ja abskissihappoa (Machakova, Zazimalova & George 2008, 175).

Auksiinit ovat mikrolisäyksessä yleisesti käytettyjä kasvihormoneja. Ne esimerkiksi edistävät kalluksen ja kasvin eri elimien kasvua sekä säätelevät solukkojen muuntumista yhdessä sytokiniinien kanssa. Auksiinin valinta riippuu esimerkiksi siitä millaista kasvua tarvitaan sekä siitä, miten paljon auksiineja kasvissa on luonnostaan. Myös kasvin kyky tuottaa auksiineja sekä lisättyjen auksiinien ja luonnostaan esiintyvien aineiden mahdolliset reaktiot vaikuttavat auksiinien valintaan. Auksiinit parantavat kasvien kasvua kahdella tavalla. Ne saavat aikaan vety ionien erittymisen soluseiniin ja niiden läpi, joka aiheuttaa solujen laajenemista. Toisaalta ne vaikuttavat myös RNA-aineenvaihduntaan ja tätä kautta myös proteiinisynteesiin. Yleisin luonnostaan esiintyvä auksiini on IAA (3-indolyl-acetic acid) ja yleisimmin käytettyjä synteettisiä auksiineja ovat 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), IBA (3-indolebutyric acid, 4-(indol-3-yl)butyric acid ja 1*H*-indole-3-butanolic acid) ja NAA (1-naphthalene acetic acid). Näistä 2,4-D:tä käytetään enimmäkseen kalluksen muodostukseen. NAA:ta sekä IBA:ta käytetään, kun tavoitteena on enemmin solukon muuntuminen. (George 1993, 421–423; Smith 2000, 47–49.) Kasvien juurrutuksessa yleensä käytettyjä auksiineja ovat IAA, IBA ja NAA (Jozwik 1992, 244).

Sytokiniinit stimuloivat proteiinisynteesiä ja tukevat kloroplastien kehitystä sekä hidastavat irtonaisten lehtien vanhenemista. Huomattavin vaikutus näillä aineilla on solujen jakautumisessa ja muuntumisessa, varsinkin kun niitä käytetään yhdessä auksiinien kanssa. Toisaalta versoviljelmään lisätynä ne voivat lopettaa apikaalidominanssin ja saada sivusilmut puhkeamaan. Luonnostaan esiintyviä sytokiniinejä ovat esimerkiksi zeatiini (4-hydroxy-3-methyl-*trans*-2-butenylaminopurine, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-aminopurine, 2-methyl-4-(1*H*-purin-6-ylamino)-2-buten-1-ol) sekä 2-iP/IPA ( $N^6$ -(2isopentyl)adenine,  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosine, 6-(3-methyl-2-butenylamino)purine ja 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purine). Joissain tapauksissa luonnollisia sytokiniinejä on lisätty alustaan myös lisäämällä siihen esimerkiksi hiivauutetta tai kookosmaitoa. Eniten käytettyjä synteettisiä sytokiniinejä ovat kinetiini (6-furfurylaminopurine ja *N*-(2-furanylmethyl)-1*H*-purin(e)-6-amine) ja BAP (6-benzylaminopurine, benzyladenine ja *N*-(phenylmethyl)-1*H*-purin(e)-6-amine). (George 1993, 435–437; Smith 2000, 47–49.)

Kasvihormonien, erityisesti auksiinien ja sytokiniinien välillä on huomattavia yhteisvaikutuksia. Tavallisesti kasvualustan auksiinin määrän ollessa suuri ja sytokiniinien määrän pieni, pistokkaat muodostavat paremmin juuria, ja yksisirkkaisilla kasveilla esiintyy kalluksen muodostusta. Kun

taas sytokiniinien suurempi määrä ja auksiinien pienempi määrä edistävät versoviljelmien sivuversojen muodostusta sekä myöhäisversojen muodostusta. (George 1993, 445.)

Gibberelliinit voivat vaikuttaa kokonaisen kasvin kasvuun ja kehitykseen useilla tavoilla. Ne voivat esimerkiksi kasvattaa varren pituutta, edistää kukintaa tai hedelmän tuotantoa. Gibberelliinejä ei välttämättä tarvita solukoviljelyssä, mutta niiden käyttö voi saada aikaan samankaltaisia vaikutuksia kuin auksiinien käyttö. Gibberelliinit voivat edistää esimerkiksi kalluksen kasvua. (George 1993, 446–447.)

### 3.3 Lisäyksen vaiheet

Lisäysmateriaali olisi hyvä saada terveistä emotaimista, sillä näin voidaan ennalta ehkäistä viljelmien saastumista. Muuten saastumisien välttämiseksi voidaan esimerkiksi tehdä meristeemiviljelmiä, joissa solukko niin uutta, että tuskin vielä saastunut. On myös mahdollista käyttää lämpökäsittelyjä tai muita sterilointimenetelmiä. (Hartmann, Kester, Davies & Geneve 1997, 601–603.)

Viljelmän aloitukseen voidaan valita aloituspaloiksi eri osia kasvusta, riippuen esimerkiksi kasvilajista ja lajikkeesta. Aloituspalojen koko vaihtelee suuresti, pienistä meristeemipaloista kokonaiseen verson pätkiin. (Hartmann ym. 1997, 604.) Usein aloituspalat steriloidaan kemikaaleilla viljelmien saastumisen (kontaminaatioiden) ehkäisemiseksi. Tähän voidaan käyttää esimerkiksi natriumhypokloriittia, kalsiumhypokloriittia, alkoholia, kloorikaasua tai jopa antibiootteja. Kontaminaatioiden lähteitä voivat olla muun muassa aloituspalat, henkilökunta, huoneen ilma, hyönteiset, ravintoalusta ja työvälineet. (Smith 2000, 70–72.) Aloituspalat preparoidaan ja asetetaan aloitusalueelle esimerkiksi koeputkiin. Onnistuneessa viljelmässä aloituspalat alkavat kasvattaa versoja. Kehitystä kontrolloidaan yleensä alustan auksiini- ja sytokiniinipitoisuuksilla. Esimerkiksi jos halutaan sivuversoja, alustan sytokiniinipitoisuuden tulisi olla kohtalainen (0,5- 1 mg/l), ja auksiinipitoisuuden hyvin alhainen (0,01- 0,1 mg/l), kun taas kallusta haluttaessa auksiinipitoisuuden tulee olla korkeampi. Tähän aloitusvaiheeseen kuuluu yleensä noin kuusi viikkoa, mutta jollain puuvartisilla kasveilla voi aloitusvaiheeseen kulua jopa vuosi. (Hartmann ym. 1997, 604.)

Monistusvaiheessa kasveissa tulisi olla jo useita versoja. Nämä versokimput on tarkoitus jakaa yksittäisiksi versoiksi, jotka asetetaan uusille kasvatustalustoille. Kun siirretyistä versoista on kehittynyt lisää uusia versoja, ne jaetaan jälleen. Kun tämä toimenpide toistetaan useaan kertaan, saadaan viljelmiä monistumaan. Monistusalueiden koostumukset poikkeavat aloitusalueista, ja usein sopivaa koostumusta joudutaankin etsimään kokeellisesti, sillä myös tässä vaiheessa kasvien välillä on laji- ja lajikekohtaisia eroja. Tavallisimmin yhden yksilön tuottamien versojen määrä on 5- 25, joskin joillain lajeilla luku on vielä suurempi. (Hartmann ym. 1997, 604.)

Juurrutusvaiheessa monistetut kasvinversot on tarkoitus saada kasvattamaan juuria. Tätä varten useimmat kasvilajit täytyy siirtää monistusalustalta uudelle alustalle, joka on tarkoitettu nimenomaan juurien muodostukseen. Juurrutusvaiheen tarkoituksena on siis valmistella kasveja kasvatamaan jälleen normaaleissa olosuhteissa. Juurrutus voidaan tehdä joko *in vitro* tai *ex vitro*. *In vitro*-juurrutuksessa versot siirretään uudelleen agar alustalle, kun taas *ex vitro*-juurrutuksessa versot pistetään esimerkiksi turvepohjaiseen kasvualustaan esimerkiksi kasvihuoneeseen. Joillakin lajeilla juurrutus on hyvä tehdä lyhyellä aukiin käsittelyllä, joka edistää juurtumista. Versojen ympärillä olevan ilman kosteus on edelleen pidettävä korkeana, jotta versot eivät kuivuisi. (Hartmann ym. 1997, 605, 608.)

Kun versot ovat juurtuneet hyvin, ne täytyy vielä totuttaa normaaleihin kasvuolosuhteisiin. Ennen tätä *in vitro*-juurrutuksessa olleet versot pitää irrottaa agarista ja kaikki juuriin kiinni jäänyt agar tulisi huuhdella pois huolellisesti. Kasvit istutetaan uudelle alustalle, esimerkiksi kasvuturve seokselle. Näiden taimien päälle on hyvä rakentaa telta, tai varmistaa hyvä ilmankosteus esimerkiksi sumutuksella. Samalla taimia on hyvä varjostaa, jos ne muuten olisivat suorassa auringon paisteessa. Tämän jälkeen taimia tulisi vähitellen totuttaa pienempään ilmankosteuteen, sekä suurempaan valon määrään, kunnes ne selviävät normaaleissa kasvuolosuhteissa. (Hartmann ym. 1997, 608.)

### 3.4 Vaahteroiden mikrolisäys

Puuvartisten kasvien mikrolisäyksessä on omat ongelmansa. Lisäysmateriaalina toimivan kasvinosan kasvuvaihe vaikuttaa puuvartisilla kasveilla suuresti mikrolisäyksen onnistumiseen. Vanhoista kasvinosista otetut aloituspalat voivat esimerkiksi kasvaa hyvin hitaasti, eivätkä tuota sivuversoja ja ne voivat myös tuottaa muuntunutta kasvisuolukkoa. Jos vanhasta solukosta kuitenkin saadaan versoja, niiden juurruttaminen voi olla vaikeaa. Joissain tapauksissa voi olla jopa mahdotonta lisätä täysikasvuisia puita mikrolisäyksen keinoin. Joistain täysikasvuisistakin puuvartisista saadaan kuitenkin uutta kasvua, jonka mikrolisäys on paljon helpompaa. (George 1993/1996, 970–972.)

Lehtipuiden mikrolisäyksessä versoviljelmiä saadaan parhaiten aikaan siementaimien nivelistä ja versonkärjistä. Nuorta lisäysmateriaalia saadaan esimerkiksi käyttämällä versoja, jotka kasvavat halutun kasvin tyvestä tai niitä, joita kasvaa harventamisen seurauksena. Vanhankin materiaalin lisääminen voi onnistuessaan helpottaa ajan myötä, koska useiden monistusten aikana kasvimateriaali nuorentuu. Vaikka versoista aloitetut viljelmät tuottavat yleensä parhaan tuloksen, niitä on käytetty vain muutaman kasvin kaupallisessa monistamisessa. Puiden lisäysmateriaali voi olla myös hyvin saastunutta, jolloin tarvitaan ankaria sterilointi käsittelyjä, ja jotkin lajit tuottavat niin paljon fenoleja kasvualustaan, että ne täytyy siirtää usein uusille alustoille. Esimerkiksi eukalyptuksella parhaat lisäys tuloksen on saatu MS-alustalla, kun taas monet lauhkean ilmaston puut ovat suosineet WPM-alustaa. Kuten tästäkin nähdään, alustan valinta riippuu hyvin pitkälti kyseessä olevasta kasvilajista. (George 1993/1996, 974.)

Riikosen (2003, 31–33) mukaan ainakin metsävaahteran mikrolisäyksessä on onnistuttu, mutta ongelmana on ollut viljelyn saaminen taloudellisesti kannattavaksi. Ongelmia mikrolisäyksessä voivat aiheuttaa hyvin monet eri tekijät varsinkin kun kyseessä on puuvartinen kasvi. Esimerkiksi viljelyn aloituksessa on oltava mahdollisen nuorta kasvusolukkoa tai viljely ei onnistu. Vaahteroilla steriloinnin tulisi olla mielellään hellävarainen pintasterilointi, jotta meristeemisolutko ei vahingoittuisi. Toisaalta leposilmuille voidaan käyttää vahvempaa sterilointia. Steriloinnissa voidaan käyttää etanolia ja hypokloriittia, mutta hypokloriittikäsittelyn pituus ja konsentraatio tulisi päättää aina kyseessä olevan solukkotyyppin perusteella. Vaahteroillakin kannattaa kokeilla jotain olemassa olevaa kasvatusalustaa, ja sitten mahdollisesti muuttaa alustaa esimerkiksi kasvihormonien tai makroravinteiden osalta saatujen tulosten perusteella. Mikroviljelyssä yhtä alustaa tulee tarkkailla niin kauan, että viljelämä ehtii stabiloitua, jotta tiedetään varmasti kuinka hyvin kasvi kasvaa kyseisellä alustalla. Viljelämä stabiloituu, kun se monistetaan moneen kertaan. Paras vaihtoehto on käyttää kiinteää kasvualustaa, jossa agarin konsentraatio on 6–7 g/l ja sakkaroosia 20–30 g/l. Versontuottovaiheeseen kasvihormoniksi suositellaan sytokiniiniksi TDZ:ia 0,01–5 µm. Lisäksi voidaan käyttää myös esimerkiksi BAP:ia. Juurrutukseen puolestaan suositellaan auksiiniksi IBA:aa (1,0 mg/l). Kasvatusolosuhteiksi ainakin metsävaahteralle on sopinut 25 °C:n lämpötila ja 16 tunnin valojakso, jossa PAR säteily on 30–100 µmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Kasvatusastioiksi puolestaan suositellaan esimerkiksi vauvanruokapurkkeja ja kansiksi jotain hieman kaasunvaihtoa sallivaa ratkaisua, kuten mikrolisäyksessä yleensäkin.

Usein vaahteroita on mikrolisätty versoista, tai vain verson kärjistä. Verson kaikista osista tehdyt viljelmät ovat olleet yleisimpiä (esimerkiksi *Acer x freemanii*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer rubrum* ja *Acer saccharinum*). Verson kärkiä on käytetty joillakin lajeilla, kuten *Acer rubrum* x *Acer saccharum*. (George 1993/1996, 982.) Kujalan (2010, 29) opinnäytetyössä huntuvaahteran ja japaninvaahteran mikrolisäyksessä onnistuttiin paremmin, kun aloitukset tehtiin hyödettyistä silmuista tai versoista, kuin jos lisäys aloitettiin lepotilaisista silmuista. Riikonen (2004) puolestaan kertoo, että aikuisesta metsävaahterasta ei saatu lainkaan viljelyyn sopivaa aloitusolukkoa aloitusmateriaalista riippumatta. Kerns ja Meyer (1988, 452) tutkivat lajien *A. rubrum* (lajikkeet 'Red Sunset' ja 'Armstrong'), *A. saccharum* (lajikkeet 'Legacy', 'Bonfire' ja 'Green Mountain'), *Acer griseum* ja *Acer miyagei* mikrolisäystä talvella lepotilaisina kerätyistä versoista sekä keväällä kasvuun lähteneistä versoista. *A. rubrum*illa havaittiin versojen kasvua viiden viikon kuluttua. Sen sijaan *A. griseum* ja *A. miyagei* selvisivät aloituksesta, mutta eivät alkaneet tuottamaan versoja. *A. saccharum*illa havaittiin ruskettumista keväällä kerätyissä versoissa. Welsh, Sink ja Davidson (1979, 382–386) käyttivät punavaahteran mikrolisäykseen kaksivuotisista ja täysikasvuista puista kerättyjä verson kärkiä sekä nivelvälälehtiä. Tässä tutkimuksessa punavaahteran versojen todettiin tuottavan fenoleita kasvualustaan. Eniten fenoleja tuottivat täysikasvuista puista kerätyt verson kärjet. Preece, Huetteleman, Ashby ja Roth (1991, 142–148) lisäsivät hopeavaahteraa onnistuneesti verson kärjistä sekä nivelvälleleistä.

Huntuvaahtera selvisi jatkokasvatukseen paremmin WPM-alustalla, kuin LS-alustalla, ja japaninvaahtera puolestaan parhaiten DKW-alustalla, seuraavaksi parhaiten LS-alustalla ja kaikkein huonoiten WPM alustalla. Toisaalta japaninvaahteralla myös kuolleisuus oli suurinta DKW-alustalla. (Kujala 2010, 27.) Punavaahtera saatiin muodostamaan vaihtelevasti versoja muunnetulla LS-alustalla, johon oli lisätty kinetiiniä, BAP:ia tai 2ip:tä (Welsh ym. 1979, 382–386). Riikonen (2004) tutki sytokiniinien TDZ ja BAP vaikutusta metsävaahteran versontuottoon mikrolisäyksessä. Kokeen tuloksien mukaan TDZ:lla olisi mahdollisuuksia lisätä metsävaahteran versontuotantoa, mutta toisaalta se näytti estävän versojen normaalia pidentymistä. BAP:n vaikutus kokeessa jäi puolestaan pieneksi. Hopeavaahteralla tehdyissä kokeissa lisäyksen kannalta parhaaksi sytokiniiniksi todettiin TDZ sekä nuorella, että vanhemmalla lisäysmateriaalilla. Toinen kohtalaisen hyvin toiminut sytokiniini oli zeatiini. Tässä tapauksessa huommat tulokset saatiin kinetiinillä, 2ip:llä sekä BA:lla. Nuoreen lisäysmateriaaliin muodostui runsaasti myöhäisversoja neljässä kuukaudessa. Kokeessa ravinnealustana käytettiin DKW-alustaa. (Preece, Huetteman, Ashby & Roth 1991, 142–148.) DKW-alustan on todettu tutkimuksissa olevan paras alusta *Acer grandidentatum*in versonmuodostukselle (Bowen-O'Connor, Hubstenberger, Killough, St. Hilaire & VanLeeuwen 2007, 40–50).

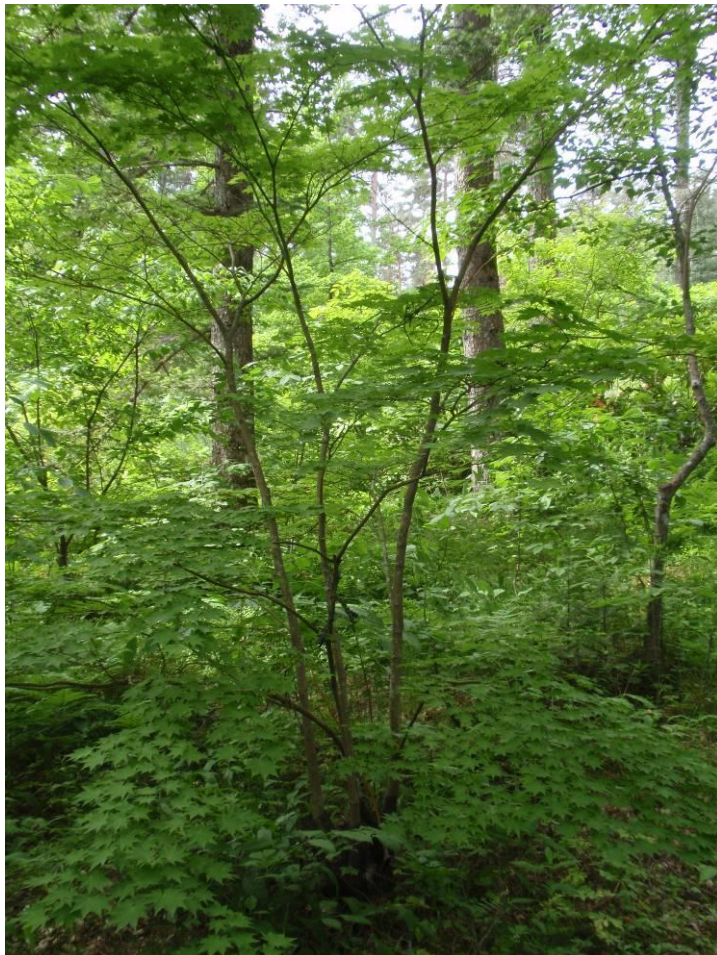


## 4 AINEISTO JA MENETELMÄT

Koe aloitettiin Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa 10.6.2010. Kokeen viimeinen siirrostus tehtiin 3.11.2010, ja kasvien viimeinen tarkastus 22.11.2010. Kokeen emokasveiksi valittiin kolme koreanvaahtera-yksilöä Mustilan arboretumista. Nämä kolme puuta valittiin niiden yksilöllisten ominaisuuksien vuoksi.

### 4.1 Lisäysmateriaali

Kokeen lisäysmateriaali haettiin Mustilan arboretumista kahdessa erässä. Ensimmäinen erä haettiin 9.6 ja toinen erä 15.6. Materiaalia otettiin kolmesta ominaisuuksiltaan erilaisesta koreanvaahterayksilöstä, joilla kaikilla oli hyvin erilaiset kasvupaikat. Ensimmäinen yksilö oli hyvin pieni, lähes pensasmainen puu, jossa oli myös pienet lehdet (Kuvat 1 ja 2). Puu kasvoi keskellä metsää muiden suurempien puiden varjossa.



Kuva 1 Pienilehtinen ja matalakasvuinen koreanvaahtera Mustilan arboretumissa (KOR A).



Kuva 2 KOR A- koreanvaahteran lehtiä.

Toinen yksilö oli nuori puu, jossa oli havaittu erityisen näyttävä syysväri-  
tys (Kuvat 3 ja 4). Tämä puu kasvoi taimimaalla aurinkoisella paikalla,  
jossa ei ollut paljoa suurempia puita lähietäisyydellä.

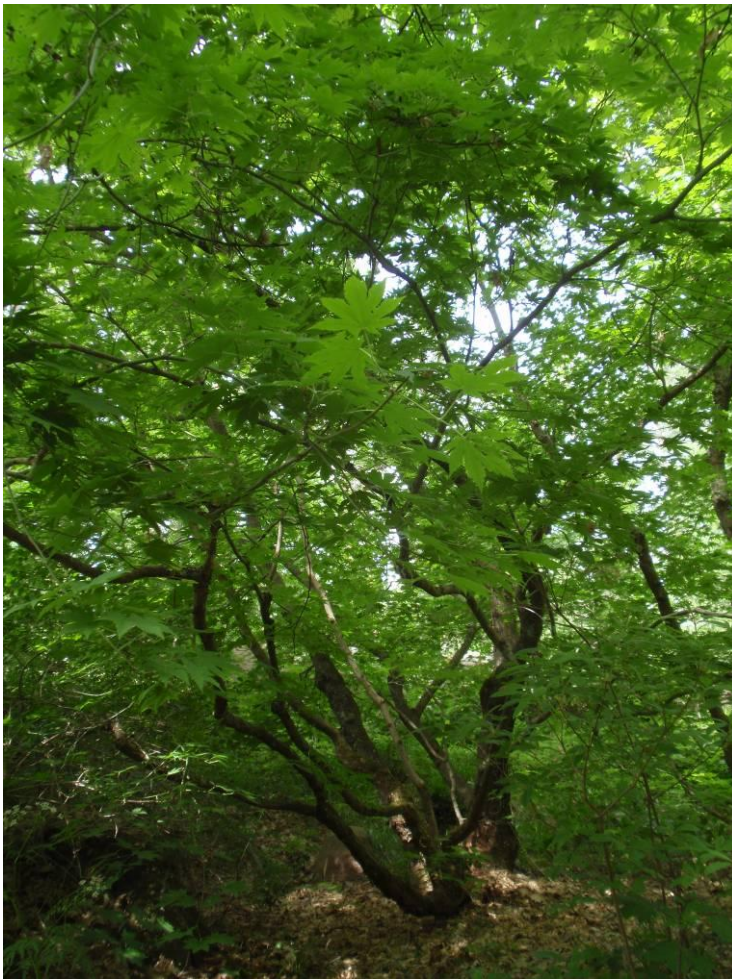


Kuva 3 Nuori koreanvaahtera, jolla hyvä syysväri Mustilan arboretumin taimimaalla  
(KOR B).



Kuva 4 KOR B- koreanvaahteran lehtiä.

Kolmas yksilö puolestaan oli kahta muuta paljon suurempi vanha puu, joka jättää lehtensä koristamaan oksia talveksi (Kuvat 5 ja 6). Tämä muita kahta selvästi suurempi puu kasvoi keskellä metsää ainakin osittain varjossa. Toisaalta puu varjosti myös itse itseään oksiston koreanvaahteralle tyypillisestä harvuudesta huolimatta.



Kuva 5 Vanha koreanvaahtera, joka jättää lehdet talveksi oksille Mustilan arboretumissa (KOR C).



Kuva 6 KOR C- koreanvaahteran lehtiä.

Kasvit nimettiin lisäystä varten seuraavasti: pienilehtinen pikkupuu KOR A, nuori puu, jolla näyttävä syysväri KOR B ja vanha puu, joka jättää lehensä oksille talveksi KOR C. Ensimmäisellä kerralla näytteitä saatiin kaikista kolmesta yksilöstä, mutta KOR B yksilö oli niin nuori, ettei siitä saatu enää toisella kerralla versoja. Toisen keräyskerran näytteet nimettiin seuraavasti: pienilehtinen pikkupuu KOR A2 ja vanha puu, joka jättää lehensä talveksi oksille KOR C2.

Lisäysmateriaaliksi leikattiin oksien uusia, puutumattomia versoja. Versot leikattiin oksasaksilla, ja kerättiin kimpuiksi. Oksakimput käärittiin kosteaan paperiin ja laitettiin muovipusseihin kosteuden säilyttämiseksi. Autotakan ajaksi Mustilasta takaisin Lepaalle oksat asetettiin veteen muovivastioihin. Molemmilla kerroilla versot jätettiin Lepaalla yöksi vesivastioihin ja preparoitiin seuraavana päivänä. Osa KOR C2 erästä preparoitiin vasta kahden yön jälkeen, ja nimettiin uudelleen KOR C3:ksi.

## 4.2 Sterilointi

Versojen valmistelu aloitettiin leikkaamalla ne pienemmiksi paloiksi niin, että joka palaan jäi yksi lehtipari. Palat leikattiin noin 5 cm:n pituisiksi niin, että lehtiparin alapuolelle jäi selvästi enemmän vartta kuin sen yläpuolelle. Seuraavaksi lehdet katkaistiin niin, että varteen jäi kiinni vain osa lehtiruodeista. Jos kyseessä oli verson kärkiosa, saatettiin jättää osa lehteäkin, kuitenkin siten, että lehdestä jäi varteen kiinni noin 2 cm pitkä pala. Nämä palaset harjattiin hammasharjalla, jonka jälkeen ne kuivumisen estämiseksi upotettiin veteen. Aloituspaloja tuli yhteensä 150 kappaletta (Taulukko 1).

Taulukko 1 Koreanvaahteran mikrolisäykseen käytettyjen aloituspalojen määrä eri keräyserissä.

Erä	Palojen määrä
KOR A	30
KOR B	19
KOR C	12
KOR A2	40
KOR C2	19
KOR C3	30
<i>Yhteensä</i>	<i>150</i>

Versojen palat steriloidtiin 10- 15 kappaleen erissä. Aluksi 100 ml:aan vettä sekoitettiin kolme tippaa Erissept- pesuainetta. Nesteeseen tiputettiin magneettisauva ja steriloitava erä verson paloja. Astia asetettiin magneettisekoittajaan 10 minuutiksi. Tämän jälkeen palat kaadettiin pieneen siivilään, jossa ne huuhdottiin ionivaihdetulla vedellä. Siivilästä versot tiputettiin magneettisauvan kera petrimaljalle, joka suljettiin. Petrimaljat siirrettiin laminaarivirtauskaappiin ja pyyhittiin alkoholiin kastetulla kankaalla kaapin saastumisen estämiseksi, kuten kaikki muutkin laminaariin nostettavat tavarat. Seuraavaksi palat upotettiin 70 %:een alkoholiin yhden minuutin ajaksi, jonka jälkeen ne nostettiin pinseteillä vesiastiaan huuhtottavaksi.

Viimeinen sterilointikäsitteily tehtiin 1 %:lla natriumhypokloriitilla (NaOCl). Tässä vaiheessa käytettiin suojalaseja ja -hanskoja. Mittalasiin tiputettiin puhdistettu magneettisauva, kolme tippaa Tweeniä, sekä verson palat. Tämän jälkeen mittalasiin kaadettiin 100 ml natriumhypokloriittia, ja astia suljettiin. Mittalasi nostettiin pois laminaarivirtauskaapista magneetinsekoittajaa sekoittumaan. Kun palat olivat olleet natriumhypokloriitissa 15 minuuttia ne tuli saada heti huuhteluun laminaarivirtauskaappiin. Huuhteluvesiä oli neljä, joista ensimmäisessä verson paloja pidettiin yksi minuutti, toisessa kaksi minuuttia, kolmannessa viisi minuuttia ja neljännessä 10 minuuttia. Neljännessä huuhteluviedessä palat saivat olla myös pidempään. Tämä mahdollisti sen, että useampi erä voitiin steriloida kerralla muiden erien ollessa huuhteluviedessä.

### 4.3 Aloitusalusstat

Ensimmäisissä aloituksissa 10.6 käytettiin kolmea eri aloitusalusstatia. Nämä olivat WPM + zeatiini 2 mg/l, DKW + zeatiini 2 mg/l ja LS + BAP 1 mg/l. Tällöin tehtiin aloitukset eristä KOR A, KOR B ja KOR C. Myöhemmillä erillä (KOR A2, KOR C2 ja KOR C3) käytettiin muuten samoja alustoja, mutta WPM + zeatiini 2 mg/l korvattiin alustalla WPM + zeatiini 1,5 mg/l (Taulukko 2). Muita alustoja oli valmiina, mutta DKW + zeatiini 2 mg/l alustaa tehtiin lisää ennen kokeen aloitusta.

Taulukko 2 Koreanvaahteran aloituspalojen määrä eri aloitusalustoilla.

Erä	WPM + zeatiini 2	DKW + zeatiini 2	LS + BAP 1	WPM + zeatiini 1,5
KOR A	10	10	10	
KOR B	6	6	7	
KOR C	4	4	4	
KOR A2		13	14	13
KOR C2		7	6	6
KOR C3		10	10	10
<i>Yhteensä</i>	<i>20</i>	<i>50</i>	<i>51</i>	<i>29</i>

Versot siirrettiin aloitusalustoille steriloinnin jälkeen. Tällöin jäljellä olevat lehtiruodit leikattiin lyhyiksi ja versoa lyhennettiin molemmista päistä niin, että lehtiparin yläpuolelle jäi lyhempi tappi kuin lehtiparin alapuolelle. Versot asetettiin pystyyn agariin koeputkiin. Lopuksi koeputkien ja niiden korkkien suut steriloidtiin liekissä ja koeputki suljettiin tiiviisti. Koeputkien yläosaan kiinnitettiin laput, joista luki kasvikannan koodi sekä preparointipäivämäärä.



Kuva 7 Koreanvaahtera KOR A:n versot aloitusalustalla.

Ilman lappuja kantoja olisi ollut vaikea erottaa toisistaan, vaikka niillä olikin joitain eroja. Esimerkiksi KOR B-kannalla lehtiruotien tyvet punersivat muita enemmän (Kuva 8) ja KOR A-kannan versot olivat muita kahta hennompiä (Kuva 7). KOR C-kannan versot puolestaan olivat keskimäärin hieman toisia paksumpia (Kuva 9).



Kuva 8 Koreanvaahtera KOR B:n verso aloituslustalla.



Kuva 9 Koreanvaahtera KOR C:n verso aloituslustalla.

Versoja siirrostettiin uusille alustoille sitä mukaan, kun ne tuntuivat sitä tarvitsevan. Siirrostuksen syitä olivat muun muassa tyvien ruskettuminen, liiallinen kalluksen kasvu ja kasvun pysähtyneisyys. Ensimmäinen siirrostus tehtiin 16.6 KOR B-erälle, koska versojen tyvet olivat muuttuneet ruskeiksi. Näistä kaikki versot siirrettiin samoille alustoille kun millä ne aikaisemmin olivat. Kolme lupaavinta yksilöä KOR B-erästä siirrostettiin uudestaan 13.7 liiallisen kalluksen muodostuksen vuoksi. Kaikkien erien elossa olevat yksilöt siirrostettiin 23.9, koska niiden kehityksen todettiin pysähtyneen täysin. Kaikki 3.11 vielä elossa olevat versot siirrostettiin uudelleen paremman kasvun toivossa.

#### 4.4 Jatkokasvatus

Kun kasvin on todettu olevan elossa ja vailla infektoita odotetaan, että sen versot venyvät, jonka jälkeen kasvi voidaan siirtää sellaisenaan tai paloiteltuna monistusalustalle. Kolme tällaista kasvia KOR B-erästä siirrettiin koeputkista alustalta WPM + zeatiini 1,5 mg/l monistusalustoille WPM + zeatiini 0,2 mg/l lasipurkkeihin 23.9. Lopulta myös kaksi KOR C-kannan yksilöä saatiin siirrettyä monistusalustoille 3.11. Myös nämä siirrettiin alustalle WPM + zeatiini 0,2 mg/l.

## 5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Kaikkiaan tehdyistä 150 aloituksesta yhteensä 104 infektoitui ja 38 kuoli, jolloin elossa selvisi 10 aloituspaloista. Näistä lopulta jatkokasvatukseen pääsi 5 kappaletta. Kaikista aloituksista 70 kappaletta oli kantaa KOR A, 19 kappaletta kantaa KOR B ja 61 kappaletta kantaa KOR C.

### 5.1 Pienilehtinen pikkupuu KOR A

Pienilehtisen pikkupuun eli KOR A:n ensimmäisen erän 30 aloituksesta 12 kappaletta infektoitui ja 15 kuoli (Taulukko 3). Elossa aloitusvaiheesta selvinneitä oli kaksi, joista molemmat olivat WPM-alustalla.

Taulukko 3 Koreanvaahteran KOR A-erän tulokset.

Alusta	Aloituspaloja	Infektoituneet	Kuolleet	Elossa
WPM + zea 2	10	8	-	2
DKW + zea 2	10	1	9	-
LS + BAP 1	10	4	6	-
<i>Yhteensä</i>	<i>30</i>	<i>12</i>	<i>15</i>	<i>2</i>

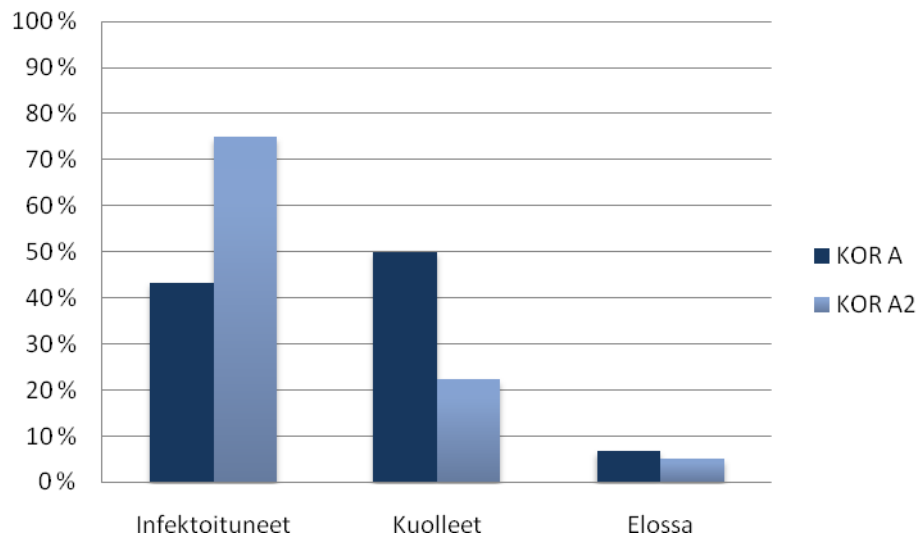
Saman kasvin toisen erän, eli KOR A2:n 40 aloituksesta 30 infektoitui ja yhdeksän kuoli (Taulukko 4). Aloitusvaiheesta elossa selvisi kaksi aloitusta, joista molemmat olivat WPM-alustalla. Nämä versot tosin näyttivät kokeen loppupuolella melko huonokuntoisilta.

Taulukko 4 Koreanvaahteran KOR A2-erän tulokset.

Alusta	Aloituspaloja	Infektoituneet	Kuolleet	Elossa
WPM + zea 1,5	13	10	1	2
DKW + zea 2	13	10	4	-
LS + BAP 1	14	10	4	-
<i>Yhteensä</i>	<i>40</i>	<i>30</i>	<i>9</i>	<i>2</i>

Kun vertaillaan KOR A-kannan molempia aloituksia, havaitaan, että KOR A2-erässä oli huomattavasti enemmän infektoita, kun taas KOR A-erässä oli suurempi kuolleisuus (Kuva 10).





Kuva 10 Koreanvaahteran KOR A-kannan erien vertailu.

Infektioiden määrien suuri ero voidaan ehkä selittää sillä, että erien lisäysmateriaali oli haettu eri päivinä, sillä materiaalin keräysajankohta voi hyvinkin vaikuttaa mikrolisäyksen onnistumiseen. Toisaalta elossa selvinneiden versojen määrässä ei ole lainkaan eroa erien välillä. Kokonaisuudessaan KOR A-kannan versoista 61 % infektoitui, 34 % kuoli ja 6 % jäi eloon.

## 5.2 Upean syysvärin koreanvaahtera KOR B

Nuoresta koreanvaahterasta (KOR B), jonka erikoisuutena oli sen loistava syysväri tehtiin vain 19 aloitusta, johtuen puun nuoresta iästä, ja näin siis myös pienestä oksamäärästä (Taulukko 5).

Taulukko 5 Koreanvaahteran KOR B-erän tulokset.

Alusta	Aloituspaloja	Infektoituneet	Kuolleet	Elossa
WPM + zea 2	6	3	-	3
DKW + zea 2	6	3	4	-
LS + BAP 1	7	3	4	-
<i>Yhteensä</i>	<i>19</i>	<i>9</i>	<i>8</i>	<i>3</i>

Näistä aloituksista yhdeksän (47 %) infektoitui, kahdeksan (42 %) kuoli ja kolme (12 %) jäi eloon. Prosentuaalisesti tästä kannasta siis selvisi hengissä suurempi osa kuin KOR A-kannasta. Huomattava on, että myös tästä erästä kaikki eloon jääneet olivat WPM-alustalla.

## 5.3 Talvilehtinen koreanvaahtera KOR C

KOR C-kantaa, eli vanhempi koreanvaahtera, joka jättää lehtensä talveksi oksille oli kokeessa mukana kolme erää, jotka kaikki preparoitiin eri päivinä. Ensimmäisen erän (KOR C) 12 aloituksesta viisi infektoitui, kolme

kuoli ja kolme jäi henkiin (Taulukko 6). Jälleen kaikki kolme eloonjäänyttä versoa olivat WPM-alustalla.

Taulukko 6 Koreanvaahteran KOR C-erän tulokset.

Alusta	Aloituspaloja	Infektoituneet	Kuolleet	Elossa
WPM + zea 2	4	1	-	3
DKW + zea 2	4	2	2	-
LS + zea 2	4	2	2	-
<i>Yhteensä</i>	<i>12</i>	<i>5</i>	<i>4</i>	<i>3</i>

KOR C-kannan toisen erän, eli KOR C2:n 19 aloituksesta 17 infektoitui ja kaksi kuoli. Elossa ei tästä erästä selvinnyt ainuttakaan versoa (Taulukko 7). Tässäkin tapauksessa voidaan epäillä infektioiden suuren määrän syyksi lisäysmateriaalin keräysajankohtaa.

Taulukko 7 Koreanvaahteran KOR C2-erän tulokset.

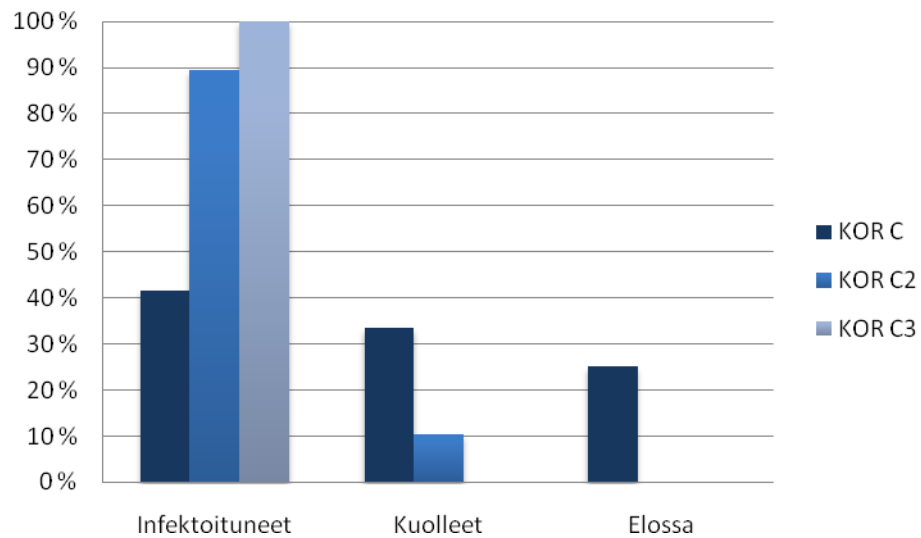
Alusta	Aloituspaloja	Infektoituneet	Kuolleet	Elossa
WPM + zea 1,5	6	5	1	-
DKW + zea 2	7	7	-	-
LS + BAP 1	6	5	1	-
<i>Yhteensä</i>	<i>19</i>	<i>17</i>	<i>2</i>	<i>-</i>

Saman kasvin kolmannen erän (KOR C3) 30 aloituksesta kaikki 30 infektoituivat (Taulukko 8). Tässä tapauksessa materiaalin keräysajankohdan lisäksi infektioiden määrän syyksi voidaan ehkä epäillä myös sitä, että nämä versot joutuivat olemaan vesiastiassa muita pidemmän ajan ennen preparointia.

Taulukko 8 Koreanvaahteran KOR C3-erän tulokset.

Alusta	Aloituspaloja	Infektoituneet	Kuolleet	Elossa
WPM + zea 1,5	10	10	-	-
DKW + zea 2	10	10	-	-
LS + BAP 1	10	10	-	-
<i>Yhteensä</i>	<i>30</i>	<i>30</i>	<i>-</i>	<i>-</i>

KOR C-kannan eri eriä vertaillessa nähdään selkeästi, että myöhemmin (15.6) kerättyjen erien infektoitumisprosentti on huomattavasti suurempi, kuin ensimmäisellä kertaa (9.6) kerätyn erän (Kuva 11). Näin siis ensimmäisen erän elossa selvinneiden versojen prosentti on paljon suurempi, kuin kahden myöhemmän erän.

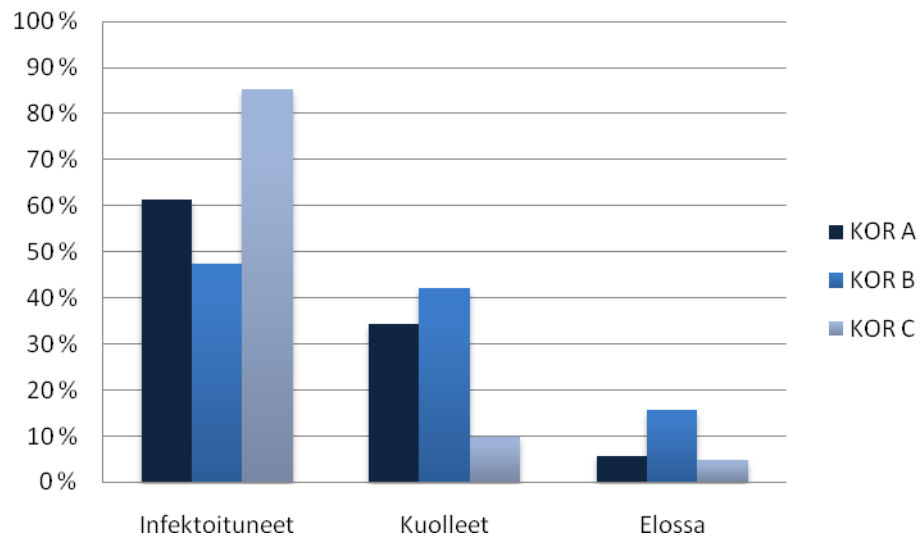


Kuva 11 Koreanvaahteran KOR C-kannan erien vertailu.

Kokonaisuudessaan KOR C-kannan aloituksista 85 % oli infektoituneita, 10 % kuolleita ja 5 % selvisi hengissä. Kuitenkin täytyy ottaa huomioon, että kaikki kokeen loppuvaiheessa elossa olleet versot olivat ensimmäisestä erästä, jolloin tämän erän eloonjäämisprosentti on jopa 25 %.

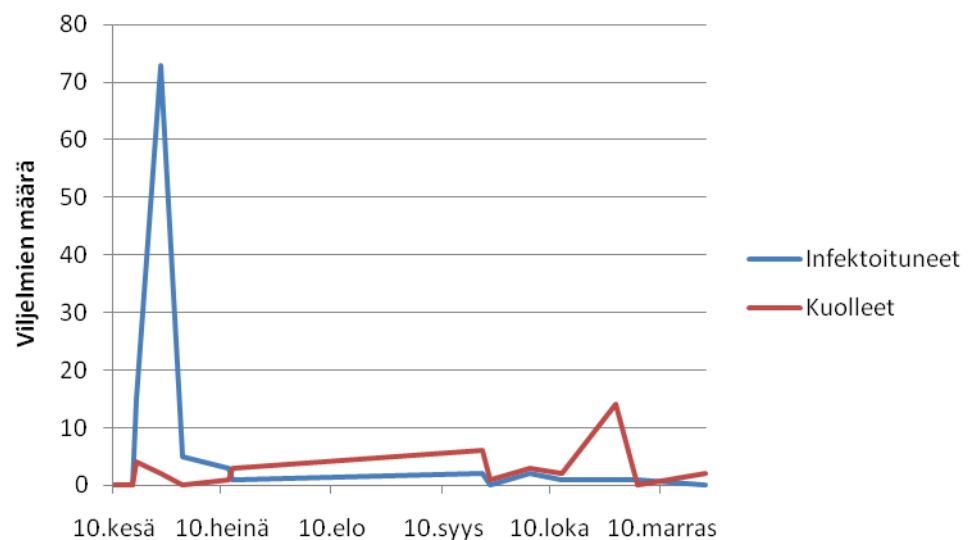
#### 5.4 Kasvikantojen ja -erien vertailu

Kasvikantojen vertailussa on otettava huomioon sekä infektoituneet, että kuolleet ja elossa selviytyneet aloitukset. Infektoituneita aloituksia oli KOR A-kannalla 61 %, KOR B-kannalla 47 % ja KOR C-kannalla 85 %. Kaikkein eniten infektoituneita aloituksia oli KOR C-kannalla, ja vähiten KOR B-kannalla (Kuva 12). Kuolleita puolestaan oli eniten KOR B-kannalla (42 %) ja vähiten KOR C-kannalla (10 %). KOR A-kannassa kuolleita oli 34 %. Prosentuaalisesti eniten aloitusvaiheesta hengissä selvinneitä aloituksia oli KOR B-kannassa (16 %). Sen sijaan KOR A-kannasta eloon jäi 6 % ja KOR C-kannasta vain 5 %, joka on huomattavasti vähemmän kuin KOR B-kannalla. KOR B-kannan jatkokasvatukseen siirretyt versot olivat myös ensimmäiset, sekä kaikkein parhaankuntoisia kaikista jatkokasvatukseen siirretyistä yksilöistä. Niissä oli jo siirtovaiheessa jokaisessa useampi lehti. Kokeen loppuvaiheessa kaikkein huonoimman näköisiä kasveja olivat KOR A-kannan yksilöt.



Kuva 12 Koreanvaahteran kasvikantojen vertailu.

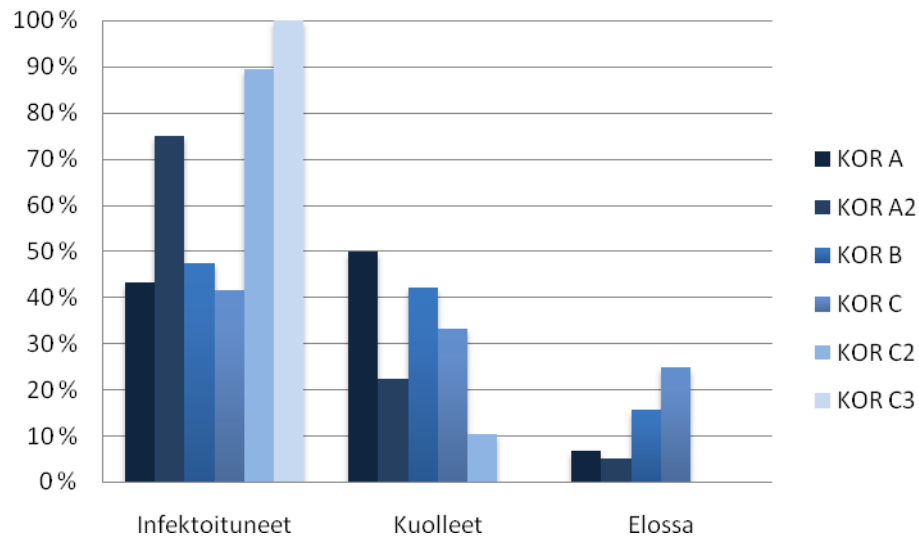
KOR A- ja KOR C-kantojen infektoitumisprosentteja nostavat huomattavasti nimenomaan KOR A2-, KOR C2- ja KOR C3-erien infektoituneet kasvit. Suurin osa kaikista infektoista todettiin kokeen alkuvaiheessa, kun taas kokeen alkuvaiheen jälkeen poistetuista kasveista suurin osa oli kuolleita (Kuva 13). Myöhemmät erät laskevat huomattavasti KOR A- ja KOR C-kantojen eloonjäämisprosenttia. Siksi onkin järkevää vielä vertailla keskenään myös kaikkia kasvieriä.



Kuva 13 Infektoituneiden ja kuolleiden versojen määrän vaihtelut koreanvaahteran mikrolisäyskokeen edetessä.

Kuten kuvasta 14 nähdään, kaikkissa 9.6 kerätyissä erissä oli vähemmän kontaminaatioita kuin 15.6 kerätyissä. Tästä johtuen kuolleisuus on aiemmin kerätyissä erissä suurempaa. Ensimmäisellä keralla kerättyjen erien paljon suurempi kuolleisuus selittyy sillä, että myöhempien erien yksilöt

infektoituivat aikaisessa vaiheessa ja heitettiin näin pois jo aikaisin. Ensimmäisten erien yksilöt puolestaan ehtivät olla kauemmin koeputkissa, ja alkoivat pitkän ajan kuluttua kuolla.



Kuva 14 Koreanvaahteran kasvierien vertailu.

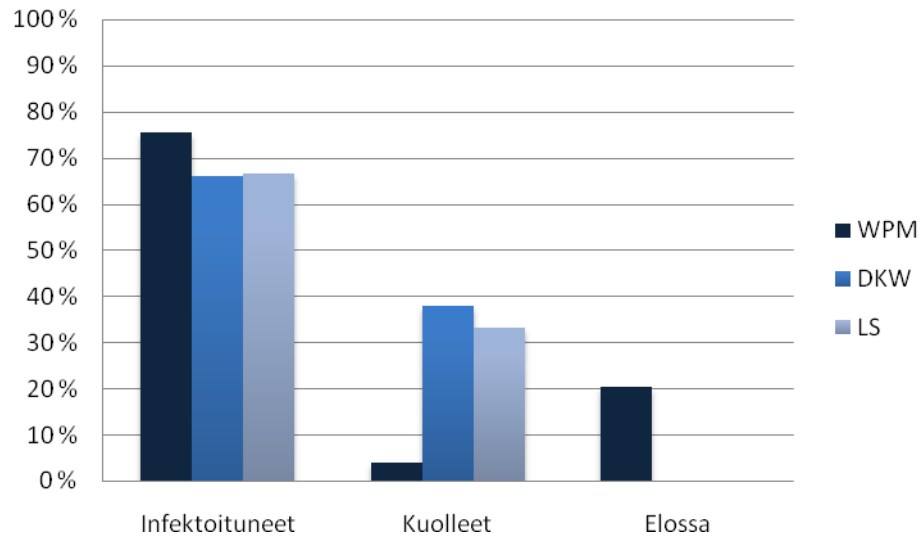
Monista infektioista huolimatta KOR A2-erästä kuitenkin selvisi hengissä sama määrä kasveja kuin aiemmasta KOR A-erästä, kun taas KOR C2- ja KOR C3-eristä yksikään kasvi ei selvinnyt elossa kokeen loppuun asti. Aiemmassa vertailussa jossa saman kasvin erät oli laskettu yhteen parhaalta kasvikkannalta siis näytti KOR B, mutta kun erät erotetaan toisistaan prosentuaalisesti suurin osa eloon jääneitä kasveja oli KOR C-erässä.

## 5.5 Ravintoalustojen vertailu

Kokeen tarkoituksena oli tutkia myös koreanvaahteran kasvua eri aloitusaluustoilla. Verrattaessa kasvieriä toisiinsa on edelleen huomioitava se, että myöhemmin kerätyissä erissä on aikaisempia erää enemmän infektioita riippumatta alustasta. KOR A-kannalla infektioita oli eniten WPM-alustalla ja vähiten DKW-alustalla (Taulukot 3 ja 4). KOR B-kannalla infektioita oli saman verran kaikilla alustoilla, ja kuolleita saman verran DKW- ja LS-alustoilla (Taulukko 5). WPM-alustalla ei tällä koreanvaahterakannalla ollut lainkaan kuolleita. Kaikki eloon jääneet yksilöt puolestaan olivat WPM-alustalla. KOR C-kannalla yhteensä eniten infektioita oli DKW-alustalla ja vähiten WPM-alustalla, joskin erot ovat melko pieniä (Taulukot 6, 7 ja 8). Kuolleita oli eniten LS-alustalla ja vähiten WPM-alustalla. Kaikki eloon jääneet olivat jälleen WPM-alustalla.

Kokonaisuudessaan ravintoalustojen vertailussa DKW-alusta ja LS-alusta ovat melko lähellä toisiaan, ainakin verrattuna WPM-alustaan, jonka tulokset poikkeavat täysin kahden muun alustan tuloksista (Kuva 15). Infektioita esiintyi kaikilla alustoilla runsaasti, mutta kuitenkin eniten WPM-alustalla (76 %). DKW-alustalla ja LS-alustalla infektioita oli lähes saman

verran (DKW 66 % ja LS 67 %). Kuolleita kasveja puolestaan oli kaikkein vähiten WPM-alustalla (4 %). DKW- ja LS-alusta olivat tässäkin asiassa kohtalaisen tasaväkisiä, sillä DKW-alustalla kuolleisuus oli 38 % ja LS-alustalla 33 %.

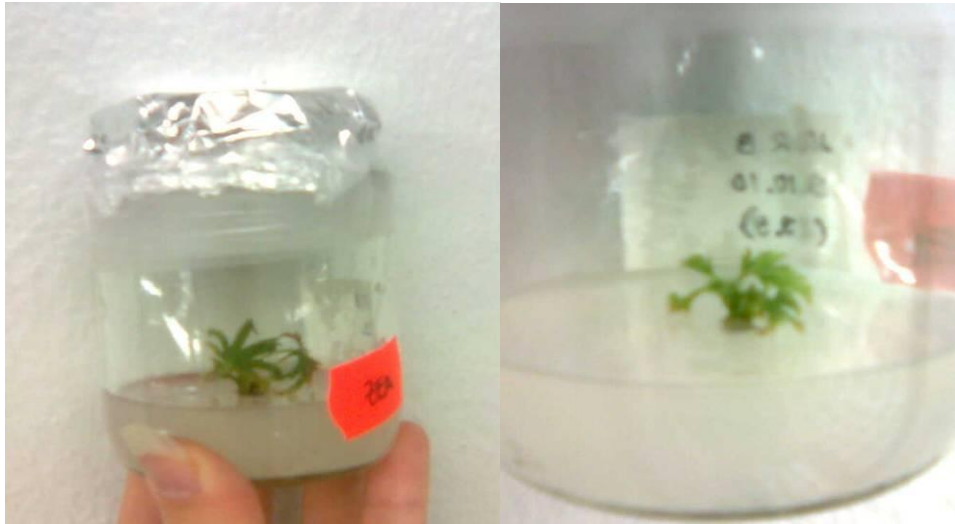


Kuva 15 Ravintoalustojen vertailu koreanvaahteran mikrolisäyksessä.

Huomattavaa on, että kaikki eloon jääneet ja jatkokasvatukseen päässeet versot olivat WPM-alustalla. Kaksi DKW-alustalla ollutta kasvia pysyivät elossa viimeiseen siirrostukseen asti, mutta sen jälkeen nekin todettiin kuolleiksi. LS-alustan kasveista puolestaan yksikään ei päässyt edes viimeiseen siirrostukseen asti. Näyttäisi siis siltä, että WPM-alusta olisi näistä kolmesta alustasta paras koreanvaahteran mikrolisäyksen aloitusvaiheeseen.

## 5.6 Jatkokasvatus

Lopulta jatkokasvatukseen asti pääsi vain viisi aloitusta. Näistä kolme oli KOR B-kantaa (Kuva 16) ja kaksi KOR C-kantaa. Loput viisi kymmenestä eloonjääneestä aloituspalasta jäivät kokeen lopussa edelleen aloitusaluksille koeputkiin, joissa niiden kasvu oli hyvin hidasta.



Kuva 16 Jatkokasvatukseen päässeitä KOR B-kannan koreanvaahtera-aloituksia.

Ensimmäisinä monistusalustoille siirretyt KOR B-kannan yksilöt ehdittiin kokeen aikana siirrostaa ensimmäisen kerran uusille monistusalustoille, jolloin alun perin kolmesta aloituspalasta saatiin jo yhteensä kymmenen yksilöä. KOR C-kannan yksilöt sen sijaan olivat vielä kokeen loppuvaiheessa melko pieniä ja huonompikuntoisia kuin KOR B yksilöt.

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen tulosten mukaan on perusteltua todeta WPM-alustan olevan tutkimuksen alustoista paras koreanvaahteran mikrolisäyksen aloitusvaiheeseen, sillä kaikki kokeesta eloon jääneet ja jatkokasvatukseen päässeet yksilöt olivat WPM-alustalla. Toiseksi paras alusta havaintojen perusteella olisi DKW ja huonoin LS-alusta. Tämä siksi, että kaksi kasviyksilöä sinnitteli DKW-alustalla kokeen loppumetreille asti, kun taas kaikki LS-alustan yksilöt infektoituivat tai kuolivat jo aikaisemmassa vaiheessa.

Tulosten perusteella voidaan olettaa, että zeatiini ei varmaankaan ole paras mahdollinen hormonivalinta koreanvaahteran mikrolisäykseen. Tässä kokeessa kyseistä hormonia oli suurimmassa osassa alustoista (WPM + zea 2 mg/l, WPM + zea 1,5 mg/l ja DKW + zea 2 mg/l) ja tulokset olivat melko huonoja. Myös BAPn soveltuminen tähän lisäykseen näyttää huonolta, sillä BAPia oli vain LS-alustassa, eikä yksikään kyseisellä alustalla olleista versoista jäänyt henkiin. Jatkotutkimuksia voisi tehdä eri kasvihormoneilla joilla on saatu hyviä tuloksia muiden vaahteroiden mikrolisäyksessä. Varsinkin TDZaa kannattaisi testata aikaisempien tutkimusten valossa.

Eri koreanvaahterakannoista parhaiten selviytyi KOR B-kanta, mutta jos verrataan kaikkia kasvieriä keskenään, niin paras oli KOR C-kannan ensimmäinen erä. Toisella keräyskerralla (15.6) haettujen versojen viljelmässä oli niin paljon enemmän kontaminaatioita kuin ensimmäisen kerran (9.6) versojen viljelmissä, että keräysajankohdan voidaan katsoa vaikuttaneen suuresti kontaminaatioiden määrään. KOR C3-erän kontaminaatioiden suureen määrään saattoi vaikuttaa myös se, että kyseisen erän versot olivat vesiastiassa vuorokauden pidempään kuin muiden erien versot. Myöhemmän keräyskerran versoista olisi voitu saada parempia tuloksia jos niille olisi käytetty vahvempaa sterilointia ja näin pystytty estämään osa kontaminaatioista. Myös yleisesti kaikissa koreanvaahteraerissä oli niin paljon kontaminaatioita, että jatkotutkimuksissa voitaisiin käyttää vahvempaa sterilointia.

Etenkin KOR B-kannan jatkokasvatukseen päässeet yksilöt vaikuttivat niin hyväkuntoisilta, että niistä on mahdollista perustaa kunnollinen mikroviljelmä. Tämä on erityisen hyvä uutinen siltä kannalta, että KOR B yksilöstä olisi vaikeaa saada uutta lisäysmateriaalia lähiaikoina puun nuorena vuoksi, kun taas KOR A ja KOR C yksilöistä on mahdollista saada piankin uutta materiaalia. Jatkossa KOR A- ja KOR C-kannan yksilöistäkin voitaisiin yrittää tehdä uusia aloituksia ja yrittää saada myös niistä aikaan kunnolliset mikroviljelmät. Työtä on mahdollista hyödyntää jatkossa suunniteltaessa koreanvaahteran tai muiden vaahteroiden mikrolisäystä.



## LÄHTEET

- Alanko, P. 1988. Puut ja pensaat. 4. painos. Helsinki: Tammi.
- Bean, W. J. & Murray, J. 1976. Trees & shrubs hardy in the British Isles. Volume I A-C. 8. uudistettu painos. Iso-Britannia. Lontoo: Butler & Tanner Ltd.
- Bowen-O'Connor, C. A., Hubstenberger, J., Killough, C., St. Hilaire, R. & VanLeeuwen, D. M. 2007. *In vitro* propagation of *Acer grandidentatum* nutt. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 43, 40-50.
- Bridgeman, P. 1979. Trees for town & country. A practical guide to planting & care. Yhdysvallat. Vermont: David & Charles Inc.
- Dirr, M. A. 1990. Manual of woody landscape plants, their identification, ornamental characteristics, culture, propagation and uses. 4. painos. Champaign, Illinois: Stipes publishing company.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: The Technology. 2. uudistettu painos. Englanti, Edington: Exegetics Limited.
- George, E. F. 1993/1996. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2: In Practice. 2. uudistettu painos. Englanti, Edington: Exegetics Limited.
- George, E. F. & Debergh, P. C. 2008. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. Teoksessa George, E. F., Hall, M. A. & de Klerk, G-J (toim.) Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Volume 1. The background. Netherlands. Dordrecht: Springer.
- Haapala, T. & Niskanen A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. Helsinki: Valtion painatuskeskus.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. & Geneve, R. L. 1997. Plant Propagation, Principles and Practices. 6. painos. USA. New Jersey: Prentice Hall.
- Holmåsen, I. 1991. Pohjolan puut ja pensaat. Helsinki: WSOY.
- Hämet-Ahti, L., Palmén, A., Alanko, P. & Tigerstedt, P. M. A. 1992. Suomen puu- ja pensaskasvio. 2. uudistettu painos. Helsinki: Yliopistopaino.
- Jozwik, F. X. 1992. The greenhouse and nursery handbook. Yhdysvallat. Mills, Wyoming: Andmar Press.
- Kerns, H. R. & Meyer, M. M. Jr. 1988. Micropropagation of selected *Acer* sp. and cultivars. HortScience 23: 452.

Kujala, N. 2010. Huntuvaahteran (*Acer trifolium*) ja japaninvaahteran (*Acer palmatum* ssp. *amoenum*) mikrolisäyksen aloitusvaiheen menetelmät. Hämeen ammattikorkeakoulu. Puutarhatalouden koulutusohjelma. Opinnäytetyö.

Linsmaier, E. & Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18, 100–127.

Lloyd, G. & McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. The International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings 30: 421–427.

Machakova, I, Zazimalova, E. & George, E. F. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and antagonists. Teoksessa George, E. F., Hall, M. A. & de Klerk, G-J (toim.) Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Volume 1. The background. Netherlands. Dordrecht: Springer.

Preece, J. E., Huetteman, C. A., Ashby, W. C. & Roth, P. L. 1991. Micro- and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 142-148.

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

Riikonen, A. 2004. Sytokiniinin ja solukkotyyppin vaikutus metsävaahteran mikrolisäyksen onnistumiseen. Helsingin yliopisto. Maatalousmetsätieteellinen tiedekunta. Soveltavan biologian laitos. Pro gradu-tutkielma.

Smith, R. H. 2000. Plant tissue culture. Techniques and experiment. 2. painos. USA. Orlando: Academic press.

Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G-J., Roberts, A. & George, E. F. 2008. The components of plant tissue culture media I: Organic acids, osmotic and pH effects, and support systems. Teoksessa George, E. F., Hall, M. A. & de Klerk, G-J (toim.) Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Volume 1. The background. Netherlands. Dordrecht: Springer.

Uosukainen, M. 1997. Kontaminaatiot solukkoviljelylaboratoriossa. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisu. Sarja A 18, 9-17.

Van Gelderen, D. M., De Jong, P. C. & Oterdoom, H. J. 1994. Maples of the World. U.S.A., Oregon: Timber Pres, Inc.

Van Gelderen, D. M. 1999. Maples for gardens: a color encyclopedia. U.S.A. Oregon: Timber Pres, Inc.

Welsh, K., Sink, K. C. & Davidson H. 1979. Progress on in vitro propagation of red maple. Comb Proc Int Plant Prop Soc 29:382-386

## LS-alusta

(Linsmaier &amp; Skoog 1965; Uosukainen 1997)

KANTALIUKOKSET			RAVINTOLIUS		
Nimike	Yhdiste	Pitoisuus	ml kant. /1	Pitoisuus	
				mg/l	mM
LS-pääravinteet (MS-makro)		<b>g/l 10x</b>	<b>100</b>		
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ammoniumnitraatti (hapettava)	16,5		1650	20,6
	KNO <sub>3</sub> kaliumnitraatti (hapettava)	19,0		1900	18,8
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O kalsiumkloridi (ärsyttävä)	4,4		440	3,0
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O magnesiumsulfaatti	3,7		370	1,5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> kaliumdivetyfosfaatti	1,7		170	1,25
LS-hivenaineet (MS-mikro)		<b>mg/100 ml 1000x</b>	<b>1</b>		
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> boorihappo	620		6,2	0,1
	MnSO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O mangaanisulfaatti (haitallinen)	1690		16,9	0,1
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O sinkkisulfaatti (ärsyttävä)	860		8,6	0,03
	KI kaliumjodidi	83		0,83	0,005
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O natriummolybdaatti	25		0,25	0,001
Erilliset kantaliuokset mg/100 ml 10000x	*CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 25 mg kuparisulfaatti (haitallinen)	<u>10 ml</u>		0,025	0,0001
	*CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 25 mg kobolttikloridi (myrkyllinen)	<u>10 ml</u>		0,025	0,0001
<b>LS-Fe = MS-F</b>		<b>mg/100 ml 200x</b>	<b>5</b>		
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O rauta(II)sulfaatti (ärsyttävä)	557		27,8	0,1
	Na <sub>2</sub> EDTA etyleenidiamiinitetraetikkaha- pon natriumsuola = Titriplex III (ärsyttävä)	745		37,3	0,1
	<b>tai</b> NaFe-EDTA, EDTA:n natrium- rauta(III)suola	734		36,7	0,1
LS-vitamiinit		<b>mg/100 ml 500x</b>	<b>2</b>		
Kantaliuos jaetaan 2 ml:n eriin, jotka säilytetään syväjääs- sä (n. -20 °C).	tiamiinidikloridi (B <sub>1</sub> -vitamiini)	20		0,4	0,001
Myoinositoli (sokerialkoholi)		<b>1,0g /100 ml 100x</b>	<b>10</b>	100 tai punnitaan erikseen	0,56
Sakkarosi (ruokosokeri)				<b>30000</b> punnitaan erikseen	87,6
<b>pH</b>	Tilavuus → n. 4/5 lopullisesta tilavuudesta			<b>5,7</b>	
	Tilavuus → 1 litra mittapullossa				
Agar				<b>8500</b> punnitaan erikseen, liuotetaan kuumenta- malla lämpölevyllä + magneettisekoitus	

## WPM-alusta

(Lloyd &amp; McCown 1980; Uosukainen 1997)

KANTALIUKOKSET			RAVINTOLIUKOS		
Nimike	Yhdiste	Pitoisuus g / 100 ml	ml kant. / l	Pitoisuus	
				mg/l	mM
WPM-A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ammoniumnitraatti (hapettava)	2.00	20	400	5.0
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O kalsiumnitraatti (hapettava, ärsyttävä)	2.78		556	2.4
WPM-B	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kaliumsulfaatti (hapettava)	4.95	20	990	5.7
WPM-C	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O kalsiumkloridi (ärsyttävä)	1.92	5	96	0.65
WPM-D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> kaliumdivetyfosfaatti	3.4	5	170	1.25
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> boorihappo	0.124		6.2	0.1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O natriummolybdaatti	0.005		0.25	0.001
WPM-E	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O magnesiumsulfaatti	7.4	5	370	1.5
	MnSO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O mangaanisulfaatti (haitallinen)	0.446		22.3	0.13
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O sinkkisulfaatti (ärsyttävä)	0.172		8.6	0.03
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O kuparisulfaatti (haitallinen)	0.005		0.25	0.001
WPM-F = MS-Fe	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O rauta(II)sulfaatti (ärsyttävä)	0.557	5	27.8	0.1
	Na <sub>2</sub> EDTA etyleenidiamiinitetraetikkahapon natriumsuola = Titriplex III (ärsyttävä)	0.745		37.3	0.1
	tai NAFe-EDTA, EDTA:n natrium- rauta(III)suola	0.734	5	36.7	0.1
WPM-G (vitamiinit) Kantaliuos jaetaan 5 ml:n eriin, jotka säilytetään syväjässä (n. -20 °C).	tiiamiinidikloridi (B <sub>1</sub> -vitamiini)	0.02	5	1.0	0.003
	nikotiinihappo (B <sub>3</sub> -vitamiini) (ärsyttävä)	0.01		0.5	0.004
	pyridoksolihydrokloridi (B <sub>6</sub> -vitamiini)	0.01		0.5	0.002
	glysiini (aminohappo)	0.04		2.0	0.027
Myo-inositoli (sokerialkoholi)		1.0	10	100 tai punnitaan erikseen	0.56
Sakkaroosi (ruokosokeri)				20000 punnitaan erikseen	58.5
pH	Tilavuus → n. 4/5 lopullisesta tilavuudesta			5.2	
	Tilavuus → 1 litra mittapullossa				
Agar				8500 punnitaan erikseen, liuotetaan kuumentamalla lämpölevyllä + magneettisekoitus	

DKW-alusta

(George 1993/1996; Uosukainen 1997)

KANTALIUKOKSET			RAVINTOLIUOS		
Nimike	Yhdiste	Pitoisuus	ml kantal. / l	Pitoisuus	
				mg/l	mM
DKW-pääravinteet (DKW-makro)		<b>g/l 10x</b>	<b>100</b>		
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ammoniumnitraatti (hapettava)	14,17		1417	17,7
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x4 H <sub>2</sub> O kalsiumnitraatti	19,6		1960	8,3
	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O kalsiumkloridi (ärsyttävä)	1,47		147	1,14
	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O magnesiumsulfaatti	7,4		740	3,0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> kaliumdivetyfosfaatti	2,59		259	1,9
WPM-B erillinen liuos	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kaliumsulfaatti	49,5	<b>31,5</b>	1560	8,95
DKW-hivenaineet (DKW-mikro)		<b>mg/100 ml 1000x</b>	<b>1</b>		
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> boorihappo	480		4,8	0,078
	MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O mangaanisulfaatti (haitallinen)	3380		33,8	0,2
	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O sinkkinitraatti	1700		17,0	0,057
	CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O kuparisulfaatti	25		0,25	0,001
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O natriummolybdaatti	39		0,39	0,0016
	NiSO <sub>4</sub> x6H <sub>2</sub> O nikkelsulfaatti	0,5		0,005	0,00002
WPM-MS-Fe		<b>mg/100 ml</b>	<b>6</b>		
	FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O rauta(II)sulfaatti (ärsyttävä)	557		33,4	0,12
	Na <sub>2</sub> EDTA etyleenidiamiinitetraetikkahapon natriumsuola = Titriplex III (ärsyttävä)	745		44,7	0,13
	tai NaFe-EDTA, EDTA:n natriumrauta(III)suola	734		44,0	0,12
DKW-vitamiinit		<b>mg/250 ml 200x</b>	<b>5</b>		
Kantaliuos jaetaan 5 ml:n eriin, jotka säilytetään syväjässä (n. -20 °C).	tiamiinidikloridi (B <sub>1</sub> -vitamiini)	100		2	0,006
	nikotiinihappo(B <sub>6</sub> -vitamiini)	50		1	0,008
	glysiini (aminohappo)	100		2	0,027
Myoinositoli (sokerialkoholi)		<b>1,0g /100 ml 100x</b>	<b>10</b>	100 tai punnitaan erikseen	0,56
Sakkaroosi (ruokosokeri)				<b>30000</b> punnitaan erikseen	87,6
<b>pH</b>	Tilavuus → n. 4/5 lopullisesta tilavuudesta			<b>5,7</b>	
<b>Agar</b>	Tilavuus → 1 litra mittapullossa			<b>8500</b> punnitaan erikseen, liuotetaan kuumentamalla lämpölevyllä + magneettisekoitus	
<b>Bacto Peptone</b>				<b>270 mg</b>	