

LEPOTILAISTEN JA *IN VITRO* -SILMUJEN KRYOSÄILYTYSMENETELMIEN VERTAILU ALPPIRUUSULLA

Ville-Pekka Järvinen

Opinnäytetyö
Marraskuu 2010

Laboratorioalan koulutusohjelma
Tekniikan ja liikenteen ala





Tekijä(t) JÄRVINEN, Ville-Pekka	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 15.11.2010
	Sivumäärä 73	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi LEPOTILAISTEN JA <i>IN VITRO</i> -SILMUJEN KRYOSÄILYTYSMENETELMIEN VERTAILU ALPPIRUUSULLA		
Koulutusohjelma LABORATORIOALA		
Työn ohjaaja(t) VÄRTÖ-NIEMI, Merja, lehtori		
Toimeksiantaja(t) MTT Kasvintuotannon tutkimus, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, asiakaspäällikkö, vanhempi tutkija NUKARI, Anna, tutkija		
Tiivistelmä <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli vertailla kahta alppiruusun eri kryosäilytysmenetelmää Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) kasvintuotannon tutkimuksen Laukaan toimipisteessä. Vertailut menetelmät olivat modifioitu pisaravitrifikaatiomenetelmä, jossa käytettiin meristeemejä <i>in vitro</i> -kasvatetuista mikroviljelmistä ja lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmää, jossa käytettiin MTT:n Laukaan toimipisteen alueelta kerättyjä lepotilaisia silmuja. Tutkimuksiin käytetyt alppiruusulajikkeet olivat 'Elviira', 'Eino' ja St Michel'.</p> <p>Kaikki tutkimukset laitettiin alulle MTT:n Laukaan toimipaikassa kevään 2010 aikana ja aineiston havainnointia jatkettiin syksyyn 2010 asti. Molemmissa menetelmissä seurattiin omia muuttujiaan, joista merkittävimpiä olivat lepotilaisten silmujen pakastuksen kannalta natriumhypokloriitin käytön vaikutukset ja pisaravitrifikaatiomenetelmän osalta jäänestökäsittelyiden pituus.</p> <p>Lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmä ei osoittautunut käyttökelpoiseksi alppiruusuille. Elpyminen oli heikkoa lepotilaisten silmujen osalta, eivätkä elpyneetkään silmut versoontuneet riittävästi kunnollisten mikroviljelmien muodostamiseksi. Pisaravitrifikaation puolesta tulokset olivat huomattavasti parempia. Menetelmä osoittautui käyttökelpoiseksi ainakin lajikkeille 'Eino' ja 'St Michel', joiden molempien elpymis- ja versoontumisprosentit olivat kohtuullisen korkeat.</p> <p>Tutkimuksista kerätyt tulokset eivät olleet riittävän kattavia toimivan kryosäilytysmenetelmän luomiseksi alppiruusuille, mutta tuloksien pohjalta laadittiin suositus, jota voidaan käyttää hyvänä pohjana jatkotutkimuksille.</p>		
Avainsanat (asiasanat) Alppiruusu, kryosäilytys, pisaravitrifikaatio, lepotilaisten silmujen pakastus, vertailu		
Muut tiedot		



Author(s) JÄRVINEN, Ville-Pekka	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 15.11.2010
	Pages 73	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (X)
Title COMPARISON OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUES USING DORMANT BUDS AND <i>IN VITRO</i> GROWN SHOOT TIPS IN CRYOPRESERVATION OF RHODODENDRON		
Degree Programme Degree Programme in Laboratory Sciences		
Tutor(s) VÄRTÖ-NIEMI, Merja, Lecturer		
Assigned by MTT Agrifood Research Finland, Plant Production Research, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, Customer Manager, Senior Research Scientist NUKARI, Anna, Research Scientist		
Abstract <p>The aim of the study was to compare two different methods used in the cryopreservation of rhododendron for the Plant Production Research unit of Agrifood Research Finland (MTT). The methods compared were a modified droplet-vitrification method using meristems from <i>in vitro</i> -grown microcultures, and a fast freezing method using dormant buds gathered within the domain of MTT Laukaa. The three rhododendron cultivars used in the study were 'Elviira', 'Eino' and 'St Michel'.</p> <p>All work for the study was conducted at MTT Laukaa during the spring of 2010 with observation of the results extending to fall 2010. Both methods had their own variables with the effects of sodium-hypochlorite usage being the most significant for the fast freezing method and the duration of cryoprotectant treatments for the droplet-vitrification.</p> <p>The results suggested that fast freezing is not a viable method for cryopreservation of rhododendrons. Most of the dormant buds did not survive the cryopreservation and those that did, were unable to form reasonable amounts of new shoots. The droplet-vitrification on the other hand presented much more positive results as it proved to be applicable for at least the cultivars 'Eino' and 'St Michel' which both demonstrated reasonably high survival and sprouting percentages.</p> <p>The data gathered was not conclusive enough to produce a working cryopreservation protocol for rhododendrons but the results provided good recommendations that serve as guidelines for future studies.</p>		
Keywords Rhododendron, cryopreservation, droplet-vitrification, fast freezing method, comparison		
Miscellaneous		

SISÄLTÖ

SANASTO.....	5
1 JOHDANTO.....	7
2 KASVIGEENIVARAOHJELMA	8
2.1 Kansallinen geenivaraohjelma	8
2.2 Laukaan kryopankki	9
3 ALPPIRUUSUT.....	10
3.1 Alppirusujen ominaisuudet	10
3.2 Luokittelu.....	10
3.3 Jalostus Suomessa	11
3.4 Opinnäytetyöhön valitut alppirusulajikkeet.....	12
3.4.1 Valinnan perusteet	12
3.4.2 'Elviira'	12
3.4.3 'St Michel'	13
3.4.4 'Eino'	13
4 SOLUKKOVILJELY	14
4.1 Solukkoviljelyn perusteet	14
4.2 Meristeemiviljelmät.....	15
4.3 Kasvatusalustat.....	16
4.4 Alppirusun kasvupistelisäys.....	17
5 KRYOSÄILYTYS	18
5.1 Kryosäilytyksen perusteet.....	18
5.2 Kryosäilytysmenetelmät	19
5.2.1 Kontrolloitu jäädytys	20
5.2.2 Vitrifikaatiomenetelmä	21
5.2.3 Kapselointi-dehydraatio menetelmä	22
5.3 Lepotilaisten silmujen käyttö kryosäilytyksessä.....	23
6 KOEASETELMA	25
6.1 Opinnäytetyn tausta	25
6.2 Opinnäytetyön muuttujat	25
7 KOEJÄRJESTELYT.....	26
7.1 Kokeissa käytetyt kasvatusalustat	26
7.2 Vitrifikaatio	27

	2
7.2.1 Silmujen otto ja aineiston esikäsittely	27
7.2.2 Vitrifikaatioprosessi.....	29
7.2.3 Vitrifoitujen silmujen elvytys ja havainnointi.....	30
7.3 Lepotilaisten silmujen pakastus	31
7.3.1 Silmujen keruu ja pakastus.....	31
7.3.2 Lepotilaisen aineiston sulatus ja havainnointi.....	32
8 TULOKSET.....	33
8.1 Solukkoviljelmistä eristettyjen <i>in vitro</i> -silmujen tulokset.....	33
8.1.1 Kontaminaatiot ja emokasvien iän vaikutus	33
8.1.2 Hankasilmujen ja aktiivihiiilen käyttö	35
8.1.3 Esikasvatuksen merkitys silmujen elpymiseen	35
8.1.4 Optimaalinen PVS2-käsittelyaika.....	36
8.1.5 Aineiston jakautuminen ja luokittelu.....	38
8.2 Ulkoa kerättyjen lepotilaisten silmujen tulokset.....	39
8.2.1 Pakkasvauriot	39
8.2.2 Kontaminaatiot ja kloriitin vaikutus	40
8.2.3 Silmujen sijainnin merkitys.....	40
8.2.4 Lajikkeiden ja keräyserien väliset erot	42
8.2.5 Lepotilaisten silmujen aineiston jakautuminen ja luokittelu.....	43
8.3 Kryosäilytysketjun toimivuus	44
8.4 Menetelmien väliset erot.....	45
9 TULOSTEN TARKASTELU.....	46
9.1 Kryosäilytysmenetelmien toimivuus.....	46
9.1.1 Aineiston elpyminen ja versoontuminen	46
9.1.2 Menetelmien käytännöllisyys.....	47
9.1.3 Aineiston havainnointiaika ja -kriteerit	48
9.1.4 <i>In vitro</i> -aineiston esikasvatus	49
9.1.5 Lepotilaisten silmujen pintasterilointi	49
9.2 Lajikkeiden väliset erot.....	49
9.3 Virhelähteitä.....	50
9.4 Lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmän muokkaus.....	52
9.5 Menetelmäsuositus ja tulevaisuuden näkymät.....	54
LÄHTEET	56
LIITTEET.....	58

KUVIOT

KUVIO 1. 'Elviira'	12
KUVIO 2. 'St Michel'	13
KUVIO 3. 'Eino'	14
KUVIO 4. Kryosäilytyksen vaiheet ja yleisimmät vauriolähteet	20
KUVIO 5. Kaksi mikropistokasta kustakin käytetystä lajista järjestyksessä 'St Michel', 'Eino' ja 'Elviira'	27
KUVIO 6. Kärkisilmun leikkauskohta mikropistokkaasta.....	28
KUVIO 7. Foliosuikaleille siirretyt silmut.....	29
KUVIO 8. Pintasteriloitu (yllä) ja -steriloimaton oksa	32
KUVIO 9. Homeen kontaminoima kasvatusmalja	34
KUVIO 10. Aktiivihieilellisten (+AC) ja aktiivihielettömien (-AC) +LN kokeiden elpymis- ja versoontumisprosentit yhteensä lajikkeilla 'Elviira' ja 'Eino'	35
KUVIO 11. Kaikkien lajien +LN kokeiden yhteenlasketut silmujen elpymis- ja versoontumisprosentit maanantaina ja perjantaina otetuissa erissä.	36
KUVIO 12. PVS2-käsittelyn vaikutus elpymiseen (+LN).....	37
KUVIO 13. PVS2-käsittelyn vaikutus elpymiseen (-LN).....	37
KUVIO 14. PVS2-käsittelyn vaikutus versoontumiseen (+LN)	37
KUVIO 15. PVS2-käsittelyn vaikutus versoontumiseen (-LN)	38
KUVIO 16. Versoontuneiden +LN ja -LN kokeiden yhteenlaskettujen silmujen jakautuminen viikoittain	38
KUVIO 17. Vitrifioitujen +LN silmujen lajikkeiden väliset erot.....	39
KUVIO 18. "Lehti"-luokkaa tai sitä parempien lepotilaisten silmujen jakautuminen viikoittain koko aineistossa.....	43
KUVIO 19. Koko aineiston elpyneiden lepotilaisten silmujen jakautuminen luokittain	44
KUVIO 20. Versoontumisalustalta juuri mikrolisätty 'Eino'-aineisto	44
KUVIO 21. Mikrolisätty 'Eino' aineisto kuukauden kasvatuksen jälkeen.....	45
KUVIO 22. Elpyneiden ja versoontuneiden silmujen prosenttiosuudet lepotilaisten silmujen pakastuksessa (L) ja pisaravitrifikaatiossa (V).....	45

TAULUKOT

TAULUKKO 1. Opinnäytetyössä käytetyt kasvatusalustat ja niiden erityisominaisuudet	27
TAULUKKO 2. Versoontuneiden silmujen luokat ja määritelmät	30
TAULUKKO 3. Lepotilaisten silmujen luokat ja määritelmät	33
TAULUKKO 4. Silmujen lukumäärät ja sijainti kärkisilmusta laskettuna.....	41
TAULUKKO 5. Koko aineiston elpymis- ja versoontumisprosentit kärkisilmusta laskettuna	42
TAULUKKO 6. Pakastettujen silmujen lajikekohtaiset elpymis- ja versoontumisprosentit.....	42

SANASTO

-AC	aktiivihiiletön esikastavusalausta
+AC	aktiivihiiiltä sisältävä esikasvatusalusta
-LN	kontrollikoe, jota ei ole pakastettu
+LN	pakastettu koe-erä
Ainavihanta	ikivihreä kasvi, joka säilyttää lehtensä ympäri vuoden
Akklimatisaatio	kasvin sopeutuminen normaalia epäsuotuisampaan ilmastoon
Amorfinen aine	kiinteää ainetta, jonka rakenneyksiköillä ei ole pitkäkestoista järjestystä tai rakenneyksiköillä ei ole tarkkaa järjestystä
Apikaalidominanssi	(kärjen ylivalta) ilmiö, jossa oksan kärkisilmu estää auksiinihormonin avulla oksan hankasilmuja kasvamasta
Fenoli	kasvin erittämä voimakkaasti hapan yhdiste, jota kasvi käyttää ulkoisilta uhilta suojautumiseen, mutta joka aiheuttaa solukko- viljely-ympäristössä myrkytyksen
Haavasolukko	kasvin vartta tai juurta leikattaessa leikkauspintaan syntyvä suojaava solukko
Hankasilmu (hs)	lehtihangassa kasva silmu
<i>In vitro</i>	"lasissa", tutkimusmenetelmä, jossa koe suoritetaan koeputkessa tai lasimaljalla
Kallus	erilaistumaton haavasolukko
Kesävihanta	kasvi, joka pudottaa lehtensä osaksi vuotta
Kinoni	fenolin hapettuessa syntyvä kasveille myrkyllinen yhdiste
Kontaminaatio	mikro-organismien kasvu solukko- viljelyoloissa
Kärkisilmu (ks)	varren latvassa tai verson kärjessä oleva silmu
LS-liuos	PVS2-liuoksen haittoja lieventävä esikäsittelyliuos
Lämpösummakertymä	vuotuisen kasvukauden pituutta kuvaava luku. Tehoisa lämpösumma saadaan laskemalla yhteen kasvukauden kaikkien vuorokausien keskilämpötilan +5 °C astetta ylittävä osa

Meristeemi	kasvin kasvusolukko, joka ei vielä ole erikoistunut miksikään kasvin osaksi
Mikrolisäys	kasvin aseptinen lisääminen suvuttomasti solukkoviljelyn avulla
MMM	maa- ja metsätalousministeriö
Morfologia	muoto-oppi, jossa tutkitaan eliöiden rakennetta ja sen muodostumista
MS-alusta	yleisin solukkoviljelyssä käytetty kasvualusta
MTT	Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus
PVS2-liuos	plant vitrification solution 2, meristeemien kryosäilytyksessä käytetty liuos
Regeneroituminen	ilmiö, jossa kasvista irrotettuun osaan kehittyvät siitä puuttuvat kasvinosat
Rehydraatio	veden palauttaminen soluihin pakastuksen jälkeen
Sektio	eliöiden luokittelutaso
Somaklonaalinen muuntelu	kasvikloonien joukossa ilmenevä geneettinen muuntelu
Vegetatiivinen	kasvullinen, esim. vegetatiivinen solu on muu kuin sukusolu
Viskositeetti	nesteen kyky vastustaa virtaamista
Vitrifikaatio (1)	aineen muuttuminen amorfiseen lasimaiseen tilaan, joko solun sisäisesti tai ulkoisesti
Vitrifikaatio (2)	kryosäilytyksessä käytetty jäänestoaineita hyödyntävä menetelmä

1 Johdanto

Kasvien geenivarojen säilytys kryomenetelmin on ollut useiden tutkimusten kohteena viimeisten 40 vuoden aikana, mutta rutiininomaisesti kryosäilytystä käytetään vielä vähän. Varsinkin ilmaston lämpeneminen ja siitä johtuva luonnon monimuotoisuuden häviäminen on lisännyt mielenkiintoa geenivarojen säilytyksen kehittämiseen. Menetelmien kirjo on melkein yhtä laaja kuin säilytettävien kasvien määräkin ja tämän vuoksi tulee harkita tarkkaan, missä muodossa kukin laji olisi parasta tai edes mahdollista säilyttää. Tämä on johtanut siihen, että vaikka valmiita kirjallisia protokollia löytyykin melko runsaasti, on niiden soveltaminen käytännössä usein hyvin työlästä ja runsaasti henkilöresursseja vaativaa. (Reed 2008, 3–4.)

Alppiruusut ovat olleet hyvin tärkeässä osassa puuvartisten kasvien jalostuksessa, mutta niille ei vielä ole omaa kryosäilytysmenetelmäänsä. Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää menetelmä, joka olisi sovellettavissa yhtä aikaa mahdollisimman monelle eri alppiruusulajikkeelle. Tämän vuoksi tutkittaviksi alppiruusuiksi valittiin mahdollisimman kattavasti erilaisia alppiruusutyyppejä edustavat lajikkeet 'Elviira', 'St Michel' ja 'Eino'. Kryosäilytyksen kannalta tutkimuksen kohteeksi otettiin kaksi toisistaan lähtökohdiltaan erilaista menetelmää, joista kummallakin on erittäin selkeät hyvät sekä huonot puolensa.

Vitrifikaatiomenetelmässä, jossa käytetään *in vitro* -kasvatettua aineistoa, kaikki työ voidaan suorittaa laboratoriossa hyvin pienessä tilassa eikä kasvia tarvitse kasvattaa täysikasvuisiksi. Menetelmä kuitenkin vaatii erittäin monia välivaiheita kaikissa työvaiheissa, ja tämän vuoksi yhden erän käsittelyyn kuluu useita päiviä, jolloin riskitekijät lisääntyvät.

Jos käytössä on lepotilaisia silmuja, voidaan yhden päivän aikana pakastaa sama määrä silmuja kuin vitrifikaatiomenetelmällä viikossa. Menetelmä on myös muilta osiltaan vitrifikaatiota huomattavasti yksinkertaisempi. Menetelmän heikkoutena ovat ulkoisten tekijöiden aiheuttamat ongelmat kuten pakkasvaurioiden riski sekä se, että materiaali on *in vitro* -aineistoa epäpuhtaampaa ja siksi myös alttiimpaa kontaminaatioille.

Opinnäytetyön tavoitteena oli todeta toinen käytetyistä menetelmistä paremmaksi jatkokehityksen kannalta ja samalla luoda pohja varsinaisen kryosäilytysmenetelmän

laatimiselle. Menetelmistä pyrittiin myös löytämään selkeimmät optimointia vaativat muuttujat ja samalla tutkimaan, ovatko lajikkeiden väliset erot merkittäviä kryosäilytyksen onnistumisen kannalta.

2 KASVIGEENIVARAOHJELMA

2.1 Kansallinen geenivaraohjelma

Kansallinen kasvigeenivaraohjelma aloitettiin vuonna 2003 Suomen maa- ja metsätalouden geenivarojen säilymisen takaamiseksi. Geenivaraohjelman toteutusta valvoo maa- ja metsätalousministeriön alainen geenivaraneuvottelukunta. Varsinainen ohjelman koordinointi on jaettu kahtia siten, että METLA (Metsäntutkimuslaitos) huolehtii metsäpuiden geenivarojen suojelusta ja MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus) maa- ja puutarhatalouden geenivarojen säilytyksessä. Ohjelman perustana on kaksi kansainvälistä sopimusta: biologisen monimuotoisuuden suojelua koskeva *Convention on Biological Diversity, CBD* (1996) ja maatalouden kasvigeenivaroja koskeva *International Treaty on Plant Genetic Resources, IT-PGRFA* (2004). CBD:ssä määritellään valtioille täysi oikeus geeni- ja luonnonvaroihinsa sillä edellytyksellä, että toiminnassa otetaan huomioon luonnon monimuotoisuus ja kestävä käyttö. (Aaltonen, Antonius, Juhanoja, Järvelin, Laamanen, Nukari, Peräinen, Sahramaa, Uusukainen & Uusitalo, 2006, 9; Suomen kansallinen kasvigeenivaraohjelma suojelutyön tukena 2003–2008, 2008, 8.)

Geenivarojen säilytyksessä käytetään hyväksi laajaa valikoimaa erilaisia metodeja säilytyksen onnistumisen ja aineiston saatavuuden takaamiseksi. Säilytystavat voidaan jakaa kahteen ryhmään sen mukaan, tapahtuuko säilytys luonnonmukaisessa ympäristössä vai ei. Luonnonmukaisessa ympäristössä (*in situ*) säilytettävä aineisto käsittää suojelualueet, viljeltyt luonnonalueet sekä varsinaiset viljelyalueet. Ei luonnollisessa ympäristössä (*ex situ*) tapahtuva säilytys kattaa niin *in vitro* -kasvatetut kuin kenttägeenipankkiin säilötyt sekä kasvihuone-, pakkas- ja kryosäilytysmenetelmillä säilytettävät aineistot. Kenttä- ja *in vitro* -aineistot toimivat lähinnä käyttöaineistoina kasvinjalostajille ja viljelijöille. Kasvullisesti lisättyjen aineistojen säilytykseen on suositeltu IPGRI:n (International Plant Genetic Resources Institute, nykyinen Bioversity) toi-

mesta kryosäilytystä aina sen ollessa mahdollista mm. somaklonaalisen muuntelun vähäisyyden vuoksi. (Aaltonen ym., 2006, 9–10.)

Maa- ja puutarhatalouden kasvien osalta säilytykseen valitaan kasveja kulttuurihistoriallisen merkityksen, lajin monimuotoisuuden, hyvän taudinkestävyyden tai muiden laatuominaisuuksien, kuten kylmänkestävyyden perusteella. Päätökset säilytettävistä lajikkeista tekevät kansalliset asiantuntijaryhmät, jotka vastaavat kukin yhdestä kokoelmasta. Nämä neljä kokoelmaa ovat 1) viherrakentamisen kasvit, 2) hedelmät ja marjat, 3) vihannekset, rohdokset ja yrtit sekä 4) peltokasvit. Kenttäkokoelmiin on koottuna tällä hetkellä satoja lajeja, ja kokoelmia laajennetaan tarpeen mukaan. (Aaltonen ym., 2006, 11.)

Geenivarojen säilytyksen lisäksi oleellinen osa kasvigeenivaraohjelmaa on tutkimustyö, joka luo pohjan kasvien hyödyntämiselle jalostuksessa ja viljelyssä. Tämänhetkisiä tutkimuskohteita ovat kasvigeenivarojen tunnistus ja rationalisointi DNA-merkkien avulla, säilytysmenetelmät kuten kryosäilytys, kasvigeenivarakokoelmien geneettinen monimuotoisuus sekä niiden hyödyntäminen kasvinjalostuksessa. (Suomen kansallinen kasvigeenivaraohjelma suojelutyön tukena 2003–2008, 2008, 10.)

2.2 Laukaan kryopankki

Laukaan toimipiste kuuluu MTT:n kasvituotannon tutkimusyksikköön, jonka tutkimusalue on puutarhatuotanto. Ryhmä vastaa Suomen varmennetun taimituotannon menetelmäkehityksestä, ydinkasviaineiston puhdistuksesta, ydinkasvipankista sekä taimien tuotantomenetelmistä ja puutarhakasvien geenivarojen kryosäilytyksestä. (MTT Laukaa, 2009.)

Kryosäilytyksen soveltaminen puutarhakasvien pitkäaikaissäilytyksessä aloitettiin MTT:ssä 2004 ja Laukaan kryopankki aloitti toimintansa 2006. Laukaaseen on tallennettuna ensisijaisesti mahdollisimman terveitä ja tautivapaita kansallisesti arvokkaita puutarhakasveja, jotka toimivat rinnakkaiskokoelmina kenttä- ja *in vitro* -kokoelmille. Tehokkaan tilankäytön vuoksi Laukaan kryotankin 30 000 putken kapasiteetilla pysty-

tään kattamaan koko MTT:n kasvigeenivarakokoelma. Varmuusvarastona Laukaan kryopankille toimii Jokioisen toimipaikan kryotankki, jonne on talletettuna pieniä eriä kaikista Laukaassa säilytettävistä kannoista. Ensimmäisiä tankkiin talletettuja materiaaleja olivat vadelman sekä mansikan lajikkeet ja kannat. (Suomen kansallinen kasvigeenivaraohjelma suojeletyön tukena 2003–2008, 2008, 24.)

3 ALPPIRUUSUT

3.1 Alppiruusujen ominaisuudet

Kanervakasvien heimon (*Ericacea*) *Rhododendron*-suku on yksi kasvikunnan suurimmista sukuista ja siihen kuuluu nykyluokituksen mukaisesti miltei tuhat lajia. Tieteellinen nimi muodostuu kreikan kielen ruusua ja puuta tarkoittavista sanoista *rhodon* ja *dendron*. Sukuun kuuluvat alppiruusujen lisäksi myös atsaleat sekä pursut. Useimmat alppiruusulajit ovat kotoisin Itä-Aasian vuoristoseuduilta, kun taas atsaleat ovat suurimmaksi osaksi peräisin Pohjois-Amerikasta. (Väinölä & Jussila 1999, 5–12.)

Alppiruusuissa on sekä ainavihantia että kesävihantia lajeja ja puoliainavihantia lajeja, jotka säilyttävät osan lehdistään talven yli. Lajien väliset kokoerot ovat alppiruusuissa hyvin suuria aina pensasmaisista kääpiölajikkeista (esim. *R. camtschaitcum* Pall.) valtavaan kymmenmetrisiin puihin (esim. *R. arboreum* ssp. *arboreum* Sm.). (Väinölä & Jussila 1999, 5.) Myös muilta ulkoisilta ominaisuuksiltaan alppiruusulajikkeet voivat poiketa toisistaan hyvin paljon kukintojen värin, lehtien muodon sekä talvenkestävyyden suhteen. Lajien moninaisuutta selittävää osin se, ettei lajien välillä juurikaan ole risteytymisesteitä, sekä suuret ja selkeäosaiset kukat, jotka tekevät pölytyksestä helppoa. (Uosukainen 2004, 1–4.)

3.2 Luokittelu

Valtavan lajirikkauden vuoksi *Rhododendron*-suvun morfologiaan perustuva luokittelu on aina ollut hyvin vaikeaa ja kiistanalaista. Nykyinen käytössä oleva virallinen luokittelu on vuodelta 1996, mutta myös se on jo joidenkin sektioiden osalta vanhen-

tunut. Nykyluokituksen mukaan *Rhododendron*-suku jakaantuu kahdeksaan alasu-kuun. Suomessa yleisimmin kasvatettuja ovat toiseksi suurimpaan suomuttomien alppiruusujen *Hymenanthus*-alasu-kuun kuuluvat lajit ja lajikkeet. Lajirikkaus on suurinta suomullisten alppiruusujen *Rhododendron*-alasu-kuussa, johon kuuluu yli 500 lajia. Alasu-kuut jakaantuvat vielä sektioiksi ja alasektioiksi mm. karvojen ja silmujen ase- man, heteiden lukumäärän ja kukintojen rakenteen mukaan. (Väinölä & Jussila 1999, 5–12.)

3.3 Jalostus Suomessa

Suomessa alppiruusujen jalostus alkoi vuonna 1973. Jalostusohjelman tarkoituksena oli luoda Suomen ilmastoon sopeutunut alppiruusulajikkeisto, jossa yhdistyy koris- teellisuus sekä hyvä kylmänkestävyys, sillä suurin osa 1970-luvun alussa ulkomailta tuoduista alppiruusulajikkeista ei menestynyt riittävän hyvin Suomen kylmissä olois- sa. Jalostusohjelman tärkeimmiksi emokasveiksi nousivat erittäin talvenkestävä musti- lanalppiruusu (*R. brachycarpum* ssp. *tigerstedii* Nitz.), nukka-alppiruusu (*R. smirno- wii* Trautv.), puistoalppiruusu (*R. catawbiense* Michaux.) ja näiden hybridit sekä poh- joismaista tuodut koristearvoltaan paremmat mutta aremmat lajit. (Uosukainen 2004, 1–4.)

Vuonna 1987 kaupalliseen lisäykseen valittiin jalostusohjelman tuloksena kuusi laji- ketta: Elviira, 'Hellikki', 'Haaga', 'Helsinki University', 'P.M.A. Tigerstedt' ja 'St. Michel'. Vuoteen 2003 mennessä tuotannossa olevia lajikkeita oli jo 12. Talvenkestä- vyys oli parhaimmillaan lajeissa, joissa emokasvina käytettiin maailman kestävim- mäksialppiruusuksi arvioitua mustilanalppiruusua, jonka heikkous on kuitenkin alttius kevähälloille. Hyvän talvenkestävyyden taustalla on sopeutuneisuus alhaiseen kasvu- kauden lämpösummakertymään ja lyhyeen kasvukauteen sekä kyky pysyä karaistu- neena kovienkin pakkastalvien yli kasvukauden alkuun asti. (Uosukainen 2004, 1–4.)

3.4 Opinnäytetyöhön valitut alppirusulajikkeet

3.4.1 Valinnan perusteet

Opinnäytetyöhön valittiin kolme erimittaisena kasvavaa alppirusulajiketta: 'Elviira' (lyhyt), 'Eino' (keskikorkea) ja 'St Michel' (korkea) (Hokka, Laamanen, Lahtonen Pöyhönen & Uosukainen, 2009, 40–44). Eri korkeuksilla oli merkitystä ennen kaikkea ulkoa kerättyjen lepotilaisten silmujen kohdalla, koska lumen peittävyys vaihteli suuresti eri lajikkeiden välillä. Tämän lisäksi kiinnitettiin huomiota yksittäisiin ominaisuuksiin kuten menestymisvyöhykkeisiin, kylmän- ja kuivankestävyyteen sekä koristeellisiin ominaisuuksiin.

3.4.2 'Elviira'

Lamoalppirusu 'Elviira' (Repens-ryhmä) kasvaa täysikasvuisena vain 0,5 – 0,75 m:n korkuiseksi ja on valituista lajikkeista kaikkein matalin. Alkuperäisiin vuonna 1987 nimettyihin lajikkeisiin kuuluva 'Elviira' on tanakka, versoo tiheästi ja on kukiltaan voimakkaan kirsikanpunainen (ks. kuvio 1). Emokasvina 'Elviiralle' toimi mustilanalppirusu ja pölyttäjänä puoliksi *forrestii*-suvun yksilö (*R. forrestii* ssp. *forrestii*) ja puoliksi tuntematon pölyttäjä. Ulkoiset ominaisuudet, kuten kukkien väri periytyvät suurimmaksi osaksi pölyttäjältä. (Uosukainen 2004, 1–4.)



KUVIO 1. 'Elviira', (Uosukainen, M).

3.4.3 'St Michel'

Marjatanalppiruusu 'St Michel' (Tigerstedtii-ryhmä) kuuluu myös vuonna 1987 nimettyihin lajikkeisiin. 'St Micheliä' pidetään erittäin kestäväenä lajikkeena ja se on valituista lajikkeista kaikkein puumaisin 3–4 m:n korkeudellaan (ks. kuvio 2). Geneettiseltä perimältään 'St Michel' sisältää puoliksi mustilanalppiruusua ja puoliksi nukkaalppiruusua. Lajikkeen molemmat vanhemmat ovat hyvin vaaleakukkaisia sekä erittäin pakkasenkestäviä ja myös 'St Michelin' kukat ovat suuret ja vaaleanpunaiset. Lajikkeen koristeellisuutta lisää sen komea lehdistö. (Uosukainen 2004, 1–4.)



KUVIO 2. 'St Michel' (Uosukainen, M).

3.4.4 'Eino'

Puistoalppiruusu 'Eino' (Catawbiense-ryhmä) kuuluu keskikorkeisiin lajikkeisiin 1,2–2 metrin korkeudellaan (ks. kuvio 3). 'Eino' lisättiin kaupalliseen tuotantoon 2003 ja on kokeisiin valituista lajikkeista kaikkein uusin. 'Einon' perimä sisältää nukka- ja puistoalppiruusun lisäksi noin kolmanneksen erilaisia osittain tuntemattomia pölyttäjiä. Kukiltaan 'Eino' on purppuranpunainen ja muista ominaisuuksista on merkille pantavaa hyvä kuivankestävyys. (Uosukainen, 2004, 1–4.)



KUVIO 3. 'Eino' (Uosukainen, M).

4 SOLUKKOVILJELY

4.1 Solukkoviljelyn perusteet

Solukkoviljelyssä kasvin soluja tai erillisiä osia kasvatetaan steriileissä olosuhteissa emokasvista irrallaan. Irrotettu solukko tai sen osat siirretään kasvityypille ominaiselle kasvatusalustalle, joka sisältää muun muassa sen tarvitsemia sokereita, hivenaineita ja hormoneja. Menetelmä on yksinkertainen, tehokas ja sillä pystytään lisäämään kasveja ympärivuotisesti. Aseptisen työskentelytavan vuoksi solukkoviljelyllä saadaan tuotettua emokasvista täydellisiä geneettisiä kopioita eli klooneja. Varsinkin puuvartisten koristekasvien mikrolisääminen tällä tavoin on kasvavassa suosiossa, sillä niiden muunlainen lisääminen on usein työlästä tai jopa mahdotonta. (Haapala & Niskanen 1992, 13, 22.)

Menetelmän taustalla on Matthias Schleiden ja Theodor Schwannin totipotenssiteoria vuodelta 1838, jonka mukaisesti kasvisolut toisistaan riippumattomina pystyvät kaikki kehittymään kokonaisuksi kasveiksi. Regeneroituminen eli uusien kasvinosien muodostuminen alkaa joko suoraan leikatusta palasta tai kalluksesta (organogeneesi) tai ensin muodostuvan alkion kautta (embryogeneesi). Kun viljelyn lähtökohtana käytetään vegetatiivista solukkoa, saadaan aikaiseksi emokasvin täydellisiä kopioita eli klooneja. Siitepölyä tai munasoluja lähtökohtana käyttävä lisääminen johtaa emokasvista poikkeaviin yksilöihin ja näin tehtyä lisäystä voidaan käyttää hyväksi jalostuksessa. Mikrolisäyksessä käytetään joko meristeemi- versonkärki- tai silmuviljelmiä,

kun taas jalostuksessa käytetään kallus- tai protoplastiviljelmiä. Solukkoviljelyä voidaan käyttää hyväksi myös solu- ja suspensioviljelmissä, joissa tuotetaan kemiallisia yhdisteitä tai keinotekoisia siemeniä, mutta käytännön sovellukset tältä alalta ovat vielä vähäisiä. (Haapala & Niskanen 1992, 13–19.)

4.2 Meristeemiviljelmät

Meristeemisolukko eli kasvusolukko on solukkoa, joka ei vielä ole erikoistunut miksiäkään kasvin osaksi ja pystyy näin muodostamaan kaikkia kasvin rakenneosia kuten juuria tai lehtiä. Meristeemisolukkoa löytyy kaikista kasvinosista, mutta solukkoviljelelmä on helpointa aloittaa lehdenaiheiden suojaamasta silmun kasvupisteessä sijaitsevasta meristeemistä. Meristeemien käsittely on helppoa sekä nopeaa, ja tämän vuoksi puuvartisten kasvien kohdalla meristeemialoitus on paras mikrolisäykseen käytetty aloitusmenetelmä. Meristeemiviljelmiä voidaan pitää hyvin stabiileina, sillä somakloonaalista muuntelua aiheuttavan kallussolukon muodostumista voidaan säädellä helposti. (Haapala & Niskanen 1992, 16–18.)

Oksassa tai mikropistokkaassa olevat lehdenaiheet sekä silmua ympäröivät silmusuomut poistetaan niin, että itse silmu saadaan mahdollisimman hyvin esiin. Meristeemi irrotetaan siten, että osa alapuolista solukkoa tulee mukaan. Näin siksi ettei itse meristeemi vahingoittuisi. Aloituspalat siirretään suljetulle viljelyalustalle joka siirretään kasvatushuoneeseen. Kasvit vaativat siirron uudelle alustalle noin neljän viikon välein, mutta lajikekohtaisesti aika voi olla pidempikin. (Haapala & Niskanen 1992, 16–18.)

Solukkoa leikattaessa leikkuupinta tummuu usein hyvin nopeasti. Syynä on fenoleiden oksidaatio eli hapettuminen myrkyllisiksi kinoneiksi vaurioituneessa solukossa. Mitä pienempi leikattu silmu on, sitä suurempi on silmun ja leikkauspinnan välinen suhde, ja tämän kautta myös vauriot ovat mittavampia. Tästä syystä kärkisilmujen käyttö on usein tehokkaampaa kuin pienempien hankasilmujen. Soluvauriot voidaan minimoida käyttämällä mahdollisimman teräviä työvälineitä. Tummumista voidaan myös ehkäistä käsittelemällä silmuja antioksidanteilla tai pitämällä oksia veden alla silmuja irrotettaessa, jolloin oksidaatio ei ole niin voimakasta. (Bonga & Durzan 1982, 23–24.)

Silmuja siirretään alustalta toiselle, koska ravinnemäärät alustassa vähenevät ja haitallisten yhdisteiden, kuten fenoleiden, muodostuminen ja kerääntyminen kasvatusalustaan jatkuvat. Fenolit ovat kasvin itsensä muodostamia voimakkaasti happamia kemikaaleja, joita kasvi käyttää esimerkiksi solujen väliseen viestintään sekä ulkoisilta ärsykkeiltä, kuten UV-säteilyltä, hyönteisiltä ja patogeeneiltä suojautumiseen. (Keski-talo 2001, 14.) Vapaana kasvualustassa fenolit kuitenkin hiljalleen myrkyttävät kasvin. Meristeemit ovat herkimmillään kasvatuksen alkuvaiheissa, ja sopeutuneiden kasvien kehityksen ohjailu on huomattavasti helpompaa. Kasvimateriaalin kasvatusta ja lisäämistä voidaan jatkaa samanlaisissa noin kuukauden sykleissä kunnes aineistoa on haluttu määrä. Tämän jälkeen kasvi voidaan siirtää joko juurrutukseen tai kryosäilytykseen. (Haapala & Niskanen 1992, 16–18.)

4.3 Kasvatusalustat

Kasvualustat sisältävät enimmäkseen liuottimena toimivaa vettä. Vesijohtovesi ei sovellu kasvualustojen valmistukseen sisältämiensä epäpuhtauksien vuoksi, ja tästä syystä alustojen valmistuksessa käytetään joko tislattua tai ionivaihdettua vettä. Muu koostumus voidaan jakaa kiinteittäviin aineisiin, sokeriin, kasvunsäätisiin ja ravinteisiin. (Haapala & Niskanen 1992, 40.)

Kiinteyttämiseen voidaan käyttää useita erilaisia luonnollisia tai synteettisiä aineita, kuten selluloosaa, polyakryyliamidia, suodatinpaperia tai lasihelmiä, mutta yleisin käytetty aine on levästä valmistettu agar. Agarin hyytymisominaisuuteen vaikuttaa eniten pH. Liian happamissa oloissa agar ei hyydy, mutta yleisesti käytettyjen ravintoalustojen pH-alueella (pH 5–6) agarin konsentraatioksi riittää 0,6–0,8 %. Agar sisältää myös solukoiden kasvuun vaikuttavia orgaanisia ja epäorgaanisia yhdisteitä, ja tämän vuoksi kaikki agarit eivät ole soveliaita solukkoiljelyyn. (Haapala & Niskanen 1992, 40.)

Koska solukkoiljeltyjen kasvien yhteyttäminen on heikentynyt tai puuttuu kokonaan, on sokeri erittäin oleellinen osa kasvualustaa. Sokeri toimii hiilen sekä energian lähteenä ja lisäksi nesteen kulkusuuntaan vaikuttavan osmoottisen potentiaalın säätelijänä. Yleisin käytetty sokeri on sakkaroosi, joka hajoaa autoklavoitaessa osittain fruktoosiksi ja glukoosiksi. (Haapala & Niskanen 1992, 41.)

Kasvunsäätteet, kuten kasvihormonit, ovat yleensä pieninä pitoisuuksina vaikuttavia, kasvien itsensä erittämiä, kasvua ja kehitystä edistäviä yhdisteitä, mutta solukkoviljelyssä voidaan käyttää myös synteettisiä valmisteita. Solukkoviljelyssä kasvihormoneilla säädellään ennen kaikkea erilaistumisen eri osa-alueita. Kemiallisen rakenteen perusteella kasvunsäätteet voidaan jakaa ryhmiin seuraavasti:

- auksiinit, pituuskasvun ja puuvartisten kasvien paksuuskasvun edistäminen
- gibberelliinit, solujen jakautumisen, laajenemisen ja erilaistumisen säätely
- sytokiniinit, solujen jakautumisen edistäminen
- abskissihappo (ABA), kasvun hillitseminen ja lepotilan ylläpito
- muut aineet, kuten etyleeni ja urean johdannaiset, pituuskasvun säätely

(Haapala & Niskanen, 1992, 42 ; Pankakoski 1997, 117–125.)

Pääravinteet, kalium, kalsium, magnesium, rikki, fosfori ja typpi, lisätään alustaan epäorgaanisina suoloina. Vety ja happi tulevat kasvatusalustan vedestä sekä kasvatustilassa olevasta ilmasta. Hivenaineet, kuten esimerkiksi sinkki, kupari ja kloori, lisätään pääasiassa sulfaatteina tai klorideina. Tämän lisäksi alustaan lisätään vitamiineja, aminohappoja ja muita kasvin aineenvaihduntaan vaikuttavia aineita. (Haapala & Niskanen 1992, 40–41.)

Kasvin itsensä erittämiä tai käytetystä agarista vapautuvia haitallisia yhdisteitä, kuten fenoleita, voidaan torjua aktiivihieillä. Aktiivihielet vaikuttaa kuitenkin heikentävästi lisättyjen hormonien toimintaan ja saattaa näin ollen osoittautua haitalliseksi solukkoviljelylle kasvista tai lajista riippuen. (Haapala & Niskanen 1992, 43.)

4.4 Alppiruusun kasvupistelisyys

Alppiruusun viljely voidaan aloittaa vuodenajasta riippumatta ja siihen käytetään kärkisilmu sekä silmujen kunnosta riippuen 5–6 ylintä hankasilmaa. Versojen pintasterilointiin käytetään 3 % natriumhypokloriittia, jonka huuhtontaan käytetään steriloitua ionivaihdettua vettä. Viljely tapahtuu yleensä hormonittomalla MS-alustalla, mutta myös hormonoitua alustaa voidaan käyttää versoontumisen lisäämiseksi. Kasvusoluk-

ko versoo neljän kuukauden kuluessa, jonka jälkeen versot voidaan jakaa tavanomaisen solukkoviljelyn mukaisesti. (Uosukainen & Niskanen, 1984.)

Versoontumisväli on noin kaksi kuukautta, ja tämän jälkeen kasvi voidaan jakaa uudelleen tai kryosäilyttää. Juurruttaminen tapahtuu juurrutushormoni IAA:ta sisältävällä juurrutuslialustalla, jolta taimet voidaan siirtää turpeeseen noin kahden kuukauden kuluttua. Avomaalle istutettavaksi taimet ovat valmiita noin puolentoista vuoden kuluttua. (Uosukainen & Niskanen, 1984.)

5 KRYOSÄILYTYS

5.1 Kryosäilytyksen perusteet

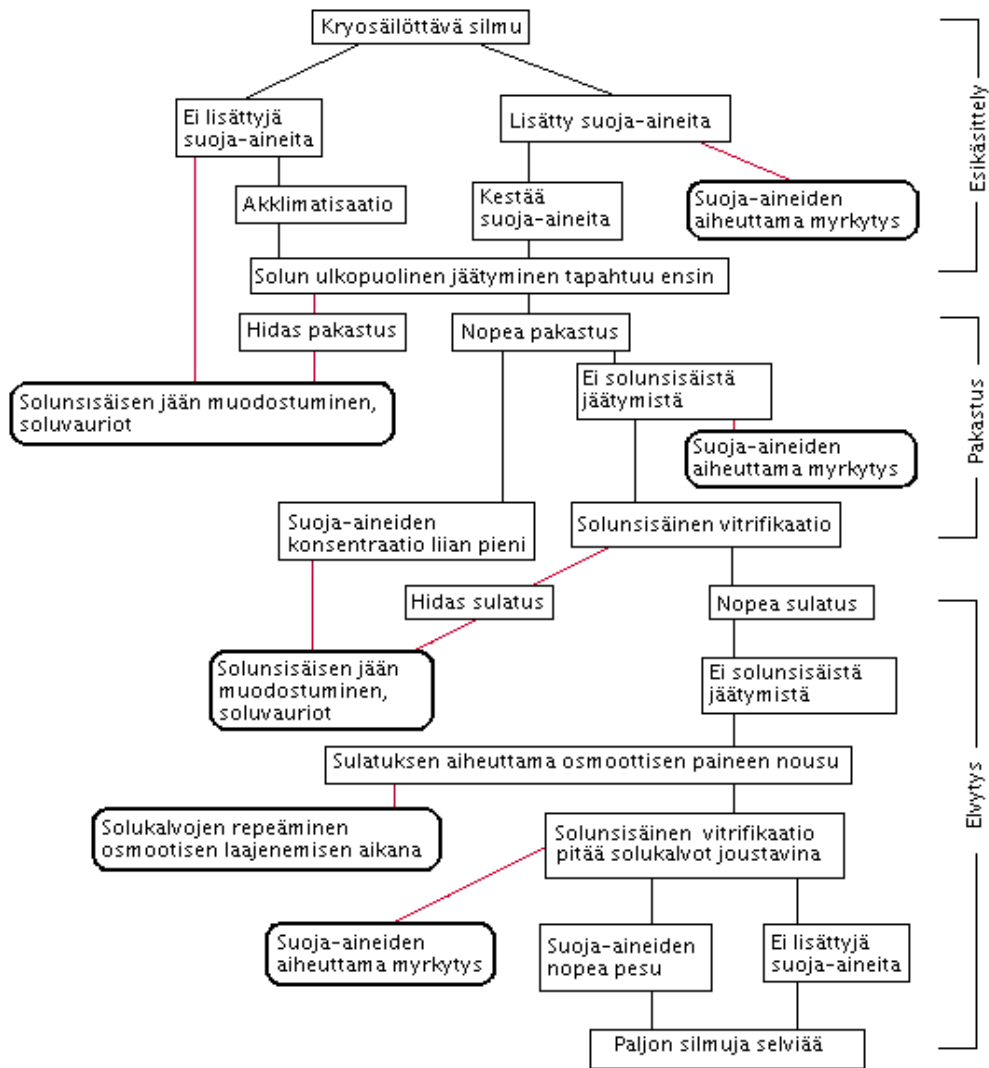
Vedellä on monia tehtäviä kasvisolussa. Se toimii liuottimena ioneille, elämälle oleellisten orgaanisten liuosten pohjana sekä substraattina reaktioille kuten fotosynteesille. Vesi myös mahdollistaa elintärkeiden reagenssien ja tuotteiden suhteellisen nopean diffuusion. Nestemäinen vesi on välttämätöntä kasvin toiminnan kannalta, sillä veden jäätyessä ominaisuudet heikkenevät huomattavasti ja tästä syystä solukoissa, joista vesi on poistettu tai suurimmaksi osaksi jäätyneenä, ei juuri ole havaittavissa elonmerkkejä. Jäljelle oleva jäätyneen vesi muodostaa konsentroituneita liuoksia, joilla on hyvin suuri viskositeetti tai vesi on sitoutuneena muihin molekyyliin. Jäädetyksessä solukossa diffuusio ja kaikki biokemialliset reaktiot tapahtuvat erittäin hitaasti tai eivät ollenkaan ja tämän seurauksena solut vaipuvat horrostilaan, josta ne virkoavat vasta rehydraation kautta. (Wolfe & Bryant 1992, 205.)

Suurin osa kasveista on luonnostaan sopeutunut lämpötilojen vaihteluun, ja tämän vuoksi alhainen lämpötila ei itsessään ole kasvisoluille haitallista, mutta jäätyminen voi aiheuttaa suoria tai epäsuoria vaurioita. Kryogeeniset lämpötilat eivät siis ole kasveille haitallisia, mutta solut voivat kuolla joko pakastus- tai sulatusvaiheessa. Jään muodostuminen solun sisään on lähes poikkeuksetta kuolettavaa. Syynä ovat laajeneemisesta aiheutuvat vauriot kuten solukalvon repeäminen. Koska kasvin eri aineenvaihduntatuotteet liukenevat heikommin jäähän, ne konsentroituvat ja muuttuvat kasville myrkyllisiksi. (Cryobiology and Anhydrobiology of cells n.d.)

Erittäin matalissa lämpötiloissa tapahtuva kryosäilytys on havaittu tehokkaimmaksi keinoksi biologisen materiaalin säilytyksessä. Useimpien biologisten aineiden vitrifikaatio- eli lasittumislämpötila on noin $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kun solujen sisäinen vesi jäädytetään riittävän nopeasti tämän lämpötilan alapuolelle, vesi ei jäädy vaan vitrifioituu, eli saavuttaa amorfisen lasimaisen tilan. Lämpötilan pysyessä vähintään $10\text{--}30$ astetta vitrifikaatiolämpötilan alapuolella, säilötyt näytteet selviävät miltei ikuisesti. Pitkäaikaisen säilymisen kannalta tavalliset pakastinlämpötilat eivät riitä, sillä useimmiten vitrifikaatiolämpötila on säilytettävän solukon nimellistä sulamispistettä alhaisempi. Nestetyppi on ihanteellinen jäähdytysaine, sillä sen lämpötila on $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja tämän vuoksi kryosäilytystankin lämpötila pysyy ihanteellisella $-150\text{...}-196\text{ }^{\circ}\text{C}$:n alueella niin neste- kuin höyryfaasissakin. (Biologisen materiaalin kryogeeninen säilytys n.d.)

5.2 Kryosäilytysmenetelmät

Kryosäilytysmenetelmien pohjana pidetään kolmea perusmenetelmää: kontrolloitu jäädytys, vitrifikaatio ja kapselointi-dehydraatiomenetelmä. Menetelmän valintaan vaikuttavat useat tekijät, kuten varastoitava kasvi ja sen ominaisuudet. Kryosäilytysprosessi voidaan jakaa menetelmästä riippumatta kolmeen päävaiheeseen (Kuvio 4), jotka ovat aineiston esikäsittely, pakastus- ja varastointivaihe sekä aineiston elvytys varastoinnin jälkeen.



KUVIO 4. Kryosäilytyksen vaiheet ja yleisimmät vauriolähteet (Cryobiology and Anhydrobiology of cells n.d., mukailtu sivuston kaavioista).

5.2.1 Kontrolloitu jäädytys

Kontrolloitu jäädytys perustuu solujen sisäisen osmoottisuuden säätelyyn sekä jäätymisellä aiheutettuun nesteen poistoon. Materiaalina käytetään yleensä *in vitro* kasvatettuja kasveja, mutta menetelmä soveltuu myös lepotilaisille silmuille. Näytteet esikäsitellään jäänestoaineilla ja jäädytetään ensin $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$... $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ asteeseen ennen upotusta nestetyypeen. Hidas jäädytys saa aikaiseksi jäänestoaineen sekä solujenvälisen tilan jäätyminen. Tämä johtaa veden siirtymiseen solusta ympäröivään jäähän ja solun sisäisten yhdisteiden väkevöitymiseen. Kuivatetun solun sisäiset rakenteet eivät jäädy vaan muuttuvat lasimaisiksi ja näin ollen ne säästyvät vaurioilta. (Reed 2008, 77–85.)

Kontrolloidussa jäädytyksessä käytetään usein ohjelmoitavaa pakastinta, jolla kryosäilytettävä materiaali viilennetään ennen upotusta nestetyypeen. Sopivan pakastusnopeuden löytäminen on menetelmän kannalta erittäin oleellista. Liian nopea pakastus johtaa vähäiseen kuivaukseen ja solunsisäisen jään muodostukseen. Liian hidaskuivaus taas aiheuttaa liiallista kuivumista ja elektrolyyttien konsentroitumista. Kontrolloitu jäädytys aloitetaan yleensä 0–4 °C ja sitä jatketaan jäänestoaineen jäätympisteeseen asti, joka on yleensä välillä -8...-10 °C. Muiden menetelmien kuten lepotilaisten silmujen pakastuksen yhdistäminen kontrolloituun jäädytykseen voi joissain tapauksissa olla hyvinkin tehokasta. Käytetty pakastusnopeus voi olla nopea kuten esimerkiksi 0,3 °C/tunti, tai hyvin hidasta kuten 5 °C/päivä. Nopeuteen vaikuttaa jokaisen asteen laskun välissä pidettävä tauko, joka voi olla jopa 12–24 tunnin pituinen tai voidaan jättää pois kokonaan. (Reed 2008, 77–85.)

5.2.2 Vitrifikaatiomenetelmä

Vitrifikaatiomenetelmä ei vaadi kontrolloitua jäädytystä, mikä poistaa tarpeen kalliseen laitteistoon. Vitrifikaatioliuoksia hyödyntävien kryosäilytysmenetelmien kehitys aloitettiin 90-luvulla ja sen jälkeen menetelmiä on käytetty menestyksellisesti useiden eri kasvien kuten wasabin (ks. Matsumoto, Sakai, & Yamada 1993), perunan (ks. Schäfer-Menuhr, Schumacher, & Mix-Wagner 1997) ja omenan (ks. Wu, Engelmann, Zhao, Zhou, & Chen, 1999) meristeemien kryosäilytyksessä. Vitrifikaatioliuoksia käyttäen solujen sisäinen vesi saadaan muuttumaan lasimaiseksi, jolloin se ei vaurioita soluja kryosäilytyksen aikana (Reed 2008, 35).

Vitrifikaatiomenetelmissä emokasvista irrotettuja meristeemejä kuivatetaan glyserolipohjaisella PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) -liuoksella huoneenlämmössä tai 0 °C:ssa ennen nopeaa jäädyttämistä nestetyypellä. Glyserolin lisäksi PVS2-liuos sisältää etyleeniglykolia sekä dimetyylisulfoksidia (DMSO), joka muuttaa soluun jääneen veden lasimaiseksi ja suojaa sitä näin jäänmuodostukselta. Kryosäilytysmenetelmän toimivuuden kannalta olennaista on optimoida PVS2-käsittelyaika niin, että liuos poistaa riittävästi vettä säilytettävistä silmuista, mutta ei myrkytä silmuja tai altista niitä liian suurelle osmoosiselle paineelle. Optimaalinen käsittelyaika on riippuvainen säilytettävästä kasvista sekä lajikkeesta. Tarvittava käsittelyaika on myös verrannollinen säilytettävän meristeemin kokoon. Pienempien kuin 0,5 mm kokoisten meristeemien

käyttö johtaa usein myrkytykseen ja yli 3 mm meristeemit vaativat huomattavasti pidempiä käsittelyaikoja. (Reed 2008, 33–45.)

Perinteisessä vitrifikaatiossa silmujen käsittely tapahtuu kokonaan kryoputkissa. Pisaravitrifikaatio on perinteisen menetelmän variaatio, jossa erona on silmujen asettaminen PVS2-käsittelyn päätteeksi folioliuskoille, joille on pipetoituna pieniä pisaroita PVS2-liuosta. Foliot puolestaan voidaan joko upottaa suoraan nestetyypeen tai sulkea kryosäilytysputkiin, jotka upotetaan nestetyypeen. (Panis, Piette & Swennen 2004, 46–47.)

Silmujen kylmänkestävyyden parantamiseksi niitä usein esikasvatetaan ennen kryoliuosten lisäystä ja pakastusta. Esikasvatuksessa käytetään kasvista riippuen hieman eri vahvuisia sokerimaljoja. Silmut imevät esikasvatuksen aikana sokeria alustasta itseensä, jolloin niiden solunesteet väkevöityvät. (Reed 2008, 33–45.)

Pelkät sokerikäsittelyt yksinään eivät usein riitä esikäsittelyksi. PVS2-liuoksen korkean DMSO-konsentraation haittavaikutuksia voidaan lieventää merkittävästi ”lataamalla” silmut juuri ennen käsittelyä. Menetelmään käytetään alun perin wasabin kryosäilytykseen (ks. Matsumoto ym. 1993) kehitettyä liuosta, joka sisältää kaksi molaarista glyserolia sekä 0,4 molaarista sakkaroosia. (Reed 2008, 33–45.)

5.2.3 Kapselointi-dehydraatio menetelmä

Kapselointi-dehydraatiomenetelmä on yhdistelmä kontrolloiduissa jäädytysmenetelmissä ja vitrifikaatiomenetelmissä käytettyjä tekniikoita. Menetelmä kehitettiin alun perin päärynän ja perunan säilytykseen, mutta sitä on käytetty menestyksekkäästi myös trooppisten kasvien kryosäilytyksessä. (Reed 2008, 59–66.)

Menetelmässä kasvimateriaali kapseloidaan aluksi kalsiumalginaattihelmien sisään jonka jälkeen helmiä esikasvatetaan erittäin sakkaroosipitoisella nestemmaisella kasvualustalla. Tällä kasvualustalla helmet osittain kuivataan ennen upottamista nestetyypeen. Kapselointi mahdollistaa kasvimateriaalin altistamisen rajuille käsittelyille kuten hyvin korkeille sakkaroosikonsentraatioille tai kuivattamiseen erittäin alhaiseen nestepitoisuuteen. Tehokkaan kuivauksen ansiosta kaikki tai suurin osa vedestä saa-

daan poistettua soluista. Tämän seurauksena silmujen sisäisten liuosten vitrifikaatio tapahtuu välittömästi niiden tullessa kosketuksiin nestetyypen kanssa. (Reed 2008, 59–66.)

Menetelmällä saadaan pidettyä kryosäilytetty kasvinosa erittäin ehjänä vielä sulatuksen jälkeenkin. Tämä johtaa korkeisiin elpymisprosentteihin, nopeaan kasvuun sulatuksen jälkeen sekä menetelmän hyvään toistettavuuteen. (Reed 2008, 59–66.)

5.3 Lepotilaisten silmujen käyttö kryosäilytyksessä

Lepotila on kasvin tapa selvitä sille epäsuotuisten vuodenaikojen kuten kylmän talven tai kuivan kesän yli. Lepotilassa kasvin elintoiminnot hidastuvat suhteessa ulkoiseen lämpötilaan. Yleisesti lepotilassa olo on osa kasvin luonnollista vuosirytmää ja sitä säätelevät kasvihormonit. (Pankkakoski 1997, 136.)

Lepotilaisten silmujen selviämiseen kryosäilytyksestä vaikuttaa hyvin vahvasti akklimatisaatio eli se, missä vaiheessa kasvin lepotila on materiaalia kerättäessä. Mitä optimaalisemmassa vaiheessa prosessi on materiaalia kerättäessä, sitä suurempi on kasvin todennäköisyys selvitä kryosäilytyksestä. Tämä tarkoittaa, ettei prosessi saa olla liian kesken tai jo purkautumassa. Luonnontilassa akklimatisaatiotaso voi vaihdella vuosittain tai jopa kasvin eri osien välillä. Akklimatisaatiotasoon vaikuttavat ympäristön olosuhteet, kuten lämpötila, valon ja ravinteiden määrä sekä kasvitaudit. Akklimatisaatioon voidaan vaikuttaa myös keinotekoisesti. (Reed 2008, 422.)

Emokasvin valintaan vaikuttaa varsinkin havupuiden kohdalla emokasvin ikä. Kasvin kehityksessä on nuoruusvaihe, jonka aikana niiden fysiologinen tila poikkeaa aikuisen kasvin elintoiminnoista. Myös kasvin kunto on solukkoviljelyyn tai kryosäilytykseen vaikuttava tekijä, sillä hyväkuntoiset ja vahvat kasviyksilöt selviävät paremmin solukkoviljelyoloissa. (Haapala & Niskanen 1992, 58–59)

Aikaisimmat tutkimukset lepotilaisten silmujen käytöstä kryosäilytyksessä ovat vuodelta 1960, jolloin osoitettiin, että poppelin ja pajun oksat kykenevät selviämään alhaisista lämpötiloista, jos niiden lämpötilaa lasketaan keinotekoisesti ennen nestetyypen upottamista. Monivuotisten ruohovartisten kasvien lepotilaiset silmut saattavat

olla käyttökelpoisia kryosäilytykseen, mutta asiaa on tutkittu vielä vähän. Lepotilais-
ten silmujen kryosäilytyksessä käytetään paljon vitrifikaatio- ja kapselointimenetel-
mistä lainattuja tekniikoita, kuten dehydraatiota. Erona on, että käytettävä silmu on
lepotilainen eikä aktiivisesti kasvava meristeemi. Metodien valintaan vaikuttavat lajin
ominaisuudet sekä kerätyn materiaalin luonnollinen kylmänkestävyys. (Reed 2008,
421–422.)

Keräyspaikasta riippuen kasvimateriaali saattaa vaatia pintasterilointia homeiden ja
muiden epäpuhtauksien poistamiseksi. Pintasterilointia on kuitenkin usein vaikeaa
suorittaa vaurioittamatta samalla ympäröivää solukkoa. Tämän vuoksi steriloinnissa
joudutaan toisinaan käyttämään ainoastaan mekaanista puhdistusta. Yleisimmät pinta-
sterilointiaineet ovat kalsium- ja natriumhypokloriitti. Kalsiumhypokloriitti on kas-
veille vähemmän myrkyllinen, mutta reagoi ilman hiilidioksidin kanssa ja on tämän
vuoksi epästabiilimpi yhdiste. Altistuksen hypokloriitille tulisi olla suhteellisen lyhyt
ja kaikki kloriitti tulisi huuhtoa steriloidulta pinnalta perusteellisesti, sillä se vaikeut-
taa aminohappojen imeytymistä ja kasvin aineenvaihduntaa. (Bonga & Durzan 1982,
22–23.)

Hyvä aloitusaika solukkoviljelyn kannalta on aikainen kevät kun kasvit juuri heräile-
vät horroksesta, mutta eivät vielä ole puhjenneet lehteen. Keväisin tosin pakkasen
saattaa vahingoittaa silmuja, jos ne ovat jo avautuneet. Kryosäilytykseen oksat tai
muut kasvin osat kerätään yleensä keskitalvella, sillä useimpien puuvartisten kasvien
oksia tai leikattuja silmuja voidaan käyttää suoraan kryosäilytykseen niiden ollessa
horrostilassa. Silmuja voidaan myös kuivata osittain tai kokonaan ennen jatkokäsitte-
lyä, mutta kaikkien menetelmien kohdalla tämä ei ole välttämätöntä. Myös käsittelyt
jäänestoaineilla ennen pakastusta ovat tarvittaessa mahdollisia. (Haapala & Niskanen
1992, 59; Reed 2008, 422.)

Säilytyksestä palautettaessa silmut sulatetaan ja käytetyistä menetelmistä riippuen
rehydroidaan. Kuivatut oksat tai silmut sulatetaan yleensä hitaasti huoneenlämmössä
tai noin 4 °C:ssa, mutta silmut voidaan sulattaa myös nopeasti vesihauteessa solun-
sisäisen jään muodostumisen ehkäisemiseksi. Varsinaiseen regenerointiin voidaan
käyttää esimerkiksi *in vitro* -viljelmää, jos kontaminaatiot kyetään pitämään kurissa ja
käytettävissä on sopiva regeneraatioalusta. (Reed 2008, 422–423.)

6 KOEASETELMA

6.1 Opinnäytetyön tausta

Opinnäytetyön perimmäisenä tarkoituksena oli vertailla kahta eri kryosäilytysmetodia: *in vitro* -aineiston pakastusta modifioidulla pisaravitrifikaatiomenetelmällä sekä ulkoa kerättyjen lepotilaisten silmujen pakastamista suoraan nestetyypeen. Kumpaankaan menetelmään ei ollut käytössä valmista protokollaa, joten pohjana käytettiin vitrifikaation suhteen vadelmalle kehitettyä menetelmää ja lepotilaisten silmujen pakastuksessa kokeiltiin aiemmin vähän käytettyä menetelmää, joka osittain pohjautui herukalle tarkoitettuun kaksivaihepakastusmenetelmään. Vertailtavien menetelmien valintaan vaikuttivat etenkin käytössä ollut kasvimateriaali sekä käytännön mahdollisuudet eri menetelmiin perustuvien kokeiden toteuttamiseen.

Modifioitua pisaravitrifikaatiomenetelmää on Laukaan kryopankissa käytetty menestyksekkäästi jo esimerkiksi mansikan ja vadelman meristeemien säilytykseen. Vitrifikaatiomenetelmän monimutkaisuuden vuoksi kryosäilytykseen pyrittiin kuitenkin löytämään vaihtoehtoinen menetelmä, joka olisi yhtä tehokas mutta toteutukseltaan yksinkertaisempi.

Lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmän lähtökohtana pidettiin kasvin luonnollista akklimatisaatiota. Aineisto kerättiin aikana, jolloin silmut olivat vielä syvässä lepotilassa ja näin ollen pakkasenkestävyydeltään optimaalisessa tilassa. Valmiiksi lepotilassa olevat silmut pyrittiin kryosäilöämään suoraan nestetyypeen niin, että lepotila ei ehdi välissä purkautua.

6.2 Opinnäytetyön muuttujat

Kaikkia muuttujia vertailtiin eloonjääneiden sekä versoneiden silmujen lukumääriä tarkastelemalla sekä kasvien silmämääräistä kuntoa arvioiden.

In vitro -aineistolla valitut tutkimuskohteet olivat

- käytetyn kasvimateriaalin iän vaikutus
- hankasilmujen käyttö kärkisilmujen rinnalla
- aktiivihiilen tarpeellisuus esikasvatuksessa
- esikasvatusajan tärkeys silmujen selviämisen kannalta
- optimaalinen PVS2-käsittelyaika
- lajikkeiden väliset erot

Lepotilaisen aineiston tutkimuskohteet olivat

- helmi- ja huhtikuussa kerättyjen silmujen ero
- kloriitin käytön merkitys esipuhdistuksessa
- hanka- ja kärkisilmujen erot sekä hankasilmujen kohdalla silmun sijainnin merkitys elpymiseen ja versoontumiseen
- lajikkeiden väliset erot ja niiden vaikutus kryokestävyYTEEN

7 KOEJÄRJESTELYT

7.1 Kokeissa käytetyt kasvatusalustat

Opinnäytetyön eri työvaiheissa käytettiin yhteensä seitsemää eri koostumuksen omaavaa kasvatusalustaa, joiden erityisominaisuudet on esitetty taulukossa 1 ja koostumukset liitteessä 1. Regeneroitumis- ja versoontumisalusta oli molemmissa menetelmissä sama ja tämän lisäksi vitrifikaatiomenetelmässä käytettiin kahta esikasvatusalustaa ja kolmea sokerikonsentraatioiltaan erivahvuista esikäsittelyalustaa. Versoontumisalusta valettiin Erlenmayer-pulloihin ja regeneroitumisalusta petrialjoille ja koeputkiin eri menetelmiä varten. Kaikki esikasvatusalustat ja sokerialustat valettiin petrialjoille.

TAULUKKO 1. Opinnäytetyössä käytetyt kasvatusalustat ja niiden erityisominaisuudet.

Alusta	Ominaisuudet
regeneraatioalusta	alppiruusun mikrolisäyksessä käytetty alusta
versoontumisalusta	versoontumista edistävä alusta, johon lisätty voimakkaampia hormoneja
1. esikasvatusalusta	aktiivihieiltä sisältävä alusta
2. esikasvatusalusta	aktiivihieletön ja hormooniton alusta
1. sokerialusta	esikäsittelyalusta, jonka sokeripitoisuus 0,25M
2. sokerialusta	esikäsittelyalusta, jonka sokeripitoisuus 0,50M
3. sokerialusta	esikäsittelyalusta, jonka sokeripitoisuus 0,75M

7.2 Vitrifikaatio

7.2.1 Silmujen otto ja aineiston esikäsittely

Alppiruusun pitkä kasvuaika solukkoviljelyssä salli muutamia viikkoja liikkumavaraa käytettyjen emokasvien (ks. kuvio 5) iässä ilman, että kasvien koko juurikaan muuttui. Tämä mahdollisti kaiken kryosäilytykseen menneen materiaalin yhdenaikaisen mikrolisäämisen ja johti koe-erissä käytettyjen emokasvien iän vaihteluun välillä 7–10 viikkoa. Emokasveja kasvatettiin alppiruusulle normaaleissa kasvatusoloissa 21 ± 2 °C, päivänpituuden ollessa 14 tuntia.



KUVIO 5. Kaksi mikropistokasta kustakin käytetystä lajista järjestyksessä 'St Michel', 'Eino' ja 'Elviira'.

Silmujenotto suoritettiin stereomikroskoopin alla pinsettejä ja kirurginveistä apuna käyttäen. Meristeemisolukkoa sisältävän silmun (ks. kuvio 6) ympäröivät lehdenaiheet poistettiin mahdollisimman hyvin, minkä jälkeen meristeemi irrotettiin versosta terävin viilloin ja siirrettiin veitsen kärjellä esikasvatusmaljalle. Hankasilmujen hyvin pienen koon vuoksi niiden kohdalla silmun mukaan otettiin myös pala verson vartta. Silmujen koko vaihteli 0,25–2,0 millimetrin välillä lajikkeesta riippuen. Koko koesarjassa käsiteltiin 869 silmua, joista 133 oli hankasilmuja ja loput 736 kärkisilmuja. Hankasilmujen käyttö kokeissa lopetettiin neljännen kokeen jälkeen ja niitä otettiin ainoastaan lajikkeista 'Elviira' ja 'Eino'.



KUVIO 6. Kärkisilmun leikkauskohta mikropistokkaasta.

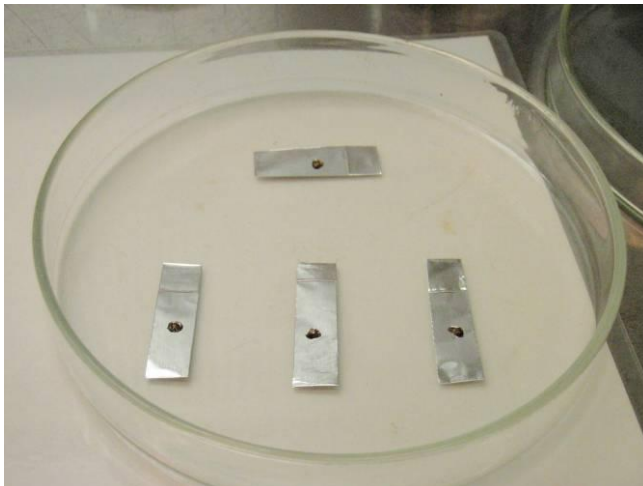
Silmujen esikasvatus kesti kolme vuorokautta ja siihen käytettiin kokeissa kahta erilaista esikasvatusalustaa (+AC ja -AC), joiden oleellisin ero oli toiseen alustaan lisätty aktiivihiihi. Esikasvatuksen tarkoituksena on antaa silmuille aikaa irrotuksessa syntyvän leikkauspinnan korjaamiseen. Esikasvatusmaljalta silmut siirrettiin vuorokaudeksi ensimmäiselle sokerimaljalle, jonka sokerikonsentraatio oli 0,25 M. Sokerikäsitteilyä jatkettiin siirtämällä silmut 0,50 M ja 0,75 M maljoille kullakin vuorokauden ajaksi.

Silmujenotot suoritettiin pääasiallisesti perjantaisin, mutta esikäsitteilyn merkityksen määrittämiseksi kullakin lajikkeella tehtiin yksi silmujenotto myös ilman esikasvatus- ta. Näissä kokeissa silmut otettiin maanantaina ja siirrettiin suoraan ensimmäiselle sokerimaljalle.

7.2.2 Vitrifikaatioprosessi

Kaikki vitrifikaatioprosessin työvaiheet suoritettiin huoneenlämmössä. Silmuja käsiteltiin aluksi 30 minuutin ajan LS-liuoksella siirtämällä silmut 0,75 M esikäsitteilymaljalta liuosta sisältäneelle petrimaljalle. Latauskäsittelyn jälkeen silmut siirrettiin pinsettejä käyttäen suoraan PVS2-liuokseen. Vitrifikaatioliuosten välissä ei perusmenetelmästä poiketen käytetty imupaperia etenkin hankasilmuten hyvin pienen koon vuoksi. PVS2-käsittelyajat olivat eri kokeissa 20, 30, 40, 45 tai 60 minuuttia. 60 ja 45 minuutin käsittelyaika käytettiin ainoastaan lajikkeilla 'Elviira' ja 'Eino' ja muita käsittelyaikoja kaikilla lajikkeilla.

PVS2-käsittelyn jälkeen silmut siirrettiin silmu kerrallaan foliosuikaleille (kuvio 7). Toisin kuin perinteisessä pisaravitrifikaatiomenetelmässä folioille ei pipetoitu PVS2-pisaroita, vaan silmut siirrettiin folioille suoraan ja PVS2-liuosta siirtyi riittävä määrä niiden mukana. Foliopalat suljettiin kryosäilytysputkiin, jotka upotettiin välittömästi nestetyypeen. Pakastettujen kokeiden (+LN) lisäksi kaikille kokeille tehtiin myös kontrollikokeet (-LN), joita ei upotettu nestetyypeen eikä sulatettu vesihautteessa, mutta jotka kävivät läpi kaikki muut kryosäilytyksen työvaiheet ja liuokset.



KUVIO 7. Foliosuikaleille siirretyt silmut.

7.2.3 Vitrifoitujen silmujen elvytys ja havainnointi

Vitrifoidut silmut sulatettiin viikon kuluttua pakastuksesta. Jokainen kryosäilytysputki sulatettiin upottamalla ne yksitellen 40 °C vesihauteeseen kolmen minuutin ajaksi. Sulatuksen jälkeen kryosäilytysputkeen pipetoitiin 1 molaarista sakkaroosiliuosta. Sakkaroosiliuoksen tarkoituksena oli laimentaa sulatetussa putkessa uudelleen aktivoituva PVS2-liuos vaarattomaksi. Sakkaroosiliuoksen annettiin vaikuttaa 30 minuuttia pimeässä, jonka jälkeen kryosäilytysputken sisältö kaadettiin petrimaljalle. Sulatetut silmut poimittiin maljalta pinseteillä kasvatusmaljalle. Maljoja säilytettiin aluksi viisi päivää foliolla peitettynä ja tämän jälkeen vielä kaksi päivää harsolla peitettynä ennen solukkoviljelyolosuhteisiin siirtoa kasvatushuoneessa, jonka lämpötila oli 22 ±2 °C ja päivän pituus 16 h.

Silmuja tarkkailtiin ensimmäisen neljän viikon ajan viikoittain ja siitä eteenpäin kahden viikon välein. Kaikki aineisto siirrettiin neljän viikon välein uusille kasvualustoille ja samalla versoontuneet silmut siirrettiin versoontumisalustalle Erlenmayer-pulloihin. Versoontumisalustalle siirrettyjä silmuja seurattiin neljän viikon välein 2–3:n kuukauden ajan. Kasvatusmaljoilta tarkkailtiin silmujen kuntoa kunnes varmistuttiin, ettei silmuilla enää ollut mahdollisuuksia versoontumiseen. Tarkkailuaika vaihteli kokeiden välillä laajasti välillä 6–40 viikkoa. Maljoilla olevasta aineistosta laskettiin joka havainnointikerralla elpyneet sekä versovat silmut. Elpyneiksi silmuiksi laskettiin kaikki silmut, joissa mikroskoopin alla havaittiin elossa olevaa vihertävää solukkoa tai lehtiä. Versoontuneita silmuja arvioitiin koon ja pintapuolisen kunnan mukaan nelitasoisella asteikolla, joka on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Versoontuneiden silmujen luokat ja määritelmät.

Luokka	Määritelmä
I	Mikrolisäykseen käytettävissä oleva verso
II	Hyväkuntoinen, mutta jatkokasvatusta vaativa verso
III	Elävä verso, joka kuitenkin liian heikko mikrolisäykseen
IV	Kunnoltaan heikentynyt tai kuollut verso

Aikataulullisista syistä versoontuneiden silmujen havainnointiaikaa jouduttiin leikkaamaan koesarjan loppupuolella kolmesta kuukaudesta kahteen. Koesarjan alkupään tuloksista ilmeni, että versoista vain 10 %:ssa tapahtui laadullisia muutoksia viimeisen kuukauden aikana ja tästä syystä havainnointiajan lyhentäminen oli perusteltua. Suurimmassa osassa versoontuneita silmuja koskevissa tuloksissa on käytetty kahden kuukauden kasvatuksen jälkeen tehtyjä havainnointeja, mutta myös kolmannen havainnointikerran tuloksia hyödynnettiin esimerkiksi menetelmäsuositusta laadittaessa.

7.3 Lepotilaisten silmujen pakastus

7.3.1 Silmujen keruu ja pakastus

Lepotilaiset silmut kerättiin kahdessa erässä helmi- sekä huhtikuussa. Jälkimmäisellä keräyskerralla päivänpituus oli jo huomattavasti pidempi sekä vuorokauden keskilämpötila oli noussut huomattavasti, noin kymmenen astetta. Valitut pensaat kaivettiin esiin lumen alta ja niistä leikattiin kustakin 30 kpl noin 5–10 cm pituisia oksankappaleita. Kerätyt oksat siirrettiin välittömästi pakastimeen, jonka lämpötila säädettiin mahdollisimman tarkasti silloista ulkolämpötilaa vastaavaksi.

Kuviossa 8 näkyvien epäpuhtauksien vuoksi kaikille oksille suoritettiin ennen pakastusta pintasterilointi, jossa oksista poistettiin lehdet ja niiden pinta puhdistettiin mekaanisesti. Työvaihe suoritettiin lepotilan säilyttämiseksi heti keräyspäivänä ulkotilassa. Puhdistetut oksat upotettiin suoraan nestetyypeen noin 10 sekunnin ajaksi, jonka jälkeen oksat siirrettiin yksitellen 15 ml:n kryosäilytysputkiin. Putkia varastoitiin kryosäilytystankkiin kustakin lajikkeesta kolme seitsemän putken sarjaa molemmilla pakastuskerroilla. Loput puhdistamattomat oksat varastoitiin pakastimeen kontrolliloituksia varten.



KUVIO 8. Pintasteriloitu (yllä) ja -steriloimaton oksa.

7.3.2 Lepotilaisen aineiston sulatus ja havainnointi

Kontrollikokeet siirrettiin aloitusten ottoa edeltäneenä päivänä pakastimesta kylmiöön, jonka lämpötila oli pakastinta korkeampi. Näin siksi, että silmujen lepotila purkautuisi riittävän hitaasti huoneenlämpöön tuotaessa. Kylmiöstä poiston jälkeen kontrolliko- keille suoritettiin sama pintasterilointi kuin pakastetuillekin oksille. Pakastetut oksat sulatettiin kryosäilytysputkissaan nopeasti 40 °C vesihauteessa.

Sekä sulatettujen näytteiden että kontrollisilmujen pintasterilointia jatkettiin pesemällä oksia 10 minuutin ajan noin 5 % natriumhypokloriittia sisältäneellä liuksella ja huu- tomalla tämän jälkeen oksat kolmesti steriilillä vedellä 10 minuuttia kerrallaan hypo- kloriittijäämien poistamiseksi. Lopuksi oksia käsiteltiin vielä 10 minuutin ajan 70 % alkoholilla. Alkoholikäsitely tehtiin kaikille silmuille, kloriittikäsitely noin puolelle käytetyistä silmuista.

Stereomikroskooppia, kirurgin veistä ja pinsettejä käyttäen silmujen päältä poistettiin suojaavia rakenteita kunnes meristeemi saatiin näkyviin. Meristeemit irrotettiin oksis- ta ja siirrettiin yksitellen koeputkiin regeneraatioalustalle. Silmuja säilytettiin kasva- tushuoneessa harsolla peitettynä ensimmäisen viikon ajan ja tämän jälkeen alppi- ruusulle normaaleissa solukko-tiljelyoloissa. Valomäärää rajoittamalla silmujen yh- teyttämistä saatiin vähennettyä tasolle, jonka elpyvät silmut kykenivät sietämään.

Silmuja tarkkailtiin ensimmäisen neljän viikon ajan viikoittain ja siitä eteenpäin kah- den viikon välein. Kaikkia silmuja arvioitiin taulukon 3 mukaisella kahdeksantasoisel-

la asteikolla, joka kattoi niin elossa olevat kuin versovatkin silmut. Neljän viikon kasvatuksen jälkeen versovat ja lehtiä sisältäneet silmut siirrettiin versoontumisalustalle Erlenmayer-pulloihin. Koeputkissa olleita silmuja seurattiin vähintään kolmen kuukauden ajan, jonka jälkeen kokeet päätettiin elottomaksi todettujen silmujen osalta. Versoontumisalustalle siirrettyjen silmujen havainnointia jatkettiin 1–3 kuukautta alustan vaihdon jälkeen riippuen siitä tapahtuiko silmussa kehitystä. Versoontumattomia, mutta elossa olevia silmuja havainnoitiin neljän kuukauden ajan, jonka jälkeen niiden kokeet päätettiin.

TAULUKKO 3. Lepotilaisten silmujen luokat ja määritelmät.

Luokka	Määritelmä
-	Silmu ei osoita elonmerkkejä
+	Silmu on turvonnut ja siinä on havaittavissa vaalea alku
vihreä lehti	Silmu vihertää ja sisältää uuden lehden aiheen
	Silmusta kasvaa selkeästi 1–2 uutta lehteä
V3	Pieni verso, josta kasvaa useita lehtiä
V2	Keskikokoinen verso, joka ei vielä ole valmis jaettavaksi
V1	Suuri mikrolisäyksessä jaettavissa oleva verso
V4	Verson kunto on heikentynyt huomattavasti tai se on kuollut

8 TULOKSET

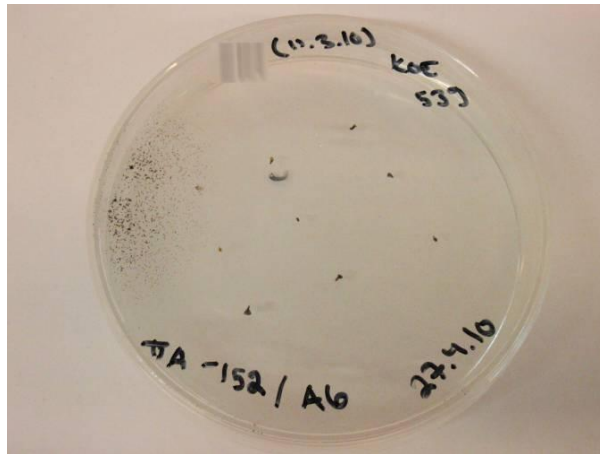
8.1 Solukkoviljelmistä eristettyjen *in vitro* -silmujen tulokset

8.1.1 Kontaminaatiot ja emokasvien iän vaikutus

Aineistossa havaittiin poikkeuksellisen paljon kontaminaatioita. Kaikkiaan 42 koeerässä kaikista 83 koe-erästä (51 %) havaittiin jonkinlainen kontaminaatio koesarjan aikana. Tämä on hyvin epänormaali tulos, sillä kontaminaatioita havaitaan yleensä vain muutamassa maljassa, jos ollenkaan. Kaikki kontaminaatiot rajoittuivat petrimaljoilla kasvaneisiin silmuihin; versoontumisalustalle siirretyissä silmuissa ei havaittu kontaminaatioita. Emokasveissa ei koesarjan aikana havaittu samanlaisia kontaminaatioita, joten kaikkien kontaminaatioiden voidaan sanoa olleen työn aikana tapahtuneita jälkikontaminaatioita.

Kontaminaatioiden laatu vaihteli yksittäisiä silmuja koskeneista bakteereista aina koko maljalle levinneisiin homeisiin. Suurin yksittäinen kontaminaatio oli 19 koe-erään levinnyt sieni-infektio, jonka lähteenä oli kontaminoitunut erä regeneraatiomaljoja. Maljojen valussa ei aikataulullisista syistä käytetty normaalia muutaman päivän varoaikaa ja tämä aiheutti laajan kontaminaation muutoinkin riskialttiissa työvaiheessa.

Bakteerien ja sienien osalta kontaminoitunutta aineistoa siirrettiin mahdollisuuksien mukaan uusille kasvualustoille ja useissa tapauksissa kokeita saatiin näin vielä jatkettua. Kokonaisia maljoja koskeneet homeet (ks. Kuvio 9) johtivat itiöiden leviämiseriskin vuoksi useiden kokeiden ennenaikaiseen päättämiseen, joka oli aineiston paikoitaisen kapeuden vuoksi ongelmallista, sillä osalle kontaminoituneesta aineistosta ei ollut vertaiskokeita.



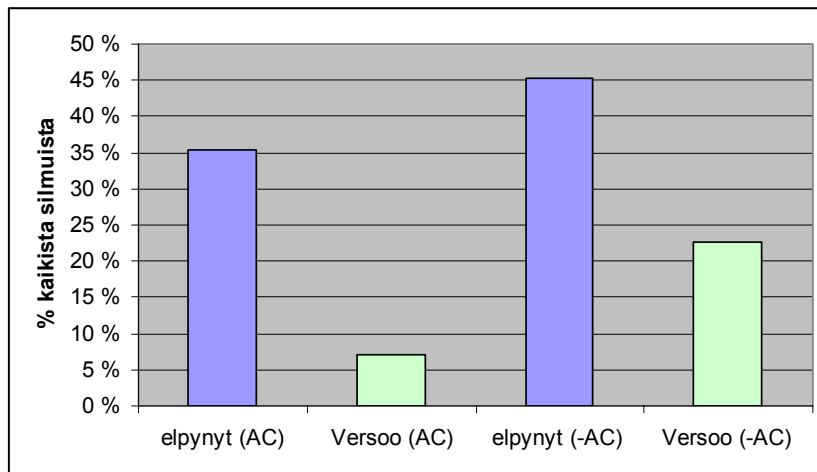
KUVIO 9. Homeen kontaminoima kasvatusmalja.

Käytettyjen emokasvien ikä vaihteli kokeissa 7–11 viikkoon. Muiden muuttujien runsaan määrän vuoksi emokasvien iän vaikutusta silmujen elpymiseen tai versoontumiseen ei pystytty määrittämään, sillä alppiruusu säilyi hyvinkin pitkiä aikoja jakamiskelpoisena samalla kasvatusalustalla ilman siirtoja.

8.1.2 Hankasilmujen ja aktiivihiihien käyttö

Hankasilmuilla tehdyt kokeet osoittautuivat heti havaintojen alkuvaiheessa tuloksiltaan huomattavasti vertaiskokeitaan huonommiksi niin lajikkeella 'Elviira' kuin 'Ei-nokin'. Koko koesarjan loputtua kokeisiin käytetyistä hankasilmuista ainoastaan yksi -LN kontrollisilmu todettiin elpyneeksi. Vertaiskokeissa elpymistä tapahtui molemmilla tutkituilla lajikkeilla, mutta versoontumista ainoastaan lajikkeella 'Eino'. PVS2-käsittelyaika kokeissa oli joko 45 tai 60 minuuttia.

Aktiivihiihikokeet tehtiin yhtäaikaaisesti hankasilmuksien kanssa, mutta niiden tuloksissa on huomioitu ainoastaan kärkisilmut. PVS2-käsittelyaika kokeissa oli 30–60 minuuttia. Kuviosta 10 on nähtävissä kokeiden yhteistulokset +LN koe-erien osalta. Lajike 'Elviira' elpyi paremmin aktiivihiihellellisellä alustalla, mutta kahden muun lajikkeen tulokset olivat parempia aktiivihiihettömällä alustalla molempien sekä elpymisen että versoontumisen osalta. 'Elviira' ei versoontunut kummallakaan alustalla.

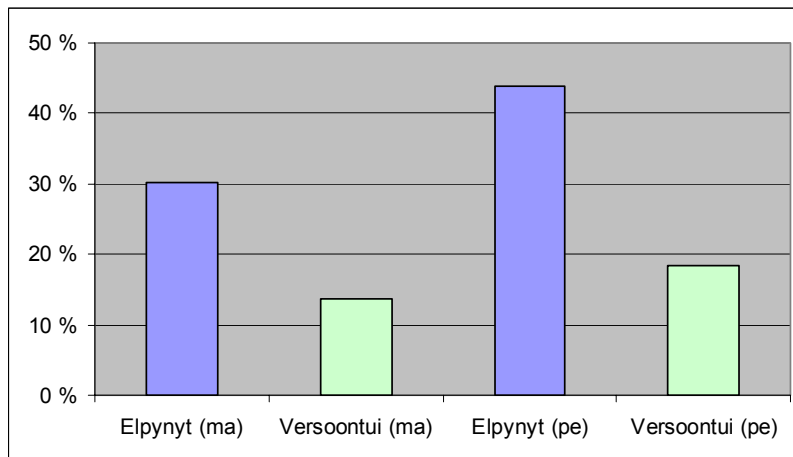


KUVIO 10. Aktiivihiihellellisten (+AC) ja aktiivihiihettömien (-AC) +LN kokeiden elpymis- ja versoontumisprosentit yhteensä lajikkeilla 'Elviira' ja 'Eino'.

8.1.3 Esikasvatuksen merkitys silmujen elpymiseen

Esikasvatettujen silmujen kokeissa käytettiin kaikkia lajikkeita ja 30 minuutin PVS2-käsittelyaika. Perjantaina otettujen esikasvatettujen silmujen sekä maanantaina otet-

tujen silmujen +LN kokeiden väliset erot ilmenevät kuviosta 11. Tulokset olivat samansuuntaiset sekä +LN että -LN kokeissa. Lajikkeen 'St Michel' tulokset olivat lähes samat maanantaina ja perjantaina otettujen silmujen osalta. Selkeästi heikoiten ilman esikasvatusta pärjäsi 'Elviira', jonka maanantaina otetuissa +LN kokeissa kuolleisuus oli 100 %.

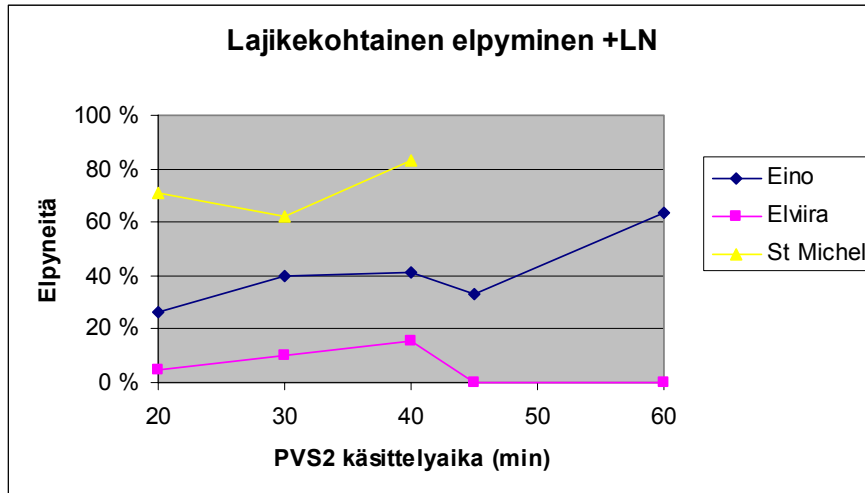


KUVIO 11. Kaikkien lajien +LN kokeiden yhteenlasketut silmujen elpymis- ja versoontumisprosentit maanantaina ja perjantaina otetuissa erissä.

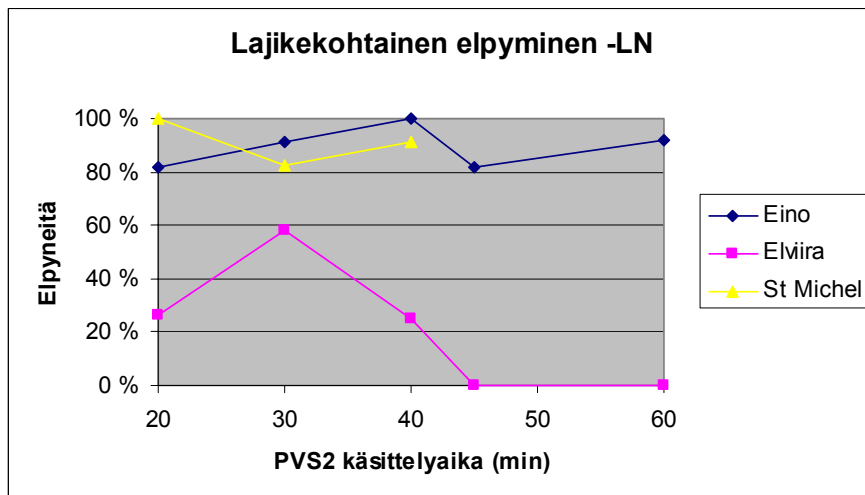
8.1.4 Optimaalinen PVS2-käsittelyaika

PVS2-kokeiden tulokset (ks. kuviot 12–15) perustuvat esikasvatettujen perjantaina aktiivihielettömälle (-AC) maljalle otettujen kärkisilmujen tuloksiin. -LN ja +LN kokeiden tulokset olivat kaikissa tapauksissa saman suuntaisia. Koesarja aloitettiin 60 ja 45 minuutin käsittelyä käyttäen ja niistä saatujen tulosten nojalla kyseisiä käsittelyaikoja ei enää käytetty lajikkeella 'St Michel'. Tämän sijaan lajikkeen 'St Michel' 30 ja 40 minuutin koe-erien lukumäärä oli kaksinkertainen muihin lajikkeisiin nähden.

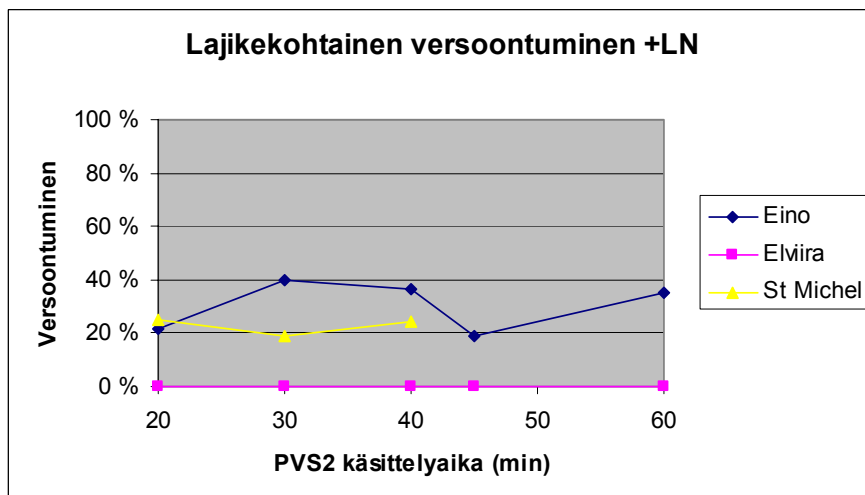
Elpyminen oli korkeimmillaan 40 minuutin käsittelyaikaa käytettäessä. Lajikkeella 'Elviira' versoontumista tapahtui ainoastaan 30 minuutin -LN käsittelyssä; muilla kahdella lajikkeella versoontumista tapahtui kaikissa käsittelyissä. 'St Michel' versoontui parhaiten 40 minuutin ja 'Eino' 30 minuutin käsittelyajalla. Silmujen laatu oli parhaimmillaan 40 minuutin käsittelyajalla. Yhtenäisyys -LN ja +LN kokeiden välillä on nähtävissä selkeästi niin elpyneiden kuin versoneidenkin silmujen osalta.



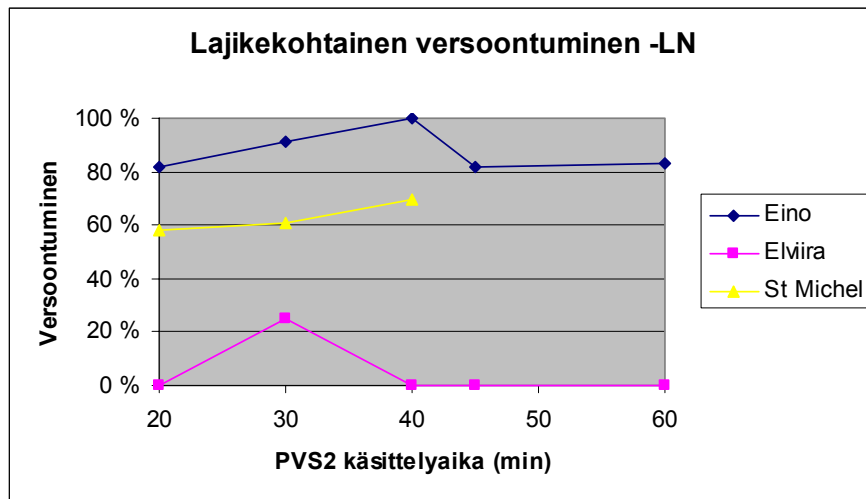
KUVIO 12. PVS2-käsittelyn vaikutus elpymiseen (+LN).



KUVIO 13. PVS2-käsittelyn vaikutus elpymiseen (-LN).



KUVIO 14. PVS2-käsittelyn vaikutus versoontumiseen (+LN).

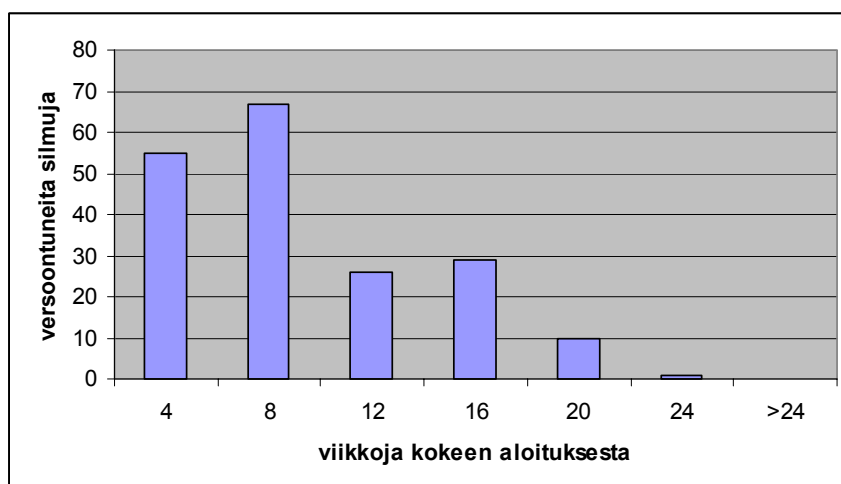


KUVIO 15. PVS2-käsittelyn vaikutus versoontumiseen (-LN).

8.1.5 Aineiston jakautuminen ja luokittelu

Kuviossa 16 on esitetty -LN ja +LN kokeiden kaikkien versoontuneiden silmujen yhteenlasketut määrät viikoittain kokeiden aloituksesta. Vaikka havainnointia jatkettiin yli 24 viikon ajan, ei versoontumista enää tapahtunut. Lajikkeella 'Eino' versoontumista tapahtui melko tasaisesti, mutta lajikkeella 'St Michel' versoontuminen tapahtui yleensä ensimmäisten 8 viikon kuluessa tai ei laisinkaan. 'Elviiran' versoontuminen oli niin vähäistä, vain kolme -LN versoa, ettei siitä pystytty löytämään selkeää viikoittaista suuntausta. Versoontuneet silmut jakautuivat eri luokkiin melko tasaisesti.

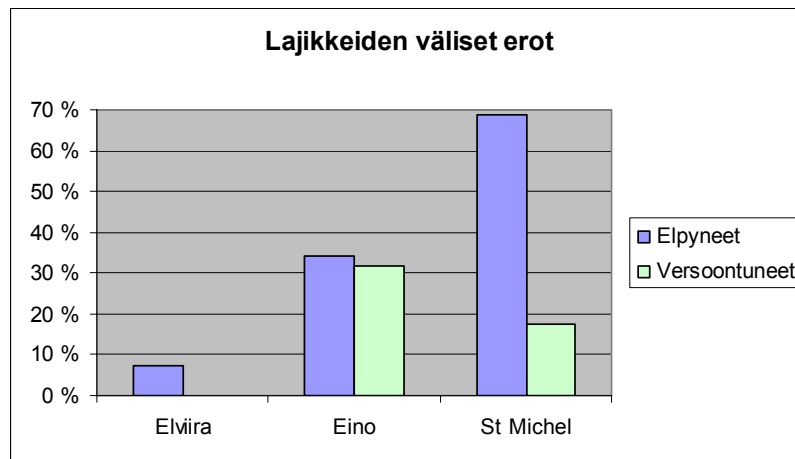
Luokkia I ja II oli kumpaakin 30 % aineistosta, luokkaa III 39 % ja luokkaa IV 1 %.



KUVIO 16. Versoontuneiden +LN ja -LN kokeiden yhteenlasketujen silmujen jakautuminen viikoittain.

Lajikkeiden väliset erot pakastuksen jälkeen on esitettyä kuviossa 17. Tuloksissa ei ole otettu huomioon lajikkeilla 'Elviira' ja 'Eino' tehtyjä koe-eriä joissa PVS2- käsittelyaika oli 45 ja 60 minuuttia. Näin siksi, että kyseisiä kokeita ei tehty laisinkaan 'St Michel' lajikkeella. Samaisissa kokeissa käytettiin myös osittain hankasilmuja, joita ei 'St Michelin' osalta käytetty missään kokeessa.

Koska lajikkeella 'St Michel' ei käytetty ollenkaan 45 ja 60 minuutin PVS2- käsittelyjä, niiden sijaan tehtiin ylimääräiset kokeet 30 ja 40 minuutin käsittelyajoilla. Kokonaisuudessaan lajikkeista 'Elviira' ja 'Eino' oli kummastakin aineistoa 28 koe-erää ja 'St Michelistä' 27 koe-erää. Lajikkeiden väliset tulokset perustuvat 'Elviiran' ja 'Einon' osalta kahdeksaan koe-erään ja 'St Michelin' osalta 14:sta koe-erään.



KUVIO 17. Vitrifioitujen +LN silmujen lajikkeiden väliset erot.

8.2 Ulkoa kerättyjen lepotilaisten silmujen tulokset

8.2.1 Pakkasvauriot

Vaikka oksat molemmilla keräyskerroilla näyttivätkin ulkoisesti käyttökelpoisilta, ilmenivät niiden pakkasvauriot hyvin nopeasti jo havainnoinnin alkuvaiheessa. Vauriot ilmenivät silmujen eristysvaiheessa silmännähtävänä kellastumisena sekä myöhemmässä vaiheessa kontrollikokeiden heikoista tuloksista. Lajikkeen 'Elviira' osalta pensaat, joista aiemmat oksat oli kerätty, havaittiin kuolleiksi toisen silmujen keräyksen kohdalla. Vauriot olivat mittavimmat lajikkeilla 'Elviira' ja 'St Michel'. Lajik-

keella 'Eino' vaurioita havaittiin ainoastaan jälkimmäisessä erässä. Laajamittaisuutensa vuoksi pakkasvauriot tulee ottaa huomioon heikentävänä tekijänä kaikissa tuloksissa.

8.2.2 Kontaminaatiot ja kloriitin vaikutus

Kontaminaatioita havaittiin alle prosentissa silmuja, jota voidaan pitää hyvin alhaisena menetelmässä käytetyn materiaalin luonteen ja työmenetelmät huomioon ottaen. Aineiston käsittely steriilisti kryoputkissa esti esimerkiksi epästeriilistä vesihauteesta aiheutuneet kontaminaatiot. Löydetyt bakteerit ja homeet olivat nähtävästi silmujen eristyksessä tapahtuneiden jälkikontaminaatioiden tulosta ja niitä esiintyi sekä kloriittikäsittelyissä että käsittelemättömissä silmuissa. Kloriittikäsittelyllä ei havaittu olevan negatiivisia vaikutuksia silmujen selviämiseen lajikkeiden 'Elviira' ja 'St Michel' kohdalla, kun taas lajikkeen 'Eino' silmut selvisivät jopa hieman paremmin kloriittikäsittelyn jälkeen.

8.2.3 Silmujen sijainnin merkitys

Sulatetuista oksista eristettiin kaiken kaikkiaan 362 kpl silmuja, jotka jakaantuivat tasaisesti kaikkien kolmen lajikkeen välille. Kontrolliaineisto oli kattavuudeltaan 141 silmua. Noin kolmannes aineistosta oli kärkisilmuja ja loput hankasilmuja. Silmujen lukumäärät ja jakautuminen sijainnin suhteen on esitettyinä taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Silmujen lukumäärät ja sijainti kärkisilmusta laskettuna.

Sijainti	Kontrollialoituksia	Pakastettuja silmuja
kärkisilmu	38	112
1.	27	72
2.	15	54
3.	17	49
4.	15	34
5.	11	25
6.	9	11
7.	4	5
>7.	5	0
yht.	141	362

Potentiaalisten silmujen lukumäärä oksaa kohden vaihteli 1–13. Näistä läheskään kaikki eivät kuitenkaan olleet käyttökelpoisia viljelyn kannalta. Mitä kauemmas kärkisilmusta siirryttiin, sitä pienemmiksi silmut yleensä muuttuivat ja samalla niiden onnistunut irrottaminen ja siirtäminen regeneraatioalustalle hankaloituivat. Tämän ja silmujen vaihtelevan kunnon vuoksi aineisto painottui kärkisilmuihin sekä sitä lähimpänä olleisiin 2–3 hankasilmuun.

Taulukosta 5 on nähtävissä, että kärkisilmun ja sitä seuraavien kolmen ensimmäisen hankasilmun elpymis- ja versoontumisprosentit olivat korkeimmat. Sijaintikohtaiset tulokset eivät kuitenkaan ole lineaarisia, ja elpymisen kannalta merkittävämpää oli silmun koko kuin sijainti. Pieni koko vaikeutti myös silmujen siirtoa Erlenmayer-pulloihin vahingoittamatta silmuja samalla. Erittäin nopeaa tummumista havaittiin useissa silmuissa, varsinkin pienemmissä hankasilmuissa sekä jälkimmäisellä kerralla kerätyissä silmuissa.

TAULUKKO 5. Koko aineiston elpymis- ja versoontumisprosentit kärkisilmusta laskettuna.

Sijainti	Kontrollikokeet		Pakastetut silmut	
	elpyneitä	versoo	elpyneitä	versoo
Kärkisilmu	76 %	34 %	15 %	7 %
1.	41 %	26 %	14 %	8 %
2.	47 %	33 %	17 %	9 %
3.	18 %	12 %	4 %	4 %
4.	33 %	7 %	3 %	0 %
5.	9 %	9 %	4 %	0 %
6.	22 %	11 %	9 %	9 %
7.	50 %	25 %	20 %	0 %
>7.	0 %	0 %	0 %	0 %
yht.	43 %	22 %	12 %	6 %

8.2.4 Lajikkeiden ja keräyserien väliset erot

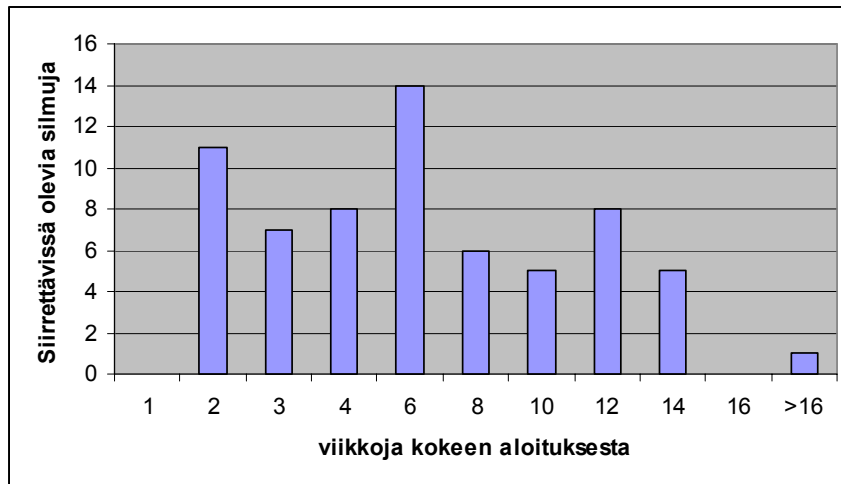
Lajikkeiden väliset erot elpymis- sekä versoontumisprosentteissa on esitetty taulukossa 6. Mukaan ei ole laskettu kontrollikokeita. Lajikkeen 'Elviira' kohdalla yksikään kryosäilytetty silmu ei selvinnyt. 'St Michel' lajikkeen muutamit yksilöt pysyivät elossa, mutta yksikään ei versoontunut. 'Eino' ensimmäisen helmikuussa kerätyn erän tulokset olivat kokeen parhaat, sillä sen silmut olivat ainoat kokeessa kontrollikokeiden ulkopuolella versoneet. Toisesta huhtikuussa kerätystä erästä ei selvinnyt silmuja kontrollikokeiden ulkopuolella.

TAULUKKO 6. Pakastettujen silmujen lajikekohtaiset elpymis- ja versoontumisprosentit.

Lajike	Erä	Silmuja	Elpyneitä	Versoo
Elviira	erä 1	78	0 %	0 %
	erä 2	58	0 %	0 %
	yht.	136	0 %	0 %
St Michel	erä 1	52	29 %	0 %
	erä 2	60	0 %	0 %
	yht.	112	13 %	0 %
Eino	erä 1	65	43 %	32 %
	erä 2	54	0 %	0 %
	yht.	119	24 %	18 %
Kaikki	erä 1	195	22 %	11 %
	erä 2	172	0 %	0 %
	yht.	367	12 %	6 %

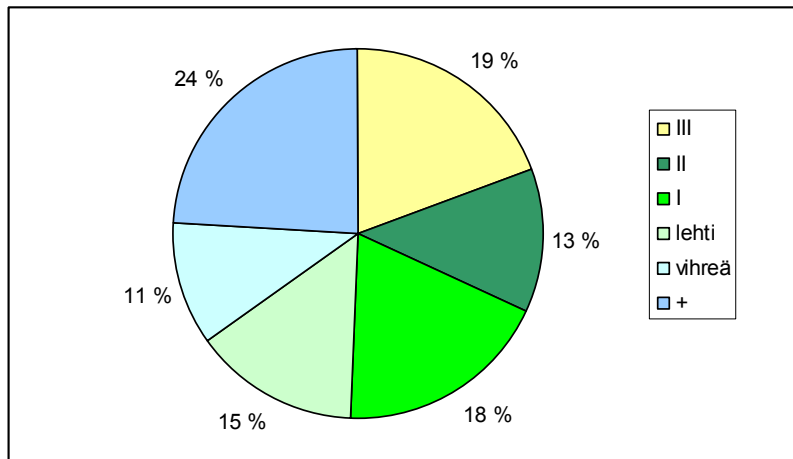
8.2.5 Lepotilaisten silmujen aineiston jakautuminen ja luokittelu

Siirrettävissä olevien lepotilaisten silmujen jakautuminen viikoittain on esitettyä kuviossa 18. Mukaan on laskettu myös kontrollikokeiden silmut. Tuloksista on selvästi havaittavissa, että useat silmut olivat valmiita siirtoon jo ennen 4. viikkoa, jolloin siirtoja aikaisintaan tehtiin.



KUVIO 18. ”Lehti”-luokkaa tai sitä parempien lepotilaisten silmujen jakautuminen viikoittain koko aineistossa.

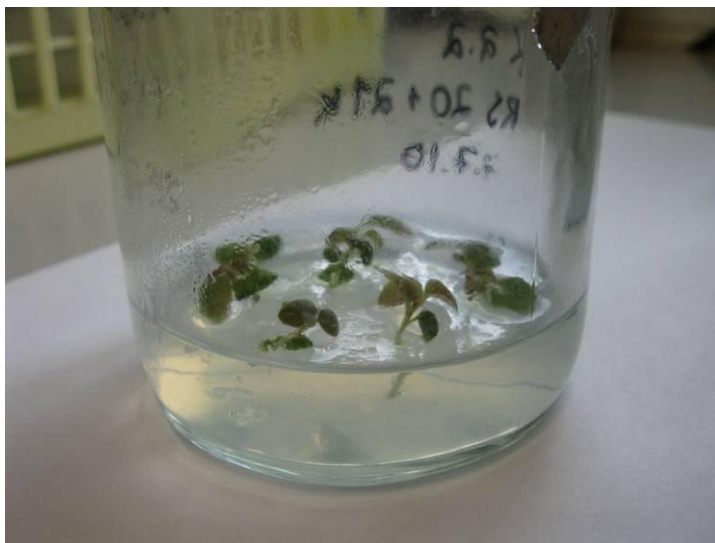
Kuviossa 19 on nähtävissä kaikkien elpyneiden lepotilaisten silmujen luokkakohtainen jakautuminen viikoittain. 65 % kaikesta elpyneestä aineistosta oli jossakin vaiheessa koesarjaa siirrettävissä versoontumisalustalle. Hieman vajaata kolmannesta versoontuneesta aineistosta olisi voitu käyttää uusien solukkoviljelmien aloittamiseen.



KUVIO 19. Koko aineiston elyneiden lepotilaisten silmujen jakautuminen luokittain.

8.3 Kryosäilytysketjun toimivuus

Kryosäilytysmenetelmän toimivuuden kannalta on oleellista, että poikkeavissa solukoviljelyoloissa kasvatetut versot pystytään siirtämään myös takaisin normaaliin mikrolisäykseen. Tämän todentamiseksi versoontuneella aineistolla tehtiin yksittäinen koe, jossa lajikkeen 'Eino' kontrollikokeen versoontuneita I-luokan silmuja mikrolisättiin alppiruusun tavalliseen kasvuympäristöön regeneraatioalustalle kasvatuspurkkeihin. Saadut tulokset osoittivat kryosäilytysketjun toimivuuden, sillä kuvion 20 lisätty aineisto tuotti yhden kuukauden aikana täysin normaalin mikroviljelmän. (ks. kuvio 21).



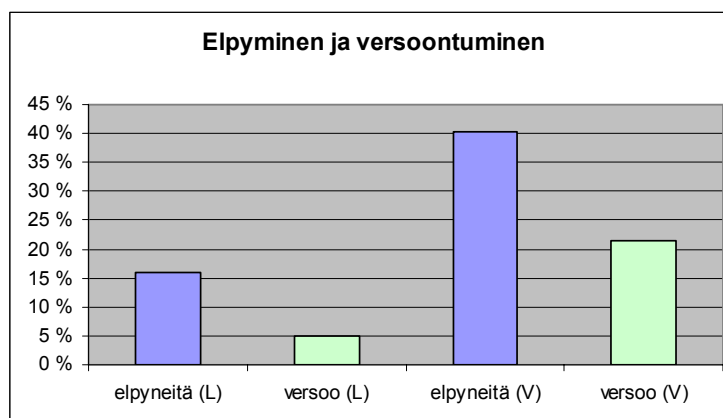
KUVIO 20. Versoontumisalustalta juuri mikrolisätty 'Eino'-aineisto.



KUVIO 21. Mikrolisätty 'Eino' aineisto kuukauden kasvatuksen jälkeen.

8.4 Menetelmien väliset erot

Kuviossa 22 on esitettyä eri menetelmien väliset erot elpymisen ja versoontumisen osalta pakastuksen jälkeen. Suuria eroja selittävät etenkin lajikekohtaiset tulokset sekä lepotilaisten silmujen toisen erän heikko menestymisen. Lajikkeen 'Elviira' kaikki kryosäilytetyt lepotilaiset silmut kuolivat.. Tämän lisäksi lepotilaisten silmujen pakas- tusmenetelmällä ei ensimmäisen erän osalta saatu versomaan muita lajikkeita kuin 'Eino'.



KUVIO 22. Elpyneiden ja versoontuneiden silmujen prosenttiosuudet lepotilaisten silmujen pakastuksessa (L) ja pisaravitrifikaatioissa (V).

9 TULOSTEN TARKASTELU

9.1 Kryosäilytysmenetelmien toimivuus

9.1.1 Aineiston elpyminen ja versoontuminen

Jotta kryosäilytysmenetelmää voidaan pitää toimivana, tulee sen täyttää tiettyjä kriteerejä, joista riittävä elpyminen on yksi selvimmistä. Elpyneistäkään silmuista ei kuitenkaan ole hyötyä, jos ne eivät kykene regeneroitumaan pakastuksen jälkeen. Korkeat versojen saantoprosentit mahdollistavat myös pienempien erien tallettamisen kryo-tankkiin. Tärkeäksi kysymykseksi muodostuukin millaisia elpymis- ja versoontumisprosentteja voidaan vielä pitää hyväksyttävänä, jotta kryosäilytys olisi tehokasta.

Lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmällä saadut kokonaistulokset, 12 % elpyminen ja 6 % versoontuminen, ovat selkeästi täysin riittämättömiä elpymisen ja etenkin versoontumisen osalta. Parhaiten elpyneen lajikkeen 'Eino' ensimmäisen keräyserän tuloksia (elpyminen 43 % ja versoontuminen 32 %) voidaan jo sanoa oikean suuntaiseksi. Kokonaistuloksiin vaikuttavat hyvin olennaisesti jälkimmäisen oksa erän erittäin huonot tulokset. Huhtikuussa otetuissa oksissa lepotila oli ilmeisesti jo osittain purkautunut ja aineisto olisi vaatinut perusteellisempaa esikäsittelyä ennen pakastusta.

Myöskään pisaravitrifikaatiolla saadut kokonaistulokset 40 % elpymisellä ja 22 % versoontumisella eivät ole riittäviä. Kokonaistuloksiin kuitenkin vaikuttavat niin monet eri muuttujat, että kokonaistulosten tarkastelu yksin ei riitä. PVS2-käsittelyissä huomattiin selkeästi lajikkeiden välisiä eroja, mutta tuloksista erottuvat myös selkeästi 30 ja 40 minuutin käsittelyajat parhaimpina.

Kun tarkasteluun otetaan ainoastaan nämä parhaiksi todetut 30 ja 40 minuutin PVS2-käsittelyn käyneet +LN koe-erät, niin on huomattavissa, että yli puolessa koe-eristä elpyminen oli ≥ 60 % ja ainoastaan yhdessä koe-erässä ei havaittu elpymistä lainkaan. Varsinkin lajikkeilla 'Eino' ja 'St Michel' näitä lukemia voidaan jo pitää melko hyväksyttävänä, mutta lisätutkimuksia vaadittaisiin, sillä nyt koe-erät olivat pieniä ja muita muuttujia liikaa optimaalisen PVS2-käsittelyajan määrittämiseksi.

Pisaravitrifikaation osalta hankasilmujen käytöllä ei ole perusteita, koska elpymistä tapahtui hyvin vähän -LN kontrollikokeiden ulkopuolella. Pitkistä PVS2-käsittelyistä johtuen myös samoin käsiteltyjen kärkisilmujen tulokset ovat heikkoja, mutta silti huomattavasti hankasilmueriala parempia.

Lepotilaisten silmujen pakastuksessa hankasilmut osoittautuivat huomattavasti käyttökelpoisemmiksi kuin pisaravitrifikaatiossa. Kokonsa puolesta 1. ja 2. hankasilmu kärkisilmun jälkeen saattoivat olla lähes kärkisilmun kokoisia ja tämä vaikutti niiden selviytymiseen merkittävästi. Kauemmaksi kärkisilmusta mentäessä apikaalidominanssin vaikutus voimistui ja tästä johtuen silmut olivat hyvin pieniä ja harvoin selvisivät kauaa elossa.

9.1.2 Menetelmien käytännöllisyys

Menetelmää valittaessa ei tule myöskään unohtaa käytännöllisyyttä. Koska kryosäilytetty kasvinosa oli huomattavasti suurempi lepotilaisten silmujen pakastuksessa, vei menetelmän käyttö myös huomattavasti enemmän tilaa kryotankista. Pakastettujen silmujen määrässä katsottuna vitrifikaatiossa käytetyt 523 silmua veivät kryotankissa kymmenyksen siitä tilasta minkä 367 lepotilaista silmua veivät.

Vaikka lepotilaisten silmujen pakastus tapahtuikin yhdessä päivässä, ei se juurikaan parantanut menetelmän käytännöllisyyttä, sillä pakastuksessa voitettu aika hävitettiin hitaan ja työteliään sulatusvaiheen yhteydessä. Tähän seikkaan vaikuttaa tosin erittäin paljon myös silmujen sulattajan harjaantuneisuus silmujen eristyksessä. Pisaravitrifikaatioprosessin läpivieminen alusta loppuun vei viikon, mutta sen työllistävyys oli esikasvatuksen osalta lähes olematonta ja sokerikäsittelyjen osalta päivittäin ainoastaan noin 10 minuuttia käsiteltyä maljaa kohden. Havainnointien teko oli myös huomattavasti enemmän aikaa vievää ja työlästä yksittäisinä silmuina tarkkailtujen lepotilaisten silmujen osalta.

9.1.3 Aineiston havainnointiaika ja -kriteerit

Kryosäilytysmenetelmää kehitettäessä tulee myös huomioida kuinka kauan aineistolle on mielekästä antaa aikaa elpymiseen ja versoontumiseen. Pesaravitrifikaation tuloksista on selvästi nähtävissä, että aineiston tiiviimpi tarkkailu viikoittain kokeiden alussa on perusteltua, sillä suurin osa versoontumisesta näyttäisi tapahtuvan ensimmäisten kahdeksan viikon kuluessa ja viikon 20 jälkeen versoontumista ei enää juurikaan tapahdu. Lepotilaisten silmujen pakastuksen osalta materiaalia olisi voitu siirtää versoontumisalustalle jo aiemminkin, kuin mitä nyt tehtiin. Osa aineistosta ehti jopa muuttua huonompilaatuiseksi ennen siirtoa.

Versoontuneiden silmujen lukumäärän lisäksi myös niiden laatuun tulee kiinnittää huomiota riittävää havainnointiaikaa arvioitaessa. Pesaravitrifikaation tulosten tasainen jakautuminen eri luokkiin versoontuneiden silmujen osalta osoittaa, että havainnointikriteerit olivat riittävät, koska mikään luokka ei ollut yliedustettuna.

Parhaiden I- ja II-luokan silmujen osuus aineistosta oli yli 50 % koko aineiston osalta samoin kuin +LN kokeiden osalta. Tuloksella on merkitystä etenkin ajateltaessa silmunottotarvetta tuleviin kokeisiin. Lepotilaisten silmujenkin osalta käyttökelpoisia silmuja syntyi vähän aineiston kokoon nähden. Tähän oli kuitenkin syynä ainoastaan aineiston huono elpyminen, sillä elpyneistä silmuista lähes kolmannes olisi ollut käytettävissä solukkoviljelmiin. Lepotilaisilla silmuilla myös osoitettiin että ainakin parhaasta I-luokasta on mahdollista saada aikaiseksi hyvänlaatuinen solukkoviljelmä. Jatkotutkimuksissa voitaisiin kartoittaa tarkemmin mahdollisuuksia aloittaa solukkoviljelmiä II- tai III-luokan silmuilla.

Lepotilaisista silmuista kasvatetut versot olivat hyvin laadukkaita, vaikka lukumäärällisesti niitä syntyikin hyvin vähän. Havainnointikriteerit olivat myös tässä menetelmässä kohdallaan ja asteikon koko skaala oli käytössä ja tasaisesti edustettuna lopputuloksissa. Jatkon kannalta voisi kuitenkin miettiä onko näin monivaiheinen havainnointijärjestelmä tarkoituksenmukainen, vai olisiko esimerkiksi pesaravitrifikaatiossa käytetty asteikko riittävä.

9.1.4 *In vitro* -aineiston esikasvatus

Esikasvatus osoittautui pisaravitrifikaation onnistumisen kannalta hyvin oleelliseksi varsinkin pienikokoiselle 'Elviiralle'. Pienen kokonsa vuoksi silmun irrotuksessa syntyvän haavasolukon suhde silmun kokoon oli niin suurta että silmut kuolivat kaikki. Esikasvatusmaljoista aktiivihieletön osoittautui vain hieman paremmaksi ja jos kokeita olisi tehty enemmän aktiivihieletillisellä alustalla, niin tulokset olisivat saattaneet tasoitua nyt saaduista. Huomattavaa on myös, että 'Elviira' menestyi aktiivihieletilmaljalla vertaiskoetta paremmin muiden kahden lajikkeen menestyessä paremmin hielettömällä alustalla. Aktiivihielettömällä alustalla esikasvatetut silmut myös versoontuivat paremmin.

9.1.5 Lepotilaisten silmujen pintasterilointi

Koska hypokloriittikäsittelyllä ei havaittu olevan negatiivisia vaikutuksia, voidaan sitä käyttää huoletta lepotilaisten silmujen pakastuksessa tarpeen vaatiessa. Steriloinnin käyttöä muutoin ei voi suositella sillä se hidastaa työskentelyä merkittävästi. Lajikkeen 'Eino' osalta tulokset viittaavat siihen, että hypokloriittikäsittely ja varsinkin siihen liittyvät huuhtelukäsittelyt saattavat olla silmujen elpymistä edistävä tekijä. Ilmiötä saattaa selittää huuhteluiden aikaansaama rehydraatio, mutta yhden lajikkeen tuloksia ei kuitenkaan voida yleistää ja ilmiö vaatisi jatkotutkimuksia.

9.2 Lajikkeiden väliset erot

Menetelmän tulisi olla myös sovellettavissa mahdollisimman moneen eri lajikkeeseen. Kokeisiin valittujen alppirusulajikkeiden välillä havaittiin kuitenkin selviä lajikkeista riippuvaisia eroja molempien menetelmien kaikissa kokeissa. Lajikkeiden valintaa voidaankin pitää hyvin onnistuneena ja kattavasti eri alppirusuja edustavana.

Selkeimpänä lajikkeena muista erottui pienikokoinen 'Elviira', jonka osalta tulokset olivat erittäin huonoja käytetystä menetelmästä riippumatta. *In vitro* -kasvatetun aineiston kohdalla 'Elviiran' erittäin hento rakenne vaikeutti sen käsittelyä huomattavasti ja heikensi lajikkeella saatuja tuloksia. Hyvin alhaiset elpymis- ja versoontumis-

prosentit puolestaan vaikeuttivat eri muuttujien vaikutusten arviointia. Lepotilaisten silmujen osalta pensaas, joista ensimmäiset oksat kerättiin, havaittiin kuolleiksi toista erää kerättäessä. Pensaas kaivettiin lumen alta ripeästi ja peitettiin oksien keruun jälkeen välittömästi uudelleen lumella, mutta ilmeisesti jo hyvinkin lyhyt altistus pakka- sille aiheutti kasveissa mittavia vaurioita. Selityksenä saattaa olla myös *in vitro* - aineistossa havaittu erittäin hento rakenne.

'Eino' versoi kaikista kolmesta lajikkeesta parhaiten ja oli ainut lajike, jonka lepotilaiset silmut versoivat kontrollikokeiden ulkopuolella. Lepotilaiset silmut eivät myöskään ulkoapäin vaikuttaneet vaurioituneilta vielä pensaasta leikkaamisen yhteydessä, mutta tulosten valossa näin voidaan sanoa tapahtuneen. 'Einolle' tyypillinen silmujen suuri koko helpotti niiden käsittelyä molempien menetelmien eri työvaiheissa. Versoontuminen oli *in vitro* -aineistolla erittäin hyvää ja versoontuneiden silmujen hyvän lukumäärän lisäksi suurin osa versoista kuului kahteen parhaaseen luokkaan. Huomatavaa on, että 'Eino' elpyneestä aineistosta miltei kaikki myös versoi. Eino selvisi hyvin myös kaikista PVS2-käsittelyistä mukaan lukien 60 minuutin käsittely.

'St Michelin' osalta *in vitro* -aineiston elpyminen oli erittäin hyvää ja lepotilaistenkin silmujen saralla elpymistä tapahtui, mutta versoontuminen oli heikkoa molempien menetelmien osalta niin kontrollikokeissa kuin varsinaisissa kokeissakin. Saatujen versojen laatu jäi usein myös hyvin heikoksi. Aktiivihiilettömän esikasvatusmaljan käytöllä oli ainoastaan hyvin pientä vaikutusta 'St Michelin' tuloksiin ja tähän vaikutti oletettavasti silmujen suuri koko. 'St Michelillä' ei käytetty lainkaan 45 ja 60 minuutin PVS2-käsittelyjä, mutta saadut tulokset viittaavat siihen, että lajike olisi saattanut selviytyä näistä voimakkaammistakin käsittelyistä.

9.3 Virhelähteitä

Alppiruusun pitkä kasvuaika

Alppiruusujen hidas kasvu aiheutti ongelmia lähinnä vitrifikaatiomenetelmälle. Rajoitetun ajan vuoksi monia muuttujia kuten hankasilmujen ja aktiivihiiimaljojen käyttöä jouduttiin tutkimaan päällekkäin samoissa kokeissa. Ensimmäiset versoontuneen materiaalin siirrot aineistolla tapahtuivat vasta samalla viikolla kun viimeisiä kokeita jo

pakastettiin. Päätelmät kokeiden suunnasta ja pois suljettavista muuttujista jouduttiin tämän vuoksi tekemään hyvin suppeiden tietojen valossa. Muuttujista tämä näkyy selvimmin aktiivihiielen käytöstä, jota koskevia kokeita olisi ehkä pitänyt jatkaa myös suotuisampiin PVS2-käsittelyaikoihin.

Aineiston havainnoinnille ei myöskään asetettu minkäänlaista takarajaa. Tämä yhdistettynä pitkään kasvuaikaan aiheutti havainnointivaiheen venymisen epäkäytännöllisen pitkäksi. Pitkä havainnointivaihe puolestaan aiheutti sen, että versojen havainnointia tekivät useat eri henkilöt koesarjan aikana. Nämä eri henkilöiden tekemät havainnointit perustuivat silmämääräiseen havainnointiasteikkoon, joka pitkästä kasvuajasta johtuen oli siis laadittu varsinaisesti näkemättä vielä yhtäkään versoa. Liika tulkinanvaraisuus versoontuneen aineiston ulkonäössä vaikutti heikentävästi tulosten luotettavuuteen.

Huomattavasti pienemmän muuttujamäärän ja menetelmän yleisen luonteen vuoksi lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmän tuloksia ei hidas kasvuvauhti juurikaan haitannut. Ainut haittatekijä oli aineiston havainnointien venyminen ajallisesti hyvin pitkäksi.

Kontaminaatiot virhelähteenä

Pisaravitrifikaatiomenetelmän poikkeuksellisen korkea kontaminaatiotaso oli yllättävää, sillä kaikki työvaiheet suoritettiin steriloidussa laminaarivirtauskaapissa steriloiduilla työvälineillä. Ainoat epästeriilit työvälineet olivat vesihaude sekä nestetyppi, mutta silmut eivät olleet suoraan kosketuksissa kumpaankaan missään menetelmän työvaiheessa. Käytetty nestetyppi on itsessään puhdasta mutta voi tietysti kontaminoidua säilytyksessä tai käsittelyn aikana. Etenkin maljojen valamisvaiheessa käsien välityksellä leviävät kontaminaatiot ovat kuitenkin mahdollisia. Kontaminaatioiden määrää kasvatti varmasti osaltaan myös aikataulullisista syistä pois jäänyt varoaika ennen maljojen käyttöönottoa. Lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmä osoitti myös osaltaan, että suorakaan kontakti nestetyppeen ei vaikuta kontaminaatioita lisäävästi, tosin menetelmät eivät ole tältä osin täysin vertailukelpoisia lepotilaisten silmujen voimakkaan pintasteriloinnin vuoksi.

Aktiivihiihmaljojen vertailukelpoisuus

Esikasvatusaljojen oletettiin kokeita aloitettaessa olevan täysin identtisiä toiselle maljatyypille lisättyä aktiivihiihtä lukuun ottamatta. Tarkemmassa tarkastelussa maljojen koostumusten huomattiin kuitenkin poikkeavan hormonien osalta siten, että aktiivihiihtömalja ei sisältänyt hormoneja lainkaan vaikka aktiivihiihtämaljalle niitä oli lisätty. Tulosten tämän osion voidaan kuitenkin olettaa olevan melko vertailukelpoista, sillä esikasvatuksen kesto oli melko lyhyt ja aktiivihiihtä myös heikentää hormonien toimintaa. Tarkemmat jatkotutkimukset asiasta ovat kuitenkin tarpeen. Esimerkiksi esikasvatusta aktiivihiihtämällä alustalla voitaisiin kokeilla niin, että alustaan lisättäisiin alppiruusuille sopivia hormoneja.

9.4 Lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmän muokkaus

Lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmä osoittautui vertailuista menetelmistä selkeästi heikommaksi. Osa menetelmän ongelmista johtui ulkoisista tekijöistä ja osa koeasetelman suunnittelussa tapahtuneista virhearvioinneista, jotka pois sulkemalla menetelmän tuloksia olisi mahdollisesti voitu parantaa merkittävästi.

Huhtikuussa kerätyn erän odotettiin elyvän heikommin kuin helmikuussa kerätyn erän, mutta materiaalin täydellistä kuolemista ei kuitenkaan odotettu. Vaikka huhtikuu on solukkoviljelyn kannalta otollista aikaa tehdä kasvialoituksia, ei ajankohta sovellu ilmeisesti kryosäilytykseen. Lepotilan purkautuessa pakkasvaurioiden riski suurenee ja samalla myös silmujen mahdollisuus selvitä kryogeenisistä lämpötiloista heikkenee. Päätös kerätä materiaalia ainoastaan kahdessa erässä osoittautui näin virheelliseksi. Optimaalisen keräysajankohdan määrittämiseksi olisi eriä tullut kerätä useampia. Materiaalin keruu olisi tullut myös aloittaa mahdollisesti jo joulukuussa ja koe-eriä kerätä vähintään kuukausittain.

Kokeet suoritettiin poikkeuksellisen ankaran talven aikana. Materiaalin keräysajankohdaksi valittiin helmikuu, koska oletettiin lepotilan olevan silloin kaikkein optimaalisin. Keräysajankohtaa valittaessa olisi kuitenkin tullut myös huomioida vallitsevat sääolot. Materiaalin keräyspäivään vaikutti ainoastaan käytännöllisyys ja sopivuus muuhun työaikatauluun. Kiinnittämällä tarkempaa huomiota ulkona vallinneeseen

lämpötilaan olisi voitu mahdollisesti ehkäistä esimerkiksi pakkasvaurioita, jotka aiheutuivat pensaiden kaivamisesta esiin lumen alta.

Irrotetut oksat siirrettiin ulkoa pakastimeen, jonka lämpötila vastasi ulkolämpötilaa sillä oletuksella, että lämpötila ei muuttuisi ennen silmujen siirtoa kryotankkiin. Varsinkin ensimmäisellä keräyskerralla suurin osa kerätystä materiaalista oli kuitenkin peittyneenä lumeen. Tästä syystä pakastimen lämpötilan olisikin tullut olla ainakin muutamia asteita ulkolämpötilaa korkeampi. Kryotankkiin säilötyt silmut olivat pakastimessa vain lyhyen ajan, mutta kontrollikokeilla vaikutusaika oli pidempi.

Materiaalia kerättiin molempiin keräyseriin 21 oksaa jokaisesta tutkitusta lajikkeesta ja tämän lisäksi kerättiin vielä kontrolli-erät. Materiaalin määrä oli tutkittuihin muutujiin nähden melko laaja. Vaikka menetelmällä tähdätäänkin siihen, että suuria määriä materiaalia saataisiin pakastettua kerralla, olisi koe-erien tullut olla pienempiä. Olettaen että pensaat, joista oksat kerätään, saadaan suojattua pakkasvaurioilta, voidaan esimerkiksi keräysajankohtaa tutkia pienemmälläkin aineistolla. Materiaalia päätettiin nyt tehdyissä kokeissa kerätä runsaasti myös siksi, että oli epävarmaa kuinka paljon sopivia silmuja saataisiin yksittäisestä oksasta otettua. Lepotilaisten oksien hankasilmut osoittautuivat käyttökelpoisiksi suuren kokonsa vuoksi, mutta koska huomiota kiinnitettiin nyt tehdyissä kokeissa vain silmujen sijaintiin, eikä kokoon, ei tästä saatu tarkkaa kuvaa.

Koesarjan loppupuolella havaittiin silmuissa erittäin nopeasti tapahtuvaa ruskettumista. Silmut ruskettuivat minuuttien sisällä koeputkeen siirtämisestä. Muutos oli silmin havaittavaa ja näin ollen silmuista oli jo etukäteen arvioitavissa, etteivät ne elpymään. Ruskettumisen ehkäisemiseksi voitaisiin mahdollisissa jatkotutkimuksissa kokeilla esimerkiksi antioksidanttien käyttöä ruskettumisen ehkäisemiseksi.

Myös eri alustojen kokeilulle on perusteita, sillä versoontumisalusta osoittautui lepotilaisille silmuille erittäin sopivaksi. Tämän vuoksi silmujen siirtoa suoraan versoontumisalustalle voitaisiin tutkia. Silmujen siirtäminen suoraan versoontumisalustalle vähentäisi myös siirtotarvetta, koska ainoastaan suurikokoiset I- ja II-luokan silmut tarvitsisi siirtää Erlenmeyer-pulloihin.

Nyt saatujen heikkojen tulosten vuoksi monilla lepotilaisten silmujen pakastusmenetelmän muuttujilla voidaan ainoastaan spekuloida, mutta menetelmässä on potentiaalia jatkotutkimuksille.

9.5 Menetelmäsuositus ja tulevaisuuden näkymät

Kerättyjen tutkimustulosten valossa kryosäilytysmenetelmäksi alppirusulle suositellaan modifioitua vitrifikaatiomenetelmää, jossa lähtömateriaalina käytetään *in vitro*-kasvatettuja mikroversoja. Menetelmässä kannattaa käyttää aineistona ainoastaan kärkisilmuja, joita kasvatetaan aktiivihielettömällä ja hormonittomalla esikasvatusalustalla kolmen vuorokauden ajan silmujen oton jälkeen. Tämän jälkeen esikasvatusta jatketaan vielä kolmen vuorokauden ajan 0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M sokerimaljoilla. Optimaalinen PVS2-käsittelyaika on 30–40 minuuttia lajikkeesta riippuen 30 minuutin LS-käsittelyn jälkeen. Elpyneiden silmujen havainnoiteja ei ole tarpeellista jatkaa 20 viikkoa kauempaa. Versoontumisalustalle siirretty materiaali on laadullisesti parhaimmillaan kahdeksan viikon kuluttua Erlenmayer-pulloon siirron jälkeen.

Monia muuttujia ehdittiin testata ainoastaan hyvin pienillä aineistoilla ja tämän vuoksi menetelmän useat osa-alueet vaativat vielä jatkotutkimuksia. Tulokset osoittivat myös, että alppirusujen osalta lajikkeiden väliset erot ovat huomattavia ja yhtenäisen kryosäilytysmenetelmän laatiminen saattaa osoittautua tämän vuoksi hyvin haastavaksi. Valtavan lajikemäärän vuoksi saattaisikin olla järkevää rajoittaa tutkimukset ainakin aluksi yksittäisiin rhodoryhmiin kuten esimerkiksi tärkeimpiin *R. brachycarpum spp. tigerstedtii* -pohjaisiin lajikkeisiin.

Vaikka tulokset lepotilaisten silmujen kryosäilytyksen osalta olivatkin tällä kertaa erittäin heikkoja, ei myöskään niitä kannata unohtaa mahdollisena vaihtoehtoisena materiaalina. Menetelmän vaihtaminen esimerkiksi kontrolloituun jäädytykseen perustuvaan kaksivaihepakastukseen saattaisi tarjota käyttökelpoisen vaihtoehdon varsinkin pienempien alppirusulajikkeiden kuten 'Elviiran' kryosäilytykseen. Tämä kuitenkin vaatii ehdottomasti pakkasvaurioiden sulkemista pois esimerkiksi vaihtamalla aineisto ulkona kasvavasta kasvihuoneesta kasvatettuun. Tällöin silmut tulisi tosin akklimatisoida keinotekoisesti.

Kryosäilytys ja etenkin vitrifikaatioon perustuvat menetelmät ovat vielä verrattain uusia geenivarojen säilytyksen saralla ja uusia tutkimuksia julkaistaan jatkuvasti. Esimerkiksi muiden puuvartisten kasvien kuten pensasmustikoiden meneillään olevat kryosäilytystutkimukset saattavat tarjota alppiruusuihin sovellettavissa olevia tuloksia. Näitä uusia tutkimuksia voidaankin varmasti käyttää hyödyksi tulevaisuudessa alppiruusun kryosäilytyksen suunnittelussa.

Yhteisesti kaikille lajikkeille toimivan kryosäilytysmenetelmän luominen alppiruusuille saattaa olla vielä vuosien työn takana, mutta nyt saadut tutkimustulokset kuitenkin osoittavat, että menetelmän kehittäminen on oikeilla resursseilla toteutettavissa.

LÄHTEET

Aaltonen, M., Antonius, K., Juhanoja, S., Järvelin, V., Laamanen, J., Nukari, A., Peräinen, R., Sahramaa, M., Uosukainen, M., Uusitalo, M. 2006. Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet (viherrakentamisen kasvit). MTT:n julkaisuja 91. Jokioinen, MTT.

Biologisen materiaalin kryogeeninen säilytys, n.d. Oy AGA Ab:n Internet-sivut. Viitattu 25.10.2010. <http://www.aga.fi/>, ratkaisut, kryogeeninen säilytys.

Bonga, J. & Durzan, D. 1982. Tissue culture in forestry, Haag: Dr W. Junk publishers.

Cryobiology and anhydrobiology of cells, n.d. New South Walesin yliopiston teemasivut, Viitattu 23.10.2010. <http://www.phys.unsw.edu.au/>, research, biophysics, Cryobiology and Anhydrobiology

Keskitalo, A. 2001. Fenolisten yhdisteiden biokemia ja esiintyminen. Julkaisussa Kasvipäriset biomolekyylit - fenoliset yhdisteet ja terpeenit. Toim. H. Hyvärinen Jokioinen: MTT, 14–39. MTT:n julkaisuja 100.

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

Hokka, H., Laamanen, J., Lahtonen, V., Pöyhönen, P. & Uosukainen, M. 2009. Varmennetun taimituotannon emokasvihinnasto vuonna 2010, Laukaa: MTT.

Matsumoto, T., Sakai, A. & Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration, Plant Cell Reports 13:442–446.

MTT Laukaa 2009, Toimipaikan esittely, MTT:n kotisivut. Viitattu 31.10.10. www.mtt.fi/, esittely, toimipaikat, Laukaa.

Panis, B., Piette, B., Swennen, R. 2004 Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Plant Science Volume 168, issue 1, pages 45–55.

Pankakoski, A. 1997. Puutarhurin kasvioppi, 8. p. Helsinki: Oy Edita Ab

Reed, B.M. 2008. Plant cryopreservation: A Practical Guide.

Schäfer-Menuhr, A., Schumacher, H.-A. & Mix-Wagner, G. 1997. Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen. Plant Genetic Resources Newsletter No. 111: 19–24.

Suomen kansallinen kasvigeenivaraohjelma suojelutyön tukena 2003–2008. 2008. Julkaisussa: Maa- ja elintarviketalous 165. Jokioinen: MTT

Uosukainen M. & Niskanen A.-M. 1984. Alppiruusun kasvupistelisiä, Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote, Helsinki.

Uosukainen M. 2004. Alppiruusulajikkeet ja niiden jalostus. Julkaisussa: Maataloustieteen Päivät 2004 (verkkojulkaisu). Viitattu 25.9.2010. www.smts.fi, julkaisut.

Väinölä, A. & Jussila, O. 1999. Alppiruusujen ja atsaleoiden suku (Rhododendron). *Sorbifolia* 30, 5-12.

Wolfe, J. & Bryant, G. 1992. Physical principles of membrane damage due to dehydration and freezing. Julkaisussa: *Mechanics of swelling: from clays to living cells and tissues*. Toim. T.K. Karalis. NATO 205–224 ASI Series H, vol. 64.

Wu, Y., Engelmann, F., Zhao Y., Zhou, M. & Chen, S. 1999. Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. *Cryo-Letters* 20, 121–130.

LIITTEET

Liite 1. Kasvatusalustojen ja vitrifikaatioliuosten koostumukset

Regeneraatioalusta, alppirusun solukkoviljely ja regeneraatio kryosäilytyksen jälkeen

Kantaliuos 1	25 ml/l jossa:
NH_4NO_3	16,0 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	3,84 g/l
Kantaliuos 2	50 ml/l jossa:
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,78 g/l
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	
Kantaliuos 3	50 ml/l jossa:
K_2SO_4	19,8 g/l
Kantaliuos 4	17 ml/l jossa:
KH_2PO_4	10,0 g/l
Kantaliuos 5	25 ml/l jossa:
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	22,24 g/l
Kantaliuos 6	10 ml/l jossa:
H_3BO_3	0,62 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,025 g/l
Kantaliuos 7	10 ml/l jossa:
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	37 g/l
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2,23 g/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,86 g/l
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l
Vitamiinit	10 ml/l perusliuosta jossa:
Glysiini	0,2 mg/l
Tiamiini	0,1 g/l
Nikotiinihappo	0,05 mg/l
Pyridoksiini	0,05 mg/l
Sakkaroosi	20 g/l
Mesoinositoli	0,1 g/l
Zeatiini	1,5 mg/l
Agarjauhe	4,0 g/l (OneMed Oy, Vantaa, 1462076)
Agarjauhe	3,75 g/l (Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, 4508.2)
Bacto-peptone	0,27 g/l
Alustan pH	5,2

Versoontumisalusta, alppiruusun versoontumista edistävä alusta

Ammoniumnitraatti	165 mg/l
Kaliumnitraatti	190 mg/l
Kalsiumkloridi	0,044 mg/l
Rauta	0,98 mg/l
Hivenravinteet	1 ml/l perusliuosta jossa:
Boorihappo	0,62 g/l
Kaliumfosfaatti	17 g/l
Kaliumjodidi	0,083 g/l
Natriummolybdaatti	0,025 g/l
Kobolttikloridi	0,0025 g/l
E-knopp	1 ml/l perusliuosta jossa:
Magnesiumsulfaatti	37,0 g/l
Mangaanisulfaatti	1,69 g/l
Kuparisulfaatti	0,0025 g/l
Sinkkisulfaatti	0,860 g/l
Vitamiinit	10 ml/l perusliuosta jossa:
Glysiini	0,2 mg/l
Tiamiini	0,1 g/l
Nikotiinihappo	0,05 mg/l
Pyridoksiini	0,05 mg/l
Zeatiini	2,0 mg/l
Sakkarooosi	20 g/l
Mesoinositoli	0,1 g/l
Agarjauhe	4,4 g/l (OneMed Oy, Vantaa, 1462076)
Agarjauhe	4,4 g/l (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, 4508.2)
Alustan pH	5,6–5,7

Aktiivihiltä sisältävä esikasvatusalusta (+AC), *in vitro* -silmujen esikasvatus

Murashige Skoog jauhe	4,3 g/l (Sigma Aldrich, Steinheim, M5524)
Vitamiinit	10 ml/l perusliuosta jossa:
Glysiini	0,2 mg/l
Tiamiini	0,1 g/l
Nikotiinihappo	0,05 mg/l
Pyridoksiini	0,05 mg/l
BAP	0,5 mg/l
IBA	0,05 mg/l
Aktiivihili	2,5 g/l
Sakkaroosi	30 g/l
Gelriitti	2,6 g/l
Alustan pH	5,6–5,8

Aktiivihiletön esikasvatusalusta (-AC), *in vitro* -silmujen esikasvatus

Murashige Skoog jauhe	4,3 g/l (Sigma Aldrich, Steinheim, M5524)
Vitamiinit	10 ml/l perusliuosta jossa:
Glysiini	0,2 mg/l
Tiamiini	0,1 g/l
Nikotiinihappo	0,05 mg/l
Pyridoksiini	0,05 mg/l
Myo-inositoli	100 mg/l
Sakkaroosi	30 g/l
Gelriitti	2,6 g/l
Bacto-peptone	0,27 g/l
Alustan pH	5,6–5,8

0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M sakkaroosi Murashige Skoog alustat, *in vitro* -ilmujen sokerikäsitteyt

Murashige Skoog jauhe	4,3 g/l (Sigma Aldrich, Steinheim, M5524)
Vitamiinit	10 ml/l perusliuosta jossa:
Glysiini	0,2 mg/l
Tiiamiini	0,1 g/l
Nikotiinihappo	0,05 mg/l
Pyridoksiini	0,05 mg/l
Myo-inositoli	100 mg/l
Gelriitti	2,6 g/l
Sakkaroosi	
(0,25 M)	85,5 g/l
(0,50 M)	171,0 g/l
(0,75 M)	256,5 g/l
Alustan pH	5,6–5,8

LS-liuos, ensimmäinen vitrifikaatioliuos

Glyseroli (2 M)	184 g/l
Sakkaroosi (0,4 M)	137 g/l
Murashige Skoog jauhe	4,3 g/l (Sigma Aldrich, Steinheim, M5524)
Liuoksen pH	5,8

PVS2-liuos, toinen vitrifikaatioliuos

Glyseroli (30 %)	300 g/l
Etyleeniglykoli (15 %)	150 g/l
Dimetyylisulfoksidi (15 %)	150 g/l
Murashige Skoog jauhe	4,3 g/l (Sigma Aldrich, Steinheim, M5524)
Sakkaroosi (0,4 M)	
Liuoksen pH	5,8

1 M Sakkaroosi liuos, pesuliuos sulatuksen jälkeen

Sakkaroosi (1 M)	342 g/l
Murashige Skoog jauhe	4,3 g/l (Sigma Aldrich, Steinheim, M5524)
Liuoksen pH	5,8

Liite 2. Pisaravitrifikaation tulokset koe-erittäin

erä	Lajike	PVS2-aika	LN	+AC/MS0	elpyi	versoi	ks/hs
1	Elviira	60	+	+AC	0 %	0 %	hs
2	Elviira	60	-	+AC	0 %	0 %	hs
3	Elviira	60	+	+AC	0 %	0 %	ks
4	Elviira	60	-	+AC	30 %	0 %	ks
5	Elviira	45	+	+AC	10 %	0 %	ks
6	Elviira	45	-	+AC	11 %	0 %	ks
7	Elviira	45	+	+AC	0 %	0 %	hs
8	Elviira	45	-	+AC	0 %	0 %	hs
9	Elviira	60	+	AC(-)	0 %	0 %	hs
10	Elviira	60	-	AC(-)	11 %	0 %	hs
11	Elviira	60	+	AC(-)	0 %	0 %	ks
12	Elviira	60	-	AC(-)	0 %	0 %	ks
13	Elviira	45	+	AC(-)	0 %	0 %	hs
14	Elviira	45	-	AC(-)	0 %	0 %	hs
15	Elviira	45	+	AC(-)	0 %	0 %	ks
16	Elviira	45	-	AC(-)	0 %	0 %	ks
17	Eino	60	+	+AC	0 %	0 %	hs
18	Eino	60	-	+AC	0 %	0 %	hs
19	Eino	60	+	+AC	11 %	11 %	ks
20	Eino	60	-	+AC	40 %	20 %	ks
21	Eino	45	+	+AC	25 %	0 %	ks
22	Eino	45	-	+AC	33 %	33 %	ks
23	Eino	45	+	+AC	0 %	0 %	hs
24	Eino	45	-	+AC	0 %	0 %	hs
25	Eino	60	+	AC(-)	0 %	0 %	hs
26	Eino	60	-	AC(-)	0 %	0 %	hs
27	Eino	60	+	AC(-)	64 %	64 %	ks
28	Eino	60	-	AC(-)	92 %	83 %	ks
29	Eino	45	+	AC(-)	0 %	0 %	hs
30	Eino	45	-	AC(-)	0 %	0 %	hs
31	Eino	45	+	AC(-)	33 %	33 %	ks
32	Eino	45	-	AC(-)	82 %	82 %	ks
33	St Michel	30	-	+AC	100 %	60 %	ks
34	St Michel	30	+	+AC	20 %	0 %	ks
35	St Michel	30	+	+AC	69 %	8 %	ks
36	St Michel	40	-	+AC	82 %	36 %	ks
37	St Michel	40	+	+AC	60 %	20 %	ks
38	St Michel	40	+	+AC	73 %	18 %	ks
39	St Michel	30	-	AC(-)	100 %	82 %	ks
40	St Michel	30	+	AC(-)	45 %	9 %	ks
41	St Michel	30	+	AC(-)	64 %	27 %	ks
42	St Michel	40	-	AC(-)	91 %	91 %	ks
43	St Michel	40	+	AC(-)	90 %	30 %	ks
44	St Michel	40	+	AC(-)	60 %	10 %	ks
45	St Michel	30	-		100 %	36 %	ks
46	St Michel	30	+		70 %	10 %	ks
47	St Michel	30	+		60 %	10 %	ks
48	St Michel	40	-		56 %	0 %	ks
49	St Michel	40	+		55 %	0 %	ks
50	St Michel	40	+		60 %	10 %	ks

erä	Lajike	PVS2-aika	LN	+AC/MS0	elpyi	versoo	ks/hs
51	Eino	30	-	AC(-)	91 %	91 %	ks
52	Eino	30	+	AC(-)	40 %	40 %	ks
53	Eino	30	+	AC(-)	40 %	40 %	ks
54	Eino	40	-	AC(-)	100 %	100 %	ks
55	Eino	40	+	AC(-)	36 %	27 %	ks
56	Eino	40	+	AC(-)	45 %	45 %	ks
57	St Michel	30	-	AC(-)	67 %	42 %	ks
58	St Michel	30	+	AC(-)	70 %	10 %	ks
59	St Michel	30	+	AC(-)	70 %	20 %	ks
60	St Michel	40	-	AC(-)	92 %	50 %	ks
61	St Michel	40	+	AC(-)	100 %	11 %	ks
62	St Michel	40	+	AC(-)	83 %	42 %	ks
63	Elviira	30	-	AC(-)	58 %	25 %	ks
64	Elviira	30	+	AC(-)	0 %	0 %	ks
65	Elviira	30	+	AC(-)	20 %	0 %	ks
66	Elviira	40	-	AC(-)	25 %	0 %	ks
67	Elviira	40	+	AC(-)	13 %	0 %	ks
68	Elviira	40	+	AC(-)	18 %	0 %	ks
69	Elviira	20	-	AC(-)	27 %	0 %	ks
70	Elviira	20	+	AC(-)	9 %	0 %	ks
71	Elviira	20	+	AC(-)	0 %	0 %	ks
72	Eino	20	-	AC(-)	82 %	82 %	ks
73	Eino	20	+	AC(-)	25 %	17 %	ks
74	Eino	20	+	AC(-)	27 %	27 %	ks
75	St Michel	20	-	AC(-)	100 %	58 %	ks
76	St Michel	20	+	AC(-)	82 %	27 %	ks
77	St Michel	20	+	AC(-)	62 %	23 %	ks
78	Elviira	30	-		0 %	0 %	ks
79	Elviira	30	+		0 %	0 %	ks
80	Elviira	30	+		0 %	0 %	ks
81	Eino	30	-		70 %	70 %	ks
82	Eino	30	+		8 %	8 %	ks
83	Eino	30	+		60 %	60 %	ks

Liite 3. Lepotilaisten silmujen pakastuksen tulokset silmuittain

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
1	Elviira	1	-	x	1
2	Elviira	k	-	x	1
3	Elviira	k	-	x	1
4	Elviira	4	-	x	1
5	Elviira	1	-	x	1
6	Elviira	k	-	x	1
7	Elviira	3	-	x	1
8	Elviira	2	-	x	1
9	Elviira	1	-	x	1
10	Elviira	k	-	x	1
11	Elviira	3	-	x	1
12	Elviira	1	-	x	1
13	Elviira	k	-	x	1
14	Elviira	k	-	x	1
15	Eino		tyhjä	x	1
16	Eino	2	V1	x	1
17	Eino	1	V1	x	1
18	Eino	k	V1	x	1
19	Eino	3	-	x	1
20	Eino	1	V1	x	1
21	Eino	k	V1	x	1
22	Eino	2	V1	x	1
23	Eino	1	V1	x	1
24	Eino	k	V1	x	1
25	Eino	k	V1	x	1
26	Eino	6	-	x	1
27	Eino	5	V1	x	1
28	Eino		tyhjä	x	1
29	Eino	3	-	x	1
30	Eino	2	V1	x	1
31	Eino	1	V1	x	1
32	Eino	k	V1	x	1
33	Eino	2	V2	x	1
34	Eino	1	V1	x	1
35	Eino	k	V1	x	1
36	St Michel	2	-	x	1
37	St Michel	1	-	x	1
38	St Michel	k	vihreä	x	1
39	St Michel	6	+	x	1
40	St Michel	4	lehti	x	1
41	St Michel	1	-	x	1
42	St Michel	k	lehti	x	1
43	St Michel	4	-	x	1
44	St Michel	2	-	x	1
45	St Michel	1	-	x	1
46	St Michel	k	+	x	1
47	St Michel	13	home	x	1
48	St Michel	11	-	x	1
49	St Michel	9	-	x	1

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
50	St Michel	8	-	x	1
51	St Michel	7	+	x	1
52	St Michel	5	-	x	1
53	St Michel	4	+	x	1
54	St Michel	1	lehti	x	1
55	St Michel	k	vihreä	x	1
56	St Michel	5	-	x	1
57	St Michel	4	lehti	x	1
58	St Michel	3	+	x	1
59	St Michel	2	vihreä	x	1
60	St Michel	k	+	x	1
61	St Michel	4	-	x	1
62	St Michel	3	-	x	1
63	St Michel	1	+	x	1
64	St Michel	k	V1	x	1
65	St Michel	k	+	x	1
66	St Michel	7	+	x	1
67	St Michel	6	-	x	1
68	St Michel	5	-	x	1
69	St Michel	k	-	x	1
70	St Michel	3	-	x	1
71	St Michel	2	-	x	1
72	St Michel	1	-	x	1
73	St Michel	k	-	x	1
74	St Michel	1	-	x	1
75	St Michel	k	-	x	1
76	St Michel	2	-	x	1
77	St Michel	k	-	x	1
78	St Michel	4	-	x	1
79	St Michel	3	-	x	1
80	St Michel	1	-	x	1
81	St Michel	k	-	x	1
82	St Michel	2	-	x	1
83	St Michel	1	-	x	1
84	St Michel	k	lehti	x	1
85	Elviira	4	-	x	1
86	Elviira	3	-	x	1
87	Elviira	2	-	x	1
88	Elviira	1	-	x	1
89	Elviira	k	-	x	1
90	Elviira	4	-	x	1
91	Elviira	3	-	x	1
92	Elviira	2	-	x	1
93	Elviira	1	-	x	1
94	Elviira	k	-	x	1
95	Elviira	5	-	x	1
96	Elviira	3	-	x	1
97	Elviira	2	-	x	1
98	Elviira	1	-	x	1
99	Elviira	k	-	x	1
100	Elviira	4	-	x	1
101	Elviira	3	-	x	1

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
102	Elviira	1	-	x	1
103	Elviira	k	-	x	1
104	Elviira	5	-	x	1
105	Elviira	3	-	x	1
106	Elviira	2	-	x	1
107	Elviira	1	-	x	1
108	Elviira	k	-	x	1
109	Elviira	k	-	x	1
110	Elviira	k	-	x	1
111	Eino	5	-	x	1
112	Eino	4	-	x	1
113	Eino	3	-	x	1
114	Eino	k	+	x	1
115	Eino	6	V3	x	1
116	Eino	5	-	x	1
117	Eino	3	V3	x	1
118	Eino	2	V3	x	1
119	Eino	1	V2	x	1
120	Eino	k	V2	x	1
121	Eino	1	-	x	1
122	Eino	k	-	x	1
123	Eino	5	-	x	1
124	Eino	4	vihreä	x	1
125	Eino	2	V3	x	1
126	Eino	1	lehti	x	1
127	Eino	k	lehti	x	1
128	Eino	4	-	x	1
129	Eino	3	V3	x	1
130	Eino	2	-	x	1
131	Eino	1	lehti	x	1
132	Eino	k	V3	x	1
133	Eino	k	vihreä	x	1
134	Eino	k	V3	x	1
135	St Michel	5	vihreä	x	1
136	St Michel	4	-	x	1
137	St Michel	1	lehti	x	1
138	St Michel	k	-	x	1
139	St Michel	k	vihreä	x	1
140	St Michel	4	-	x	1
141	St Michel	3	-	x	1
142	St Michel	2	+	x	1
143	St Michel	1	-	x	1
144	St Michel	k	-	x	1
145	St Michel	5	-	x	1
146	St Michel	4	-	x	1
147	St Michel	k	lehti	x	1
148	Elviira	6	-		2
149	Elviira	5	-		2
150	Elviira	4	-		2
151	Elviira	3	-		2
152	Elviira	1	-		2
153	Elviira	k	+		2

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
154	Elviira	5	-		2
155	Elviira	4	-		2
156	Elviira	3	-		2
157	Elviira	2	-		2
158	Elviira	1	-		2
159	Elviira	k	+		2
160	Elviira	7	-		2
161	Elviira	6	-		2
162	Elviira	5	-		2
163	Elviira	4	-		2
164	Elviira	3	-		2
165	Elviira	k	+		2
166	Elviira	5	-	x	2
167	Elviira	4	-	x	2
168	Elviira	3	-	x	2
169	Elviira	2	-	x	2
170	Elviira	1	-	x	2
171	Elviira	k	V3	x	2
172	Elviira	3	-	x	2
173	Elviira	1	-	x	2
174	Elviira	k	+	x	2
175	Elviira	6	-	x	2
176	Elviira	5	-	x	2
177	Elviira	4	-	x	2
178	Elviira	1	-	x	2
179	Elviira	k	+	x	2
180	Eino	7	V3		2
181	Eino	6	V3		2
182	Eino	5	-		2
183	Eino	4	V3		2
184	Eino	3	V2		2
185	Eino	2	V2		2
186	Eino	1	V2		2
187	Eino	k	V1		2
188	Eino	2	-		2
189	Eino	1	-		2
190	Eino	k	-		2
191	Eino	1	-		2
192	Eino	7	-	x	2
193	Eino	6	-	x	2
194	Eino	3	V2	x	2
195	Eino	1	V3	x	2
196	Eino	k	V3	x	2
197	Eino	k	V3	x	2
198	Eino	k	-	x	2
199	Elviira	7	-		1
200	Elviira	6	-		1
201	Elviira	5	-		1
202	Elviira	4	-		1
203	Elviira	3	-		1
204	Elviira	k	-		1
205	Elviira	7	-		1

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
206	Elviira	6	-		1
207	Elviira	4	-		1
208	Elviira	3	-		1
209	Elviira	5	-		1
210	Elviira	4	-		1
211	Elviira	3	tyhjä		1
212	Elviira	1	-		1
213	Elviira	k	-		1
214	Elviira	4	-		1
215	Elviira	2	-		1
216	Elviira	1	-		1
217	Elviira	k	-		1
218	Elviira	2	-		1
219	Elviira	1	-		1
220	Elviira	k	-		1
221	Elviira	4	-		1
222	Elviira	3	-		1
223	Elviira	2	-		1
224	Elviira	1	-		1
225	Elviira	k	-		1
226	Elviira	k	-		1
227	St Michel	3	-		2
228	St Michel	2	-		2
229	St Michel	1	-		2
230	St Michel	k	lehti		2
231	St Michel	5	-		2
232	St Michel	2	+		2
233	St Michel	1	lehti		2
234	St Michel	k	+		2
235	St Michel	k	vihreä		2
236	St Michel	k	lehti		2
237	St Michel	k	V3		2
238	St Michel	6	-	x	2
239	St Michel	5	-	x	2
240	St Michel	4	-	x	2
241	St Michel	3	-	x	2
242	St Michel	1	-	x	2
243	St Michel	k	-	x	2
244	St Michel	k	+	x	2
245	St Michel	4	-	x	2
246	St Michel	3	-	x	2
247	St Michel	2	-	x	2
248	St Michel	k	lehti	x	2
249	St Michel	8	-	x	2
250	St Michel	6	-	x	2
251	St Michel	4	+	x	2
252	St Michel	3	-	x	2
253	St Michel	1	+	x	2
254	St Michel	k	V3	x	2
255	St Michel	3	-		1
256	St Michel	2	-		1
257	St Michel	1	vihreä		1
258	St Michel	k	-		1

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
259	St Michel	4	-		1
260	St Michel	3	-		1
261	St Michel	2	vihreä		1
262	St Michel	1	-		1
263	St Michel	k	-		1
264	St Michel	4	-	x	1
265	St Michel	2	-	x	1
266	St Michel	1	-	x	1
267	St Michel	k	-	x	1
268	St Michel	4	-	x	1
269	St Michel	1	+	x	1
270	St Michel	k	+	x	1
271	St Michel	2	+	x	1
272	St Michel	1	+	x	1
273	St Michel	k	vihreä	x	1
274	Eino	4	-		1
275	Eino	2	-		1
276	Eino	1	-		1
277	Eino	3	-		1
278	Eino	1	-		1
279	Eino	k	-		1
280	Eino	4	-		1
281	Eino	3	-		1
282	Eino	2	-		1
283	Eino	1	-		1
284	Eino	k	-		1
285	Eino	6	-	x	1
286	Eino	4	-	x	1
287	Eino	1	-	x	1
288	Eino	k	V1	x	1
289	Eino	3	-	x	1
290	Eino	2	-	x	1
291	Eino	1	-	x	1
292	Eino	k	V2	x	1
293	Eino	3	-	x	1
294	Eino	1	V2	x	1
295	Eino	k	V1	x	1
296	Elviira	4	-		1
297	Elviira	2	home		1
298	Elviira	k	-		1
299	Elviira	2	-		1
300	Elviira	1	-		1
301	Elviira	k	-		1
302	Elviira	5	-		1
303	Elviira	2	-		1
304	Elviira	1	-		1
305	Elviira	k	-		1
306	Elviira	4	-		1
307	Elviira	3	-		1
308	Elviira	2	-		1
309	Elviira	k	-		1
310	Elviira	5	-		1
311	Elviira	1	-		1

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
312	Elviira	k	-		1
313	Elviira	3	-		1
314	Elviira	2	-		1
315	Elviira	1	-		1
316	Elviira	k	-		1
317	Elviira	3	-		1
318	Elviira	2	-		1
319	Elviira	k	-		1
320	Eino	5	-		1
321	Eino	4	-		1
322	Eino	3	-		1
323	Eino	2	V1		1
324	Eino	1	-		1
325	Eino	k	-		1
326	Eino	k	-		1
327	Eino	5	-	x	1
328	Eino	4	-	x	1
329	Eino	2	V2	x	1
330	Eino	1	V3	x	1
331	Eino	k	-	x	1
332	Eino	2	lehti	x	1
333	Eino	1	V3	x	1
334	Eino	k	V2	x	1
335	Eino		V2	x	1
336	Eino	k	V2	x	1
337	Eino	2	V3	x	1
338	Eino	k	-	x	1
339	Elviira	2	-		2
340	Elviira	1	-		2
341	Elviira	k	-		2
342	Elviira	5	-		2
343	Elviira	k	-		2
344	Elviira	6	-		2
345	Elviira	4	-		2
346	Elviira	3	-		2
347	Elviira	k	-		2
348	Elviira	6	bakteeri		2
349	Elviira	5	-		2
350	Elviira	1	tyhjä		2
351	Elviira	k	-		2
352	Elviira	k	-		2
353	Elviira	7	-		2
354	Elviira	6	-		2
355	Elviira	2	-		2
356	Elviira	k	-		2
357	St Michel	5	-		2
358	St Michel	4	-		2
359	St Michel	2	-		2
360	St Michel	k	-		2
361	St Michel	3	-		2
362	St Michel	2	-		2
363	St Michel	k	-		2
364	St Michel	3	-		2

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
365	St Michel	1	-		2
366	St Michel	k	-		2
367	St Michel	5	-		2
368	St Michel	3	-		2
369	St Michel	k	-		2
370	St Michel	3	-		2
371	St Michel	k	-		2
372	St Michel		-		2
373	St Michel	k	-		2
374	St Michel	3	-		2
375	St Michel	1	-		2
376	St Michel	k	-		2
377	Eino	3	-		2
378	Eino	k	-		2
379	Eino	k	-		2
380	Eino	5	-		2
381	Eino	4	-		2
382	Eino	2	-		2
383	Eino	1	-		2
384	Eino	k	-		2
385	Eino	6	-		2
386	Eino	2	-		2
387	Eino	1	-		2
388	Eino	k	-		2
389	Eino	4	-	x	2
390	Eino	3	-	x	2
391	Eino	1	-	x	2
392	Eino	k	-	x	2
393	Eino		-	x	2
394	Eino		-	x	2
395	Eino	k	-	x	2
396	Eino	3	-	x	2
397	Eino	k	-	x	2
398	Elviira	3	-		2
399	Elviira	2	-		2
400	Elviira	1	-		2
401	Elviira	k	-		2
402	Elviira	3	-		2
403	Elviira	2	-		2
404	Elviira	1	-		2
405	Elviira	k	-		2
406	Elviira	3	-		2
407	Elviira	1	-		2
408	Elviira	k	-		2
409	Elviira	5	-		2
410	Elviira	2	-		2
411	Elviira	k	-		2
412	Elviira	3	-		2
413	Elviira	1	-		2
414	Elviira	k	-		2
415	Elviira	2	-		2
416	Elviira	1	-		2
417	Elviira	k	-		2

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
418	Elviira	5	-		2
419	Elviira	2	-		2
420	Elviira	1	-		2
421	Elviira	k	-		2
422	Elviira	5	-		2
423	Elviira	4	-		2
424	Elviira	1	-		2
425	Elviira	k	-		2
426	Elviira	7	-		2
427	Elviira	5	-		2
428	Elviira	1	-		2
429	Elviira	k	-		2
430	Elviira	1	-		2
431	Elviira	k	-		2
432	Elviira	1	-		2
433	Elviira	k	-		2
434	Elviira	2	-		2
435	Elviira	1	-		2
436	Elviira	k	-		2
437	Elviira	k	-		2
438	St Michel	4	-		2
439	St Michel	2	-		2
440	St Michel	1	-		2
441	St Michel	k	-		2
442	St Michel	3	-		2
443	St Michel	2	-		2
444	St Michel	1	-		2
445	St Michel	k	-		2
446	St Michel	1	-		2
447	St Michel	k	-		2
448	St Michel	2	-	x	2
449	St Michel	1	-	x	2
450	St Michel	k	-	x	2
451	St Michel		-	x	2
452	St Michel	k	-	x	2
453	St Michel	2	-	x	2
454	St Michel	1	-	x	2
455	St Michel	k	-	x	2
456	St Michel	1	-	x	2
457	St Michel	k	-	x	2
458	Eino	6	-		2
459	Eino	5	-		2
460	Eino	4	-		2
461	Eino	3	-		2
462	Eino	2	-		2
463	Eino	1	-		2
464	Eino	k	-		2
465	Eino	3	-		2
466	Eino	1	-		2
467	Eino	k	-		2
468	Eino	k	-		2
469	Eino	k	-		2
470	Eino	3	-		2

silmu	lajike	sijainti	tulos	kloriitti	erä
471	Eino	2	-		2
472	Eino	1	-		2
473	Eino	k	-		2
474	Eino	2	-		2
475	Eino	1	-		2
476	Eino	k	-		2
477	Eino	1	-		2
478	Eino	k	-		2
479	St Michel	3	-		2
480	St Michel	2	-		2
481	St Michel	k	-		2
482	St Michel	4	-		2
483	St Michel	3	-		2
484	St Michel	2	-		2
485	St Michel	1	-		2
486	St Michel	k	-		2
487	St Michel	6	-		2
488	St Michel	5	-		2
489	St Michel	3	-		2
490	St Michel	k	-		2
491	St Michel	k	-		2
492	St Michel	1	-		2
493	St Michel	k	-		2
494	St Michel	1	-		2
495	St Michel	k	-		2
496	St Michel	3	-		2
497	St Michel	1	-		2
498	St Michel	k	-		2
499	Eino	3	-		2
500	Eino	2	-		2
501	Eino	1	-		2
502	Eino	k	-		2
503	Eino	3	-		2
504	Eino	2	-		2
505	Eino	1	-		2
506	Eino	k	-		2
507	Eino	4	-		2
508	Eino	3	-		2
509	Eino	k	-		2
510	Eino	k	-		2