
KOLMEN PIONILAJIKKEEN MIKROLISÄYS



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Puutarhatalous

Lepaa, kevät 2013

Oma Allekirjoituksesi

Tanja Kinnunen

LEPAA
Puutarhatalous

Tekijä	Tanja Kinnunen	Vuosi 2013
Työn nimi	Kolmen pionilajikkeen mikrolisäys	

TIIVISTELMÄ

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli löytää sopiva sterilointimenetelmä ja aloitusalususta kolmelle pionilajikkeelle: *Paeonia hybrida*, *Paeonia hybrid* 'Coral Sunset' ja *Paeonia hybrid* 'Many Happy Returns'. Tavoitteena oli aikaansaada viljelmä, jota Lepaan mikrolisäyslaboratorio voi käyttää myöhemmin. Opinnäytetyön tilaajana oli taimitarha Taimimoisio.

Olemassa olevaa suomalaista tietoa pionien mikrolisäyksestä ei ollut. Työssä sovellettiin Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa käytettyjä menetelmiä ja ulkomaalaisia tutkimuksia.

Työ aloitettiin maaliskuussa 2012 ja lopetettiin kesäkuussa 2012. Työ suoritettiin Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa. Lisäysmateriaali saatiin tilaajalta. Emokasvit hyödettiin lämpimässä kasvun aikaansaamiseksi. Aloituspohjana käytettiin kasvullisia versoja ja juurisilmuja. Versoille päädyttiin kokeilemaan vain yhtä sterilointia. Menetelmässä käytettiin etanolia (70%) ja natriumhypokloriittia. Juurisilmujen steriloinnissa kokeiltiin kolmea eri sterilointia. Sterilointia kokeiltiin ilman alkoholia ja vaihtamalla natriumhypokloriitin vaikutusaikaa. Steriloinnin jälkeen versot ja juurisilmut laitettiin kahdelle eri aloitusalusustalle. Viljelyn aikana tehtiin siirrostuksia.

Käytetyt alustat olivat Murashige & Skoogin ravintoalustat, joissa ravinteet olivat puolitetut. Alustoissa käytettiin kasvihormonia bentsyyliaminopuriinia (BAP), jonka pitoisuus oli BAP 1 mg/l ja 2 mg/l. Käytetty sterilointimenetelmä ja molemmat alustat soveltuvat lajikkeiden *Paeonia hybrida* ja *Paeonia hybrid* 'Many Happy Returns' viljelyyn. *Paeonia hybrid* 'Coral Sunset' lajikkeen soveltuvuudesta ei saatu tietoa, koska kaikki viljelmät saastuivat. Tämän perusteella lajike vaatii uutta sterilointimenetelmän kehittelyä. Tulosten perusteella juurisilmujen sterilointi on haastavaa, koska kaikki viljelmät saastuivat. Siksi juuristoa ei voi suositella aloitusmateriaalina.

Avainsanat mikrolisäys, *Paeonia*, aloitus, sterilointi

Sivut 16 s. + liitteet 2 s.

The Lepaa unit
Degree Programme in Horticulture

Author	Tanja Kinnunen	Year 2013
Subject of Bachelor's thesis	Micropropagation of Three Peony Varieties	

ABSTRACT

The aims of this work were to find a suitable sterilization method and to create a suitable nutrient medium for the initiation of three peony varieties: *Paeonia hybrida*, *Paeonia hybrid* 'Coral Sunset' and *Paeonia hybrid* 'Many Happy Returns'. The purpose was to obtain a culture which Lepaa micropropagation laboratory can use later. The work was done for the Taimimoisio nursery.

Finnish research on peony micropropagation did not exist. Protocol methods used by the Lepaa micropropagation laboratory and foreign studies were applied in this work.

The experiments begun in March 2012 and were finished in June 2012. The work was carried out in the Lepaa micropropagation laboratory. The propagation material was obtained from the commissioner. The stock plants were forced in warm conditions. Shoots and root buds were used for the propagation. Ethanol (70 %) and sodium hypochlorite were used in the sterilization of shoots. Three different sterilization methods were tested on the root buds. Sterilization was tested without ethanol and changing effectiveness time of sodium hypochlorite. Sterilized shoots and buds were placed on two different media.

Media were based on Murashige's and Skoog's medium. In the initiation medium macronutrients of the medium were half-strength and medium contained cytokinin benzylaminopurine (BAP) 1 or 2 mg/l. The sterilization method used and both media are suitable for *Paeonia hybrida* and *Paeonia hybrid* 'Many Happy Returns'. The suitability of *Paeonia hybrid* 'Coral Sunset' for micropropagation is unknown, because all cultures were contaminated. Based on this, the variety requires development of a new sterilization method. Based on the results, the sterilization of root buds proved challenging, because all cultures were contaminated. Therefore using roots is not recommended.

Keywords micropropagation, *Paeonia*, initiation, sterilization

Pages 16 p. + appendices 2 p.

SISÄLLYS

JOHDANTO.....	1
1 PIONIT	2
1.1 Historia.....	2
1.2 Jalostus	2
1.3 Istutus ja hoito	3
1.4 Taudit ja tuholaiset	3
1.5 Lisääminen	3
1.6 Tutkittavat pionilajikkeet	4
2 MIKROLISÄYS.....	6
2.1 Sterilointi.....	6
2.2 Pionien mikrolisäys	6
3 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	8
3.1 Lisäysmateriaali	8
3.2 Sterilointi.....	9
3.3 Aloitusalustat.....	10
4 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	11
4.1 Kartanopioni.....	11
4.2 Coral Sunset-lajike	12
4.3 Many Happy Returns-lajike	12
4.4 Yhteenvedo	13
5 POHDINTA.....	15
6 LÄHTEET	16

Liite 1	KAIKKI STERILOINNIT
Liite 2	MS-alusta

JOHDANTO

Pionia kasvatettiin ensin sen lääkinällisten ominaisuuksien takia, mutta myöhemmin sen koristeellisuuden ja myös hyvän kestävyysden takia. Jotkut lajit eivät tarvitse lainkaan hoitoa, tästä hyvänä esimerkkinä veljeni hylätty takapiha, jossa ruusujen ja rikkaruohojen keskellä kukkii pioni. Pioni on monikäyttöinen. Se sopii yksittäiskasviksi tai korkeiden perentojen kanssa. Pioni mielletään vanhanajan perennaksi, mutta mielestäni pioni on ajaton. Uudet lajikkeet tuovat modernia ilmettä puutarhaan monine väreineen ja muotoineen. Pionin lyhyen kukinta-ajan takia kannattaa valita eri aikaan kukkivia lajeja. Kukinnasta voi nauttia myös sisällä, koska pionia voi käyttää leikkokukkana. Monissa lajeissa on myös ihastuttava tuoksu.

Opinnäytetyön tarkoitus oli tutkia pionien soveltuvuutta mikrolisäykseen tutkimalla eri sterilointimenetelmiä ja aloitusaloja. Tilaajana oli taimitarha Taimimoisio, josta lisäysmateriaali saatiin. Taimitarha saisi mikrolisäyksen onnistuttua paljon taimia emokasvimaalle. Pioneilla on kysyntää, mutta perinteinen juurakon jakaminen on hidasta. Taimiston kartanopioni on tuoksuva, mutta ei tee siementä. Lisäksi he ovat huomanneet, että ensimmäisen kasvukauden jälkeen ruukutetut taimet eivät ole enää kasvaneet kunnolla ja eivät myöskään kuki.

Mikrolisäyksen etuja verrattuna perinteiseen lisäykseen on monia. Viljelmä voidaan aloittaa hyvin pienestä kasvinpalasta. Lisäksi mikrolisäyksessä saadaan tuotettua monia taimia pienessä tilassa nopeasti ja tuotanto ei riipu vuodenaikasta. Viljelyolosuhteet ovat myös säädeltävissä ja taimien hoitoon vaaditaan vähän työvoimaa, koska ne eivät vaadi kastelua. Haittoina voi olla sen hinta ja taimien tottuminen laboratorion ulkopuoliseen ympäristöön.

Työ toteutettiin Hämeen ammattikorkeakoulun Lepaan yksikössä toimivassa mikrolisäyslaboratoriossa.

1 PIONIT

Riikonen (2003, 124) toteaa, että pionit ovat nykyisin oma heimonsa *Paeoniaceae*. Aikaisemmin ne ovat kuuluneet välillä happomarjakasveihin (*Berberidaceae*) välillä leinikkikasveihin (*Ranunculaceae*). Pionilajeja kasvaa ympäri maailmaa, Euroopassa kasvaa kymmenen ja Pohjois-Amerikassa kaksi. Suurin osa kasvaa kuitenkin Aasiassa. Aasialaisista neljä lajia on pensaita. Keski-Euroopassa viljelyssä on 11 lajia ja noin 1200 jalopionilajiketta. (Alanko 2007, 276.)

Pioneilla on puumainen mukulajuurakko. Lehtien asento on vuorottainen ja ne ovat kolmisormiset, toistamiseen kolmisormiset tai hienoliuskaiset. Lehtien, kuten myös kukkien väri ja muoto vaihtelevat lajien ja lajikkeiden mukaan. Korkeutta pioneilla voi olla 50-150 cm. Pionien kukat ovat säteittäisiä ja ne sijaitsevat yksittäin versojen kärjissä. Kukat ovat suurikokoiset ja usein puolipallon muotoisia. Niissä on viisi verholehteä, jotka säilyvät kauan. Värikkäitä isoja terälehtiä on yleensä viidestä kymmeneen. (Jelitto & Schacht 1990, 453; Kasvien maailma 1981, 1548; Riikonen 2003, 124.)

1.1 Historia

Kiinassa pioneja on kasvatettu ainakin 1500 vuotta. Aluksi niitä viljeltiin juurten lääkitsevien ominaisuuksien vuoksi, mutta ajan mittaan niiden kauneuden takia. Useimmat pionimme ovat ruohovartisen kiinanpionin (*Paeonia lactiflora*) jälkeläisiä. 700-luvulla pioneista kiinnostuivat japanilaiset munkit, jotka alkoivat käydä kauppaa kiinalaisten kanssa. Kiinalaisia ja japanilaisia kiinnosti myös pionien jalostus. Kiinanpioni on japanilaisten jalostajien ansiota. Pioneista levisi sana Eurooppaan kauppiaiden mukana. Kasvitieteilijä Joseph Banks, joka oli vastuussa Kew'n Kuninkaallisesta kasvitieteellisestä puutarhasta, antoi Itä-Intian kauppakomppanian lääkärille tehtäväksi tuoda mukanaan pensaspioni. Ja näin vuonna 1789 istutettiin Kew'hun ensimmäinen pensaspioni. (Widlundh 2007, 34–38.)

Yksi ensimmäisistä Eurooppaan tuoduista ruohovartisista pioneista oli kiinanpioni, joka nimettiin 'Whitleyi Major' lontoolaisen taimistoviljelijän mukaan. Euroopasta kotoisin olevia lajeja ovat esim. turkinpioni (*Paeonia peregrina*), munkinpioni (*P. mascula*), tillipioni (*P. tenoifolia*) ja vuoripioni (*P. officinalis*). (Widlundh 2007, 34–38.)

1.2 Jalostus

Kiinalaisten pionien kysynnän kasvaessa alkoi eurooppalaisten jalostustyö. Monet jalostajat saivat aikaan uusia haluttuja lajikkeita, kuten ranskalaiset Nicolas Lemon, Auguste Miellez, Felix Crousse, Victor ja Emile Lemoine. Englannissa Kelwayn perhe, joka omisti siihen aikaan Ison-Britannian suurimman taimiston, jalosti monia pionilajikkeita. Amerikassa innokas pionien harrastaja A. P. Saunders risteytti monia lajikkeita, kuten myös Lyman Glasscock. (Widlundh 2007, 39–45.)

1.3 Istutus ja hoito

Pionit viihtyvät parhaiten runsasravinteisessa, multavassa ja ilmavassa kasvualustassa, jonka pH on 6–6,5. Kasvualustan syvyys pitää olla ainakin puoli metriä. Ne istutetaan mieluiten kohopenkkiin. Niiden alusta on pidettävä avoimena, sillä nurmikkoheinien juuret vievät niiltä kosteuden ja ravinteet. Mielellään niiden alla voisi istuttaa jotain peittokasveja. Pioneja ei saa istuttaa liian syvään, silmujen päällä ei saa olla 3–5 cm:ä enempää multaa. Sopivin istutusaika taimimyymälästä hankituille taimille on kevät ja syyskesä jaetuille taimille. (Alanko 1998, 252; Heiskanen, Rätty & Tajakka 2007, 96.)

Syväjuurisina kasveina pionit eivät yleensä tarvitse kastelua. Lannoitus suoritetaan keväisin joko vähän tyypeä sisältävällä seoslannoitteella tai eloperäisillä lannoitteilla tai kompostilla. Pionit eivät pidä siirtämisestä. Jalopionien on annettava kasvaa paikallaan 10–15 vuotta ennen uudelleen istuttamista. Painavia kerrannaiskukkaisia lajikkeita joudutaan tukemaan, jos ne kasvavat erillään muista perennoista. (Alanko 2007, 278)

1.4 Taudit ja tuholaiset

Pioneilla ei ole yleensä pahoja kasvitauti- ja tuholaisongelmia. **Pioninhome** (*Botrytis paeoniae*) voi aiheuttaa kosteina kesinä lehtiin homelaikkuja ja homehduttaa varret, nuput ja terälehdet. Liian runsas typpilannoitus tekee kasvit alttiiksi homeelle. Ennakkotorjuntana on taimien istutus tarpeeksi etäälle toisistaan. Vahingot eivät yleensä ole suuria, koska alkukesä on usein vähäsateinen. **Laikku- ja ruostesienet** voivat vaivata pioneita loppukesällä, mutta niiden merkitys on vähäinen. **Lakastumistaudit** ovat vaarallisia, mutta niitä meillä esiintyy harvoin. Vanhoissa jalo- ja tarhapioneissa tavataan joskus **virustauteja**, jotka aiheuttavat värikkäitä laikkuja lehtiin. Pahoin saastuneet kasvit joudutaan tuhoamaan. (Alanko 1998, 253.) Tuholaisista hyvin hoidetuille pioneille ei ole suurta vahinkoa. Pioni houkuttelee muurahaisia, mutta ne eivät vahingoita kasvia. Hiekkamailla voi olla haittaa ankeroisista. (Widlundh 2007, 32.)

1.5 Lisääminen

Pioneja lisätään jakamalla aikaisin keväällä tai kukinnan jälkeen loppukesällä. Jokaiseen jakotaimiin jätetään muutama silmu ja 1–2 tervettä juuren haaraa. Lajeja voidaan lisätä myös siemenistä. Itäkkeeseen siemenet tarvitsevat lämpö- ja kylmäkäsittelyn. Keväällä kylvetystä siemenestä kasvaa syksyyn mennessä sirkkajuuri ja vasta seuraavan talven jälkeen keväällä ilmestyvät sirkkalehdet. Syyskylvö ulos ei nopeuta itämistä Suomen oloissa, sillä siemenet eivät saa riittävää lämpökäsittelyä ennen talvea. Itämisen nopeuttamiseksi voidaan syyskesällä kerätyt siemenet kylvää ruukkuihin ja pitää noin kolme kuukautta huoneenlämmössä. Tämän jälkeen ruukut siirretään viileään paikkaan. Kun ne viedään ulos toukokuussa, itäminen tapahtuu nopeasti.

Sirkkataimien juuret katkeilevat helposti, joten siemenet kannattaa kylvää yksitellen ruukkuihin. (Alanko 1998, 255.)

1.6 Tutkittavat pionilajikkeet

Kartanopioni (kuva 1.) (*Paeonia hybrida*) on tillipionin (*P. tenuifolia*) ja kuolanpionin (*P. anomala*) risteymä. Se on Tukholmalaisesta Bergiuksen puutarhasta löytynyt risteymä. Kukat ovat tummanpunaiset ja yksinkertaiset. Kukinta on toukokuun lopulla. (Widlundh 2007, 51.) Sen lehdet ovat ohutliuskaiset, mutta leveämmät kuin tillipionilla ja sen yksinkertaiset punaiset kukat ovat suuremmat kuin tillipionilla. Yleensä kasvin korkeus on metri. (Heiskanen ym. 2007, 97). Alangon (1998, 251) mukaan kartanopioni on viljelynarvoinen pioni, sillä se on nopeakasvuinen ja rehevän kasvunsa ja hyvän peittokykynsä ansiosta se voi tulla toimeen jopa nurmikolla istutettuna. Työni tilaaja Taimimoisio edustaja Pekka Mäkinen kuvailee lajia lähettämässään sähköpostiviestissä omin sanoin näin:

”Näyttävä, vahvakasvuinen ja tukeva pioni (korkeus n. 100-120cm), joka on lähestulkoon hävinnyt suomalaisista puutarhoista. Hyvä, voimakas tuoksu, aikainen kukinta (toukokuun viimeiseltä viikolta kesäkuun toiselle viikolle). Väri hohtavan punainen, erottuu maisemasta jopa satojen metrien päähän.”



Kuva 1. Kartanopionilla on loistavan punaiset kukat

Jalopionit kukkivat tarhapioneita myöhemmin. Niillä on kiiltävät, kapealiuskaiset lehdet. Joillakin jalopioneilla voi olla jopa 25 senttimetrin levyiset kukat, jonka takia ne ovatkin suosittuja puutarhoissa. Jalopionit kukkivat yleensä kesäkuun lopussa. Ne ovat talvenkestäviä, mutta vaativat hoitoa. (Alanko 1998, 252.)

Muokattu Pekka Mäkisen sähköpostiviestistä, joka kuvailee kahta jalopioni lajiketta.

Coral Sunset (kuva 2.) (*P.lactiflora* x *P.peregrina*).

”Coral- sarjassa (Coral Charm, Coral Sunset ja Pink Havaiian Coral) pioneihin tuli ensimmäisen kerran korallin punaisia sävyjä seurauksena risteytyksestä turkinpionin kanssa. Coral Sunset- lajikkeen kukat aukeavat vahvan pinkin- tai oranssin punaisina ja vaalenevat vanhetessaan lähes vaalean keltaisiksi (kukinta-aika kesä-heinäkuun vaihde). Näitä kaikkia sävyjä on yhdessä kasvissa samaan aikaan. Kaikki Coral-sarjan pionit ovat hyvin tukevavartisia (korkeus n. 100cm) mutta Coral Sunset on näistä selvästi tervelehtisin ja sen kasvusto pysyy vihreänä pitkälle syksyyn. Hyvin suosittu lajike pioniharrastajien keskuudessa.”



Kuva 2. Coral Sunset- lajikkeen kaunis kukinta kesäkuussa

Many Happy Returns(kuva 3.) (*P.lactiflora* x *P.officinalis* x *P.peregrina*)

”Tämän lajikkeen kasvatuksesta on toistaiseksi vain vähän kokemusta mutta sen upea värisävy ja maailmalla saavuttamat palkinnot antavat aiheen odottaa suosiota myös Suomessa. Tukevavartisuus (korkeus n. 80cm) ja monia hybridipioneja hieman pienemmät kukat tekevät tästä lajikkeen, jota ei välttämättä tarvitse tukea.”



Kuva 3. Many Happy Returns- lajikkeen upea kukinta

2 MIKROLISÄYS

Mikrolisäys on kasvullista lisäystä, jossa tuotetut kasvit ovat emokasvin kaltaisia klooneja eli niiden perimä on samanlainen. Mikrolisäyksessä emokasvista irrotettu kasvinosa, solukko tai solu viljellään kasvualustalla, joka sisältää sen kasvamiseen tarvittavat aineet. Viljely tapahtuu steriileissä oloissa. Lisäysmenetelmä perustuu kasvinsolujen totipotenssiin, jonka mukaan jokainen kasvinsolu sisältää kaiken tiedon kasvista, niin että se pystyy kasvamaan kokonaiseksi kasviksi. (Haapala & Niskanen 1992, 13.)

2.1 Sterilointi

Mikrolisäyksessä käytettävät kasvualustat ovat myös erinomaisia alustoja bakteereille ja sienille. Kontaminaation eli saastumisen estämiseksi lisäysmateriaalin lisäksi kaikki alustat, työvälineet ja astiat täytyy steriloida. Työskentely suoritetaan steriileissä olosuhteissa. Vuodenaika ja emokasvin kasvatusolot ovat tekijöitä, jotka myös vaikuttavat viljelmän puhtaana pysymiseen. Maanalaisten kasvinosien käyttö, niiden sisältämän mullan takia, nostaa saastumisprosenttia.

Kasvimateriaalin steriloinnissa on monenlaisia menetelmiä. Pintasterilointiin voidaan käyttää 70 %:sta etanolia, natrium- tai kalsiumhypokloriittia tai elohopeakloridia. (Haapala & Niskanen 1992, 35-36.) Sterilointimenetelmää valittaessa voidaan lopputulokseen vaikuttaa kokeilemalla eri pitoisuuksia ja vaikutusaikoja. Kasvualustojen sterilointiin käytetään yleensä autoklaavia, jossa kuuma höyry tuhoaa mikrobit.

2.2 Pionien mikrolisäys

Pionin mikrolisäys on alkanut 60-luvulla. Yleisimmin aloituspaloina käytetään hankasilmuja, silmun- tai versonkärkiä. (Tian 2008, 159.) Etanoli (70 % tai 75 %), valkaisuaine (10 %) ja elohopeakloridi (0,1 %) ovat yleisimmin käytetyt kemikaalit pionien pintasterilointiin. Yleisimmin käytetyt kasvualustat pionilla ovat; MS, ½ MS ja muut muunnellut MS-alustat. Myös muunneltua Linsmaier ja Skoogin alustaa (LS) käytetään ruohovartisella pionilla. Alusta eroaa MS-alustasta vitamiinien osalta. Bentsyyliaminopuriini BA (0,1–2(3) mg/l) on käytetyin kasvihormoneista (Tian 2008, 164-165.) Tidiatsuronia (TDZ) käytettäessä versoaminen on voimakkaampaa (Gray & Trigiano 2000), mutta kemikaalia ei saa tuoda Suomeen.

Monet seikat vaikuttavat mikrolisäykseen onnistumiseen pionilla. Yleensä fysiologisesti nuorempi aloituspala reagoi paremmin *in vitro*-olosuhteissa ja saadaan puhdas viljelmä. Isommalla aloituspalalla on paremmat edellytykset viljelyssä, koska se sisältää enemmän ravinteita ja kasvunsääteitä. (Smith 2000, 60.) Myös emokasvin ikä ja kunto, aloituspalan kohta kasvissa, valitut menetelmät, kasvualustat ja aineet

vaikuttavat viljelmän onnistumiseen. Myös lajien ja lajikkeiden välillä voi esiintyä eroja onnistumisessa.

Pionit kuuluvat kasvisukuun, joka erittää runsaasti fenoleita kasvualustaan. Fenolien erityys alkaa kun kasvimateriaalia joudutaan preparoimaan, jolloin syntyy haavapintoja. Fenolit saavat aikaan kasvualustan ruskettumisen ja mustumisen. (George 1996, 639) Tämä voi estää kasvua ja vaikeuttaa infektioiden huomaamista. Kun kasvualusta on ruskettunut fenoleista, niin toimenpiteenä on yleensä viljelmän siirrostus uudelle alustalle. Vuonna 2010 julkaistussa tutkimuksessa (Hussain, Nazki, Nelofar, Rather, Siddique) tutkittiin aloituspalatyypin, eri kemikaalien ja viljelyolosuhteiden vaikutusta ruskettumiseen ruohovartisella pionilla.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

Työssä käytettävän materiaalin toimitti työn tilaaja Taimimoisio. Heidän valikoimistaan pionilajikkeista oli tarkoitus tutkia niiden soveltuvuutta mikrolisäykseen. Saaduista viljelmistä oli tarkoitus perustaa emokasviviljelmiä taimitarhalle myöhemmin. Työ tehtiin keväällä 2012 Hämeen ammattikorkeakoulun Lepaan yksikön mikrolisäyslaboratoriossa. Havaintoja aloituksista tehtiin viikon ja kahden viikon välein. Viljelmät kasvoivat kasvatushuoneessa, jonka valojakso on 16 tuntia vuorokaudessa ja lämpötila 23–25 °C.

Aloituksia siirrostettiin uusiin koeputkiin, kun alustat ruskettuivat fenoleista. Siirrostuksia tehtiin myös kun verso oli kasvanut liian pitkäksi koeputkessa ja se vaati lyhentämistä. Lyhennetyt versonpalat siirrettiin uusiin putkiin, mutta näitä ei otettu huomioon kokeen tuloksissa.

3.1 Lisäysmateriaali

Lisäysmateriaalina oli kartanopionin lisäksi kaksi jalopioni lajiketta; Coral Sunset ja Many Happy Returns. Kartanopionin emotaimet olivat taimitarhan omaa kantaa. Taimet oli jaettu ja ruukutettu vuonna 2009 ja 2010. Ruukut talvetettiin kylmässä kausihuoneessa. Coral Sunset-lajikkeen emotaimet oli lisätty juurenpaloista vuonna 2010 ja ruukutettu syksyllä 2011. Emokasvit kasvoivat talvivarastossa, jossa lämpötila oli alle + 5 °C. Many Happy Returns-lajikkeen emotaimien juurakot nostettiin maasta ja jaettiin vuonna 2011. Ne pidettiin samassa talvivarastossa kuin Coral Sunset.

Taimia hyödettiin ensin Lepaan taimistolla (kuva 4.). Ruukut siirrettiin 27.maaliskuuta kasvihuoneeseen hyötymään nopeammin. Lämpötila oli +20°C. Taimet siirrettiin toiselle kasvihuoneosastolle 4.huhtikuuta, jossa lämpötila oli hieman viileämpi +18 °C ja tämän jälkeen aloitettiin myös taimien lannoitus.



Kuva 4. Many Happy Returns-lajikkeen taimet hyötymässä

Mikrolisäyksessä aloituspaloina käytettiin versoja, joissa oli kärkisilmu tai yksi hankasilmu. Kartanopionista ja Coral Sunset-lajikkeesta kokeiltiin myös juurisilmujen käyttöä mikrolisäyksessä.

3.2 Sterilointi

Sterilointimenetelmien (Liite 1) valinnassa hyödynnettiin kirjallisuutta ja Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa jo käytössä olevia menetelmiä. Versopalojen sterilointiin (kuva 5.) käytettiin yhtä menetelmää(Liite 1,A). Juurisilmujen sterilointiin kokeiltiin kolmea erilaista menetelmää(Liite 1, B–D). Sterilointiin kuului saippuapesu, alkoholikäsittely ja natriumhypokloriittikäsittely. Käsittelyiden jälkeen kasvimateriaali huuhdeltiin steriilillä ionivaihdetulla vedellä. Juurisilmujen sterilointiin kuului 30 minuutin huuhtelu juoksevan veden alla saippuapesun jälkeen (kuva 6.).



Kuva 5. Versopalojen sterilointi laminaarikaapissa



Kuva 6. Juurenalojen huuhtelu juoksevan veden alla

3.3 Aloitusalusat

Aloitusalusina käytettiin kahta alustaa, joiden perustana oli Murashigen ja Skoogin MS-ravintoliuos (liite 2). Alustoiden pääravinteiden pitoisuudet oli puolitettu ja sisälsivät sytokiniinia bentsyyliaminopuriinia (BAP).

1. $\frac{1}{2}$ MS + BAP 1 mg/l
2. $\frac{1}{2}$ MS + BAP 2 mg/l

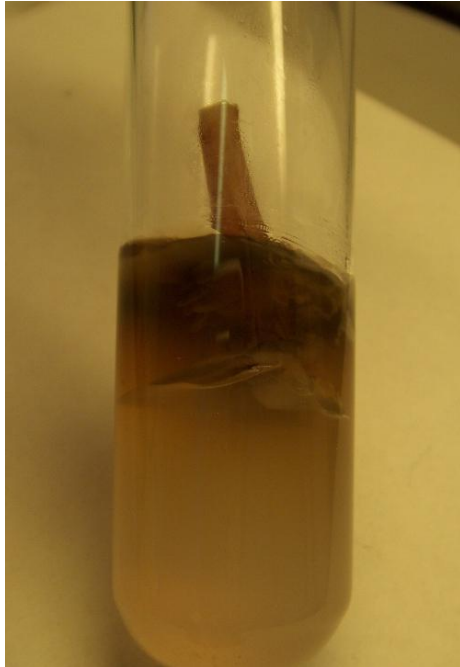
Ravintoalustat valmistettiin kantaliuoksista, jotka sekoitettiin ionivaihdettuun veteen. pH:n säätämisen (5,7) jälkeen lisättiin vettä, jolloin liuoksen tilavuus oli yksi litra. Tämän jälkeen liuos kaadettiin Erlenmeyer-astiaan ja lisättiin seoksen hyydyttävää agarua ja Bacto peptonea. Bacto peptone- valmistetta käytetään piilevien saastuntojen havaitsemiseen. Seosta kuumennettiin n. 30 minuuttia, kunnes se kirkastuu. Kuuma liuos kaadettiin koeputkiin (15 ml/putki). Koeputket steriloidtiin autoklaavissa 121 °C:ssa, 0,1 MPa:n ylipaineessa 15 minuutin ajan. Steriloidut alustat jäähdytettiin, nimettiin ja siirrettiin kylmähuoneeseen (kuva 7.).



Kuva 7. Valmiit alustat kylmähuoneessa

4 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

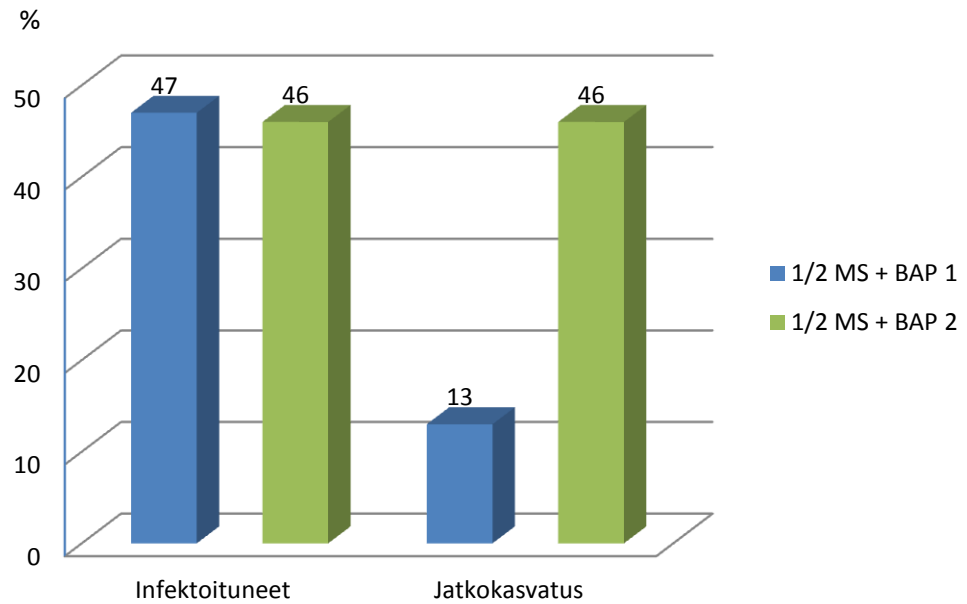
Havaintoja tehtiin infektoitumisesta eli saastumisesta (kuva 8.) noin viikon välein alussa ja myöhemmin havainnoitiin kahden viikon välein. Tarkkailukertoja oli yhteensä seitsemän. Havainnot tehtiin 2.4, 11.4, 16.4, 27.4, 7.5, 21.5 ja 4.6.



Kuva 8. Infektoitunut aloitus

4.1 Kartanopioni

Ensimmäinen aloitus tehtiin 27.3. Silloin saatiin yhteensä 15 aloituspalaa. Toisella kerralla 4.4 saatiin vain neljä aloituspalaa. Viimeisellä kerralla 23.4 saatiin yhdeksän aloituspalaa. Yhteensä saatiin 28 aloitusta. Koko opinnäytetyön aikana versonpaloja infektoitui 13 kappaletta, joten infektoitumisprosentti oli 46. Juurensilmuja saatiin steriloitua 24.4 seitsemän kappaletta(Liite 1,D). Kaikki näistä infektoituivat. Kartanopionilla infektoituneiden määrässä ei ollut huomattavaa eroa kahden alustan välillä. Alusta, joka sisälsi BAP 2 mg/l, näyttää sopivan huomattavasti paremmin tälle lajille, kun vertaa jatkokasvatukseen päässeitä viljelmiä. Jatkokasvatukseen menneiden prosentuaalinen osuus oli BAP 2 alustalta 46, joka oli huomattavasti parempi kuin BAP 1 alustan tulos 13 % (kuvio 1.). Kuolleeksi havainnoitiin vain kaksi kappaletta alustalla BAP 1.



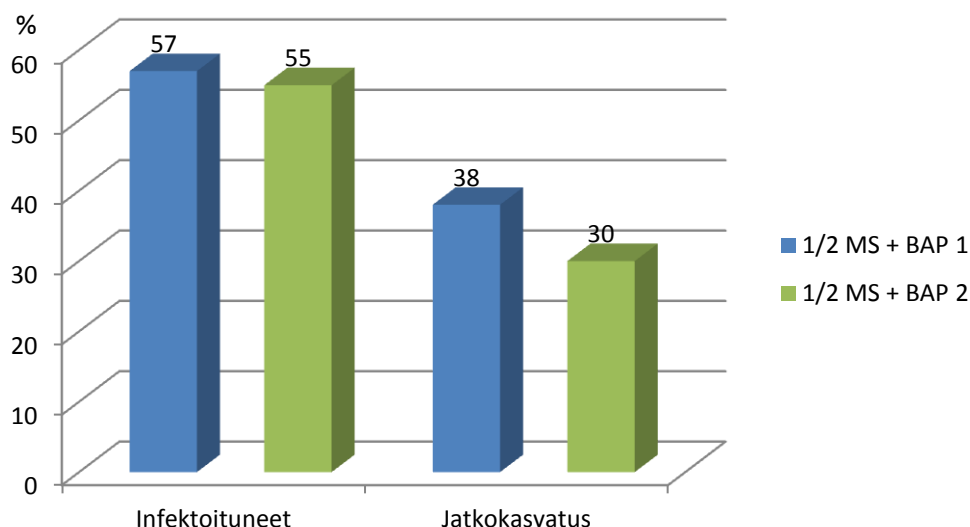
Kuvio 1. Infektoituneiden ja jatkokasvatukseen menneiden versonpalojen prosentuaalinen vertailu kartanopionilla aloitusalusujen kesken

4.2 Coral Sunset-lajike

Coral Sunset-lajikkeen ensimmäinen ja ainoa aloitus tehtiin 26.3. Yhteensä viljelmän aloituksia saatiin tällöin 16 kappaletta. Lajikkeelle tehtiin siirtoja uusiin koeputkiin 2.4 ja 7.5. Kaikki viljelmät lopulta infektoituivat, joten lajikkeesta ei saatu jatkoon viljelmää. Tutkimuksen aikana myös kaikki juurensilmualoitukset (23 kpl) infektoituivat vaikka lajikkeelle kokeiltiin kolmea eri sterilointimenetelmää (Liite 1,B-D). Lajikkeelle ei soveltunut käytetty sterilointimenetelmä ja mikrolisäysmenetelmän kehittäminen lajikkeelle vaatii uusia kokeita. Aloitusalusujen soveltuvuus jäi näin myös tietämättä.

4.3 Many Happy Returns-lajike

Many Happy Returns- lajikkeesta saatiin eniten lisäysmateriaalia, yhteensä 41 kappaletta. Ensimmäinen aloitus tehtiin 26.3. Silloin saatiin 28 aloituspalaa. Toisella kerralla 4.4 saatiin neljä ja 11.4 saatiin yhdeksän. Lajikkeelle tehtiin siirtoja uusiin putkiin 7.5. Tämän lajikkeen kohdalla infektoituneita oli 23 kappaletta, joten infektoitumisprosentti oli 56. Jatkokasvatukseen pääsi 34 %. Lajike näytti menestyvän parhaiten tutkimuksessa olleista pioneista, vaikka infektoitumisprosentti oli korkeampi kuin kartanopionilla. Alusta, joka sisälsi BAP 1 mg/l, näyttää soveltuvan hieman paremmin lajikkeelle (kuvio 2.). Tämä lajike eritti eniten fenoleita, jotka voivat haitata kasvua alustalla.



Kuvio 2. Infektoituneiden ja jatkokasvatukseen menneiden versonpalojen prosentuaalinen vertailu Many Happy Returns-lajikkeella aloitusalustojen kesken

4.4 Yhteenveto

Seuraavaan vaiheeseen monistukseen saatiin siirrettyä kartanopionilla 29 prosenttia preparoiduista versonpaloista ja Many Happy Returns-lajikkeella 34 prosenttia (Taulukko 1), joten Many Happy Returns-lajikkeelle sopii parhaiten käytetty sterilointimenetelmä (Liite 1,A). Tuloksiin voi vaikuttaa, että lajikkeesta saatiin huomattavasti enemmän aloituspaloja.

Taulukko 1. Sterilointimenetelmän vertailu lajikkeilla

Kasvilaji	Versonpaloja yhteensä	Infektoituneet		Jatkokasvatus	
		kpl	%	kpl	%
Kartanopioni	28	13	46	8	29
'Coral Sunset'	16	16	100	0	0
'Many Happy Returns'	41	23	56	14	34
Yhteensä	85	52		22	

Merkittävä tulos oli, että käytetty sterilointi ei sopinut lajikkeelle Coral Sunset. Coral Sunset-lajikkeesta ei saatu yhtään aloitusta monistukseen. Lisäsmateriaalin vähyys vaikutti siihen, että oltaisiin voitu kokeilla toista sterilointimenetelmää. Tulosten perusteella myös juurisilmujen käyttäminen on haastavaa ja kokeillut sterilointimenetelmät eivät toimineet (Taulukko 2). Saaduista tuloksista huomataan, että kartanopionille ja Many Happy Returns-lajikkeelle näyttää sopivan kummatkin aloitusalustat, BAP 1 mg/l tai BAP 2 mg/l, mutta BAP 1 sopii hieman paremmin, vaikka huomattavaa eroa niiden välillä ei ole (Taulukko 3).

Kolmen pionilajikkeen mikrolisäys

Taulukko 2. Juurisilmujen sterilointitulokset kartanopionilla ja Coral Sunset-lajikkeella

Kasvilaji	Juurisilmuja yhteensä	Infektoituneet	
		kpl	%
Kartanopioni	7	7	100
'Coral Sunset'	23	23	100
Yhteensä	30	30	

Taulukko 3. Aloitusaloitusten vertailu versonpalojen viljelyssä

Aloitusalusta	Aloituspalat /kpl	Infektoituneet		Jatkokasvatus	
		kpl	%	kpl	%
1/2 MS + BAP 1	36	27	75	10	28
1/2 MS + BAP 2	49	25	51	12	24

5 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää kolmelle pionilajikkeelle sopiva sterilointimenetelmä ja aloitusalus. Tavoitteena oli myös saada aikaan viljelmiä Lepaan mikrolisäyslaboratorion käyttöön. Tavoite ei toteutunut lajikkeella Coral Sunset. Opinnäytetyö antaa pohjatietoa pionien mikrolisäyksestä Lepaan mikrolisäyslaboratoriolle ja tuloksia soveltaen voidaan tulevaisuudessa kokeilla muita pionilajikkeita. Opinnäytetyö voi innostaa kehittämään monistus- ja juurrutusalus pioneille tai selvittämään seurantakokein miten mikrolisätty pioni menestyy kentällä esim. talvehtiminen ja kukinta. Opinnäytetyön tilaaja ei saanut vielä taimia käyttöönsä, koska työ käsitteli vain mikrolisäyksen aloitusvaihetta.

Ulkomailla on tehty paljon tutkimuksia pionien mikrolisäyksestä, mutta koskien yleensä puumaista pionia. Kaikki lisättävät pionit työssäni olivat ruohovartisia, joten en voinut käyttää näitä tutkimuksia. Koska pioni on yleinen kasvi Aasiassa, niin sieltäpäin olisi ollut tutkimuksia, mutta monessa tutkimuksessa vain tiivistelmä oli englanniksi ja varsinainen tutkimus kiinaksi.

Aluksi näytti, että sterilointi onnistuu hyvin tuloksin ja päädyttiin käyttämään vain yhtä sterilointimenetelmää versonpaloilla. Aloitusmateriaalin vähyys ei myöhemmin antanut mahdollisuutta kokeilla toisenlaista sterilointia. Tämän takia juurisilmujen steriloinnissa kokeiltiin kolmea sterilointimenetelmää. Vaikka infektoituminen oli runsasta, niin lopputulokset olivat kuitenkin parempia kuin osattiin odottaa. Coral Sunset-lajikkeen kaikkien viljelmien saastuminen oli tietenkin pettymys. Mietin, että jos aloituspaloja olisi ollut enemmän, niin oltaisiin voitu vertailla aloitusalusloja myös tämän lajikkeen kohdalla. Mutta pitää myös iloita jatkokasvatukseen päässeistä aluista, joista monistamalla voi saada monia satoja taimia.

Yllättäväksi ongelmaksi muodostui pionien hidas kasvu. Siirto lämpimämpään kasvihuoneeseen taimistolta auttoi, mutta kuitenkin olisi tarvittu enemmän kasvimateriaalia. Tämä pitää ottaa huomioon, kun joku seuraavan kerran aloittaa pionien mikrolisäystä, etenkin jos haluaa hyötää lajiketta 'Coral Sunset'. Mietin olisiko emotaimien siirrolla lämpimämpään vaikutusta tuloksiin. Nopeampi kasvu tuottaa heikompia versoja. Mietin myös olisiko myöhempi aloitusajankohta parantanut tai huonontanut tuloksia. Kesällä kasvu on runsasta, mutta voi tuoda myös muita saastuntalähteitä.

Juurisilmujen käyttö aloituksessa olisi käytännöllisempää, koska emokasveja ei tarvitsisi hyötää ja lisäys ei olisi sidottu mihinkään kasvukauteen. Itse kokeilin melko pienellä määrällä kolmea eri sterilointia huonoin tuloksin. Kuitenkin tulokset olivat sitä mitä odotin, koska maanalaiset osat ovat aina haasteellisia steriloitavia niiden sisältämän mullan takia.

6 LÄHTEET

- Alanko, P. 2007. Perennat. Hämeenlinna: Kariston kirjapaino Oy
- Alanko, P. 1998. Tammen suuri puutarhakirja 1. toim. Huhtala U. Sulkava: Tammi
- Gray, J.D. & Trigiano, N.R. 2000. Plant tissue culture concept and laboratory exercises. 2.painos. Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture part 2 in practice. uudistettu painos. Edington, Englanti
- Haapala, T. & Niskanen, A.-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. Helsinki: Opetushallitus
- Heiskanen, R. Räty, E. & Tajakka, H. 2007. Puutarha ja piha – Kukoistavat perennat. Porvoo: WS Bookwell Oy/ Weilin Göös Oy
- Hussain, G., Nazki, I.T., Nelofar, Rather, Z.A. & Siddique, M.A.A. 2010. Journal of Ornamental Horticulture, 13(1):1-7
- Mäkinen, Pekka. Lähetetty 20.11.2012. Re: Opinnäytetyö (sähköpostiviesti) Vastaanottaja Tanja Kinnunen. Viitattu 25.1.2013.
- Riikonen, A. 2003. Suomalainen perennakäsikirja. 4. painos. Hämeenlinna: Karisto Oy
- Smith, R. 2000. Plant tissue culture: techniques and experiments. 2.painos. San Diego: Academic Press
- Tian, D. 2008. Container production and post-harvest handling of lotus (Nelumbo) and micropropagation of herbaceous peony (Paeonia). http://etd.auburn.edu/etd/bitstream/handle/10415/1202/Tian_Daike_59.pdf?... Viitattu 25.1.2013.
- Widlundh, S. 2007. Pionit. Korotan Ljubljana, Slovenia: WSOY

KAIKKI STERILOINNIT

- A
1. Hammasharjapesu.
 2. Erisept-pesu(3 tippaa/100 ml) ionivaihdetussa vedessä, sekoitus 10 minuuttia ja huuhtelu ionivaihdetulla vedellä lävikössä.
Seuraavat käsittelyt laminaarikaapissa.
 3. Alkoholikäsittely: Etax A12 30 sekuntia ja huuhtelu teriilissä ionivaihdetussa vedessä.
 4. Sterilointikäsittely: 1 % NaOCl:ssa (+ 3 tippaa Tween 20/100 ml) 10 minuutin sekoitus ja 4 x huuhtelu steriilissä ionivaihdetussa vedessä.
- B
1. Hammasharjapesu.
 2. Erisept-pesu(5 tippaa/100 ml) ionivaihdetussa vedessä, sekoitus 10 minuuttia ja huuhtelu ionivaihdetulla vedellä lävikössä.
 3. Huuhtelu juoksevalla vedellä 30 minuuttia.
Seuraavat käsittelyt laminaarikaapissa.
 4. Sterilointikäsittely: 1 % NaOCl:ssa (+ 3 tippaa Tween 20/100 ml) 15 minuutin sekoitus ja 4 x huuhtelu steriilissä ionivaihdetussa vedessä.
- C
1. Hammasharjapesu.
 2. Erisept-pesu(5 tippaa/100 ml) ionivaihdetussa vedessä, sekoitus 10 minuuttia ja huuhtelu ionivaihdetulla vedellä lävikössä.
 3. Huuhtelu juoksevalla vedellä 30 minuuttia.
Seuraavat käsittelyt laminaarikaapissa.
 4. Alkoholikäsittely: Etax A12 30 sekuntia ja huuhtelu teriilissä ionivaihdetussa vedessä.
 5. Sterilointikäsittely: 1 % NaOCl:ssa (+ 3 tippaa Tween 20/100 ml) 15 minuutin sekoitus ja 4 x huuhtelu steriilissä ionivaihdetussa vedessä.
- D
1. Hammasharjapesu.
 2. Erisept-pesu(5 tippaa/100 ml) ionivaihdetussa vedessä, sekoitus 10 minuuttia ja huuhtelu ionivaihdetulla vedellä lävikössä.
 3. Huuhtelu juoksevalla vedellä 30 minuuttia.
Seuraavat käsittelyt laminaarikaapissa.
 4. Alkoholikäsittely: Etax A12 30 sekuntia ja huuhtelu teriilissä ionivaihdetussa vedessä.
 5. Sterilointikäsittely: 1 % NaOCl:ssa (+ 3 tippaa Tween 20/100 ml) 20 minuutin sekoitus ja 4 x huuhtelu steriilissä ionivaihdetussa vedessä.

MURASHIGEN & SKOOGIN ALUSTA = MS					
Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – Physiologia Plantarum 15: 473-497.					
Uosukainen, M. 1997. kontaminaatiot solukkoviljelylaboratoriossa. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 18. 9-17.)					
KANTALIUKOKSET			RAVINTOLIUIOS		
Nimike	Yhdiste	Pitoisuus	ml kantaliuosta/l	Pitoisuus mg/l	mM
MS-pääravinteet (MS⁺makro)		g/l	100		
	NH NO ₃ amm ³ oniumnitraatti(hapettava)	16,5		1650	20,6
	KNO ₃ kalium ³ nitraatti(hapettava)	19,0		1900	18,8
	CaCl ₂ x 2H ₂ O kalsium ⁴ kloridi(ärsyttävä)	4,4		440	3,0
	MgSO ₄ x 7H ₂ O magne ⁴ siumsulfaatti	3,7		370	1,5
	KH ₂ PO ₄ kaliumdivetyfosfaatti	1,7		170	1,25
MS-hivenaineet (MS⁻mikro)		g/100 ml	1		
	H ₂ BO ₃ boorih ⁴ appo	0,620		6,2	0,1
	MnSO ₄ x H ₂ O mang ⁴ aanis ² ulfaatti(haitallinen)	1,690		16,9	0,1
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O sinkkisulfaatti(ärsyttävä)	0,860		8,6	0,03
	KI kal ¹ iumjod ² idi	0,083		0,83	0,005
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O natrium ¹ molybdaatti	0,025		0,25	0,001
Erilliset kantaliuokset g/100 ml,mitataan pipetillä MS-MIKRO- kantaliuokseen	*CuSO ₄ x 5H ₂ O 0,025 g kupa ² nisulfaatti	10 ml		0,025	0,0001
	*CoCl ₂ x 6H ₂ O 0,025 g koba ² lttikloridi (myrkyllinen)	10 ml		0,025	0,0001
MS-Fe		g/500 ml	5		
Kantaliuokseen punnitaan joko rauta(II)sulfaatti ja	FeSO ₄ x 7H ₂ O rauta ² sulfaatti(haitallinen)	2,785		27,8	0,1
Titriplex III tai Na-Fe-EDTA	Na ₂ EDTA etyleenidiamiinitetraetikkahapon natriumsuola= Titriplex III (ärsyttävä)	3,725		37,3	0,1
	tai NaFe-EDTA, EDTA:n natriumrauta(III)suola	3,67		36,7	0,1
MS-vitamiinit		g/250 ml	5		
	thiamiinidikloridi (B -vitamiini)	0,005		0,1	0,0003
	nikotiinihappo (B-vitamiini) (ärsyttävä)	0,025		0,5	0,004
	pyridoksolihydrokloridi (B -vitamiini)	0,025		0,5	0,002
	glysiini (aminohappo)	0,1		2,0	0,027
Myo-inositoli (sokerialkoholi)		1,0/100ml	10	100 (tai punnitaan erikseen)	0,56
Sakkarosi (ruokosokeri) punnitaan erikseen)			30 g/l	30000	87,6
pH	Tilavuus → n.4/5 lopullisesta tilavuudesta		5,7		
	Tilavuus → 1 litra mittapullossa				
Agar			8,5 g/l	punnitaan erikseen,liuotetaan	
Bacta peptone			0,27 g/l	kuumentamalla lämpölevyllä + magneettisekoitus	