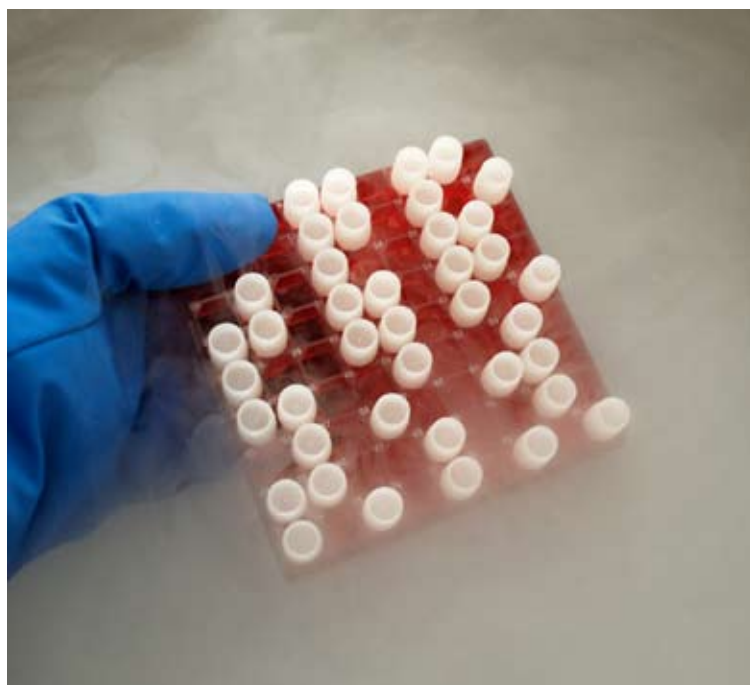


Mansikan meristeemien kryosäilytys pisara- vitrifikaatiomenetelmällä

Anu Flyktman



MTT:n selvityksiä 166
51 s.

Mansikan meristeemien kryosäilytys pisara- vitrifikaatiomenetelmällä

Anu Flyktman

ISBN 978-952-487-205-8 (Painettu)
ISBN 978-952-487-206-5 (Verkkajulkaisu)
ISSN 1458-509X (Painettu)
ISSN 1458-5103 (Verkkajulkaisu)
www.mtt.fi/mtts/pdf/mtts166.pdf

Copyright

MTT

Anu Flyktman

Julkaisija ja kustantaja

MTT, 31600 Jokioinen

Jakelu ja myynti

MTT, Tietohallinto, 31600 Jokioinen

sähköposti julkaisut@mtt.fi

Puhelin (03) 4188 2327, telekopio (03) 4188 2339

Julkaisuvuosi

2008

Kannen kuva

Anu Flyktman

Painopaikka

Tampereen Yliopistopaino Oy Juvenes Print

Mansikan meristeemien kryosäilytys pisaravitrifikaatiomenetelmällä

Anu Flyktman

MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvintuotanto, Antinniementie 1, 41330 Vihtavuori, anu.flyktman@mtt.fi

Tiivistelmä

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen Kasvintuotannon tutkimuksen Laukaan tutkimusaseman käyttöön puutarhamansikan (*Fragaria x ananassa*) eri lajikkeille sopiva kryosäilytysmenetelmä käyttäen pisaravitrifikaatiota. Menetelmän kehittäminen oli osa MTT:n hanketta ”Kylmäsäilytystekniikan soveltaminen kasvullisesti lisättävien kasvien geenivarojen pitkäaikaissäilytyksessä” ja Suomen maa- ja metsätalouden kansallista geenivaraohjelmaa. Tutkimus suoritettiin MTT:n Laukaan toimipaikassa.

Tutkimukseen liittyviin kokeisiin käytettiin mansikan mikroviljelmistä poimittuja silmuja. Kaikkiaan 149 erilaisella koe-erällä pyrittiin selvittämään viiden eri mansikkalajikkeen osalta optimaaliset muuttujat pisaravitrifikaatiomenetelmässä. Muuttujista tärkeimmät olivat vitrifikaatioliuosten käsittelyajat sekä regeneraatioalustat. Pisaravitrifikaatiomenetelmän periaatteen ovat kehittäneet Schäfer-Menuhr, Müller ja Mix-Wagner (1996), mutta sitä ei ollut aikaisemmin kokeiltu mansikalle.

Tutkimuksella todistettiin mansikan kryosäilytyksen olevan mahdollista pisaravitrifikaatiomenetelmällä. Sillä saavutettiin myös käyttöön soveltuva menetelmä Polka-lajikkeelle. Myös muiden lajikkeiden osalta tutkimuksella saavutettiin sopivien menetelmien perusteet, mutta lopullisia toimintaohjeita varten ne tarvitsevat vielä tarkennusta.

Cryopreservation of strawberry meristems by droplet-vitrification

Anu Flyktman

MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus), Kasvintuotannon tutkimus, Kasvintuotanto, Antinniementie 1, 41330 Vihtavuori, anu.flyktman@mtt.fi

Abstract

The target of the study was to develop a cryopreservation method for strawberry (*Fragaria x ananassa*) meristems for Plant Production Research of Agrifood Research Finland (MTT) using a droplet-vitrification method. The development of the method was a part of MTT's project "Application of cryopreservation techniques to long-term gene resource preservation of vegetatively propagated plants" and also a part of the national gene resource program of Finnish Agriculture and Forestry. The study took place at MTT Laukaa.

The meristems used in the experiments of the study were extricated from microcultures of five different strawberry cultivars. Optimal droplet-vitrification variables for each cultivar were explored with 149 different experiments. The most important variables were the durations of the treatments for different vitrification solutions and the quality of regeneration bases. The method of droplet-vitrification was developed by Schäfer-Menuhr, Müller & Mix-Wagner (1996) but it has not been experimented with strawberries before.

The study proved that cryopreservation of strawberries by droplet-vitrification is possible. In the process of the study a useful droplet-vitrification method was developed for Polka cultivar. For the other cultivars many parts of the appropriate methods were discovered but for those the final adjustments are still needed.

Keywords: Vitrification, cryopreservation, strawberry, liquid nitrogen

Alkusanat

Hankkeen päätavoitteena oli luoda kylmäsäilytysmenetelmin geenipankki pitkäaikaissäilytystä sekä jatkuvaa käyttöä varten. Tämä kryopankki sijaitsee MTT Laukaan toimipaikalla. Kohteina hankkeessa olivat kasvullisesti lisättävistä kasveista puutarhakasvit ja peruna. Tämä osatutkimus kohdistui mansikan eri lajikkeiden säilytysmenetelmien kehittämiseen käyttäen pisara-vitrifikaatiomenetelmää.

Mansikan säilytyksen osalta Suomi on sitoutunut myös kansainväliseen yhteistyöhön yhteiseurooppalaisessa COST-toiminnassa (European Co-operation in the Field of Scientific and Technical Research). COST 836 -projekti ”Integrated Research in Berries” oli käynnissä vuosina 1998 – 2003. Sen puitteissa geenivaratyöryhmä selvitti hankkeeseen osallistuneiden maiden mansikkakokoelmien laajuuden ja sopi työnjaosta lajikkeiden säilytyksen osalta. Suomi otti epävirallisesti vastuun kahdentoista lajikkeen säilytyksestä. Näiden lajikkeiden lisäksi MTT on nostanut pitkäaikaissäilytettävien lajikkeidensa listalle myös muutamia muita arvokkaiksi katsomiaan kantoja. (Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet (Hedelmä- ja marjakasvit). 2006, 29 – 30.) Yhteistyö jatkuu edelleen uuden kryosäilytysaiheisen COST 871 –hankkeen (Cryoplanet) puitteissa.

Mansikan kryosäilytysmenetelmän kehittäminen oli osa MTT:n (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen) kasvintuotannon tutkimuksen hanketta ”Kylmäsäilytystekniikan soveltaminen kasvullisesti lisättävien kasvien geenivarojen pitkäaikaissäilytyksessä”. Tämä hanke kuului Suomen maa- ja metsätalouden kansalliseen geenivaraohjelmaan ja se liittyi myös MTT:n vuoden 2006 painopisteeseen ”Biotekniikka kansallisten geenivarojen ja kansainvälisen arvon määrittämisessä ja säilyttämisessä”, jonka ensisijaisena aiheena olivat biotekniset (kylmä)säilytysmenetelmät kansallisten geenivarojen säilyttämisessä.

Tutkimuksen tavoitteena oli optimoida pisara-vitrifikaatiomenetelmässä esiintyvät muuttajat mansikan silmujen säilytykselle sopiviksi. Suurena osana tutkimusta oli myös sopivan toipumis- eli regeneraatioalustan löytäminen ja tarvittaessa kehittäminen. Tutkimusaineistona olivat lajikkeet ’Polka’, ’Jonsok’, ’Senga Sengana’, ’Lina’ ja ’Kent’. Näiden lisäksi säilytystä kokeiltiin myös lajikkeilla ’Korona’ ja ’Cavendish’.

Menetelmän lähtökohtana pidettiin vitrifikaatiomenetelmää, jota muokkaamalla pyrittiin tuottamaan toimintaohje myös mansikan silmujen säilytystä varten.

Tämä osatutkimus oli samalla päättötyö Jyväskylän ammattikorkeakoulun Tekniikan ja liikenteen alan Laboratorioalan koulutusohjelmassa ja se hyväksyttiin helmikuussa 2007. Päättötyö palkittiin valtakunnallisessa Thesis-kilpailussa toukokuussa 2008 Tekniikan ja liikenteen alat -sarjassa.

Haluan kiittää MTT Taimistoryhmän ryhmäpäällikkö Marjatta Uosukaista sekä tutkijoita Anna Nukaria ja Jaana Laamasta tutkimuksen ohjauksesta ja neuvoista matkan varrella. Lämmin kiitokseni myös koko tutkimusryhmälle yhteistyöstä tutkimuksen toteuttamisessa.

Sisällysluettelo

1	Johdanto	8
2	Mansikan taimituotanto.....	8
2.1	Suosikkimarja mansikka	8
2.2	Varmennettujen taimien tuotanto.....	9
2.3	Mikrolisäys	9
2.4	Varmennetun taimiaineiston testaus	10
3	Perinteiset geenisäilytysmenetelmät	11
3.1	Säilytyksen tarpeellisuus.....	11
3.2	Siemenet ja siitepöly	11
3.3	Avomaa	11
3.4	Ydinkasvihuone	12
3.5	Mikroviljelmät	12
4	Kylmäsäilytysmenetelmät	12
4.1	Perinteiset jäädytysmenetelmät.....	12
4.2	Vitrifikaatio- ja dehydraatiomenetelmät	13
4.2.1	Vitrifikaatiomenetelmä.....	13
4.2.2	Dehydraatiomenetelmä.....	14
4.2.3	Kuivaus- ja esikasvatusmenetelmät	14
4.2.4	Kapselointimenetelmät.....	14
4.2.5	Pisaramenetelmä.....	15
5	Tutkimuksen lähtökohdat.....	15
5.1	Perusteet pisara-vitrifikaatiomenetelmän tutkimiselle.....	15
5.2	Kokeiden pääpiirteet ja muuttujat.....	15
6	Kokeiden suoritus ja vaiheet	16
6.1	Esikasvatus.....	16
6.2	Silmujen otto.....	17
6.3	Esikäsittely.....	17
6.4	Vitrifikaatio ja käytetyt liuokset	19
6.5	Regeneraatio	21
6.6	Jatkokasvatus	21
7	Tulokset.....	22

7.1	Yleiset havainnot.....	22
7.1.1	Kontaminaatiot	22
7.1.2	Lajike-erot	23
7.2	Eloonjääminen	23
7.3	Versoontuminen	23
7.4	Viljelmät.....	25
7.5	Muuttujien merkitys	29
7.5.1	Silmut.....	29
7.5.2	PVS2-liuoksen käsittelyaika.....	29
7.5.3	Regeneraatioalustat.....	29
7.5.4	Supercool	30
7.5.5	Latausaika ja sulatuksen kesto.....	31
7.6	Menetelmäehdotus	31
8	Tulosten tarkastelu	31
8.1	Suoritus ja saadut tulokset.....	31
8.1.1	Kalluksen kasvu.....	32
8.1.2	Mahdolliset virhelähteet	32
8.2	Soveltaminen tuotantoon.....	33
8.3	Tutkimusehdotuksia ja kehittämisideoita.....	33
8.3.1	Kylmäkaraisu esikasvatuksessa.....	33
8.3.2	Käsittelyaika pesuliuoksessa	34
8.3.3	Jatkokasvatusalustojen tarve.....	34
8.4	Tulevaisuuden visioita	35
9	Kirjallisuus	36

1 Johdanto

Kasvien erilaisuus on mahdollistanut niiden evoluution ja muun muassa sopeutumisen erilaisille kasvupaikoille. Sadan viimevuoden aikana kasvien runsas geeniperimä on supistunut merkittävästi. Mikäli kasvien geneettisen erilaisuuden väheneminen jatkuu, eivät kaikki lajit välttämättä pysty vastaamaan tulevaisuuden haasteisiin. Tällä hetkellä arviolta 30 kasvilajia tuottaa yli 90 prosenttia ihmisten ravinnosta. Säilyttämällä, jalostamalla ja tutkimalla näiden sekä muiden lajien perimää voidaan osaltaan estää kasvien monimuotoisuuden katoamista. Parhaiten yksilöiden ominaisuuksia pystytään säilyttämään geenipankkeissa. (Hammer, Diederichsen & Spahillari, 1999.)

Kasveille käytettyjä geenivarasäilytysmenetelmiä on useita. Joillakin saavutetaan vain lyhytaikainen säilyvyys, kun taas toisilla menetelmillä säilytys onnistuu jopa vuosikymmenien ajan. Jokaisen menetelmän tarkoituksena on turvata tietyn lajikkeen tai tietyn yksilön perimän säilyvyys. Näin voidaan tuottaa lajiltaan ja lajikkeeltaan varmennettua taimimateriaalia parhaasta mahdollisesta aineistosta. Kryosäilytys nestetyypessä on joillekin kasveille jo aiemmin todistetusti toimiva menetelmä pitkäaikaista säilytystä varten. Nestetyppi pysäyttää kaiken biokemiallisen toiminnan soluissa ja voi säilyttää ne muuttumattomina jopa satoja vuosia. Verrattuna muilla menetelmillä ylläpidettäviin geenipankkeihin nestetyypisäilytys on tilaa ja työtä säästävää sekä vähemmän kontaminaatioherkkä vaihtoehto.

Mansikan osalta myös nestetyypisäilytyksen sitomisella osaksi tuotantoketjua olisi huomattava merkitys taimiaineiston käytännön tuotantoon sekä toteutettavan tuholaikestauksen rytmiin.

2 Mansikan taimituotanto

2.1 Suosikkimarja mansikka

Yleisesti viljeltyt mansikat ovat puutarhamansikoita, tieteelliseltä nimeltään *Fragaria x ananassa*. Se on yksi maailman viljellyimmistä kasveista, jonka tuotanto vuoden 2000 aikoihin oli yli 2,6 miljoonaa tonnia. (Matala 2006, 18 – 21.) Hedelmän- ja marjanviljelijäin liiton tuoreen tiedotteen mukaan Suomessa tuotettiin mansikkaa vuonna 2006 10 - 12 miljoonaa kiloa, joka oli kuivuuden vuoksi normaalia tuotantovuotta hieman vähemmän. Suomalaisille mansikka on suosikkimarja, ja sen kulutus on keskimäärin 8 - 10 litraa henkilöä kohti vuoden aikana. (Satokausi käynnistynyt koko maassa. Sydänkesällä syödään mansikkaa! 2006.)

Mansikkalajikkeita on paljon, ja niiden suosio vaihtelee niin eri maiden kuin myös ajan kulun mukaan. Pohjoismaissa valtalajikkeita ovat 'Polka', 'Senga Sengana', 'Honeoye', 'Korona', 'Bounty' ja 'Jonsok'. Mansikka on jatkuvasti jalostustyön kohteena ja uusia lajikkeita syntyy koko ajan. Uudet lajikkeet syntyvät pääosin risteytyksen myötä, mutta viime aikoina on alettu pohtia myös geenimuuntelun mahdollisuuksia. (Matala 2006, 18 – 21.)

MTT on jalostanut mansikoita Suomessa jo 1960-luvulta lähtien. Ensimmäinen Suomessa jalostettu lajike 'Hiku' tuli kauppoihin vuonna 1984 ja sai neljä vuotta myöhemmin seurakseen 'Mari'-lajikkeen. Jo 1900-luvun alkupuolella Suomessa viljeltiin 'Kasper'-lajiketta, joka oli kehitetty Kanadasta tuoduista siemenistä. Sen suosio kuitenkin hiipui jo 1940-luvun lopulla. EU:hun liittymisen myötä taimien tuonti ulkomailta helpottui ja lisään-

tyi, mutta oma jalostustyö Suomessa jatkuu edelleen. (Matala 2006, 22; Suomen kansallisten kasvi geenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet (Hedelmä- ja marjakasvit). 2006, 24.)

MTT Kasvintuotannon tutkimuksen Laukaan tutkimusryhmä puhdistaa ja ylläpitää varmennetun taimituotannon perusaineistoa eli ydinkasveja sekä tuottaa niistä valiotaimia. Laji- ja lajikevalikoima kehittyy jatkuvasti, ja toimipaikan oman aineiston lisäksi emokasvien huoltoa voidaan tehdä myös ulkopuolisille tilaustyönä. (Laamanen, Kauppinen & Uosukainen 2006.) Mansikka on nykyisessä tuotannossa varsin työteliäs tapaus. Muihin kasveihin verrattuna mansikan tuotantomäärät ovat suuret, ja sen vaatiman testausohjelman noudattaminen aikaa vievää. Mansikan saaminen sopivan menettelyohjeen myötä kryosäilytykseen tarjoaisi puhtaan kasvimateriaalin säilymisen lisäksi myös helpotusta testi- ja tuotantotyöhön.

2.2 Varmennettujen taimien tuotanto

1970-luvun puolivälissä Suomessa käynnistyi edelleen jatkuva varmennettujen taimien tuotanto, jota säädellään taimiaineistolaililla (16.12.1994/1205) ja sen asetuksilla. Tuotannon tavoitteena on parantaa kotimaisten taimien laatua ja tuottaa lajivarmennettuja, puhtaita ja terveitä laatutaimia. Lisäysaineistoa testataan tietyn ohjelman mukaan säännöllisesti, ja taimimateriaali uusitaan aika-ajoin. Tuotantoa ja lain toteuttamista valvovat Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) kasvintarkastajat. (Matala 2006, 207, 210 – 211.)

Mansikan valiotaimituotanto ja ylläpito on nykyisellään melko työlästä. Tuotantoon haluttujen lajikkeiden taimista valitaan edustavimmat yksilöt ydinkasviedokkiksi. Ydinkasviedokas on kasvintuhoojista esipuhdistettu kasvi, jonka terveyttä tarkkaillaan ja jota tarvittaessa edelleen puhdistetaan ydinkasviksi hyväksymistä varten. Ydinkasviksi hyväksynnän tekee Evira hakemusten perusteella. Hyväksytty ydinkasvi on tutkittu ja puhdas, tunnistetusta lajikkeesta tai kannasta peräisin oleva kasvi tai sen kloonit. Se on aitoudeltaan varmistettu lajille, lajikkeelle ja kannalle tyypilliseksi morfologisten ominaisuuksiensa tai DNA-tunnisteiden avulla. Ydinkasvia voidaan hyväksynnän jälkeen käyttää tietyn määräjän valiotaimien tuotannossa emokasvina. (Laamanen, Kauppinen & Uosukainen 2006.)

2.3 Mikrolisäys

Vuosittain MTT Laukaan valiotaimituotannosta lähtee tuottajille keskimäärin 60 000 taimia noin kahdeksasta eri lajikkeesta. Pääosa näistä myydään mikrotaimina. Näiden lisäksi taimia tuotetaan myös ylläpitoon sekä testauksia varten. Ylläpidossa ja testauskierrossa ovat myös kaikki ne lajikkeet, jotka eivät sillä hetkellä ole tuotannossa, mutta joiden kanta täytyy kuitenkin säilyttää. Kaiken kaikkiaan MTT:llä on kokoelmassaan noin 40 mansikkalajiketta, joista kaikki eivät kuitenkaan ole jatkuvasti mikrolisäysaineistossa. Emokasveista otetut aloitussilmut kasvavat ensin sopivalla kasvualustalla koeputkissa, joissa ne paisuvat ja kasvavat mikroversoiksi. Versot siirretään lisäysalustalle kasvatuspurkkeihin, joista ne useampien jakokertojen kautta määrän lisääntyessä päätyvät juurrutuslustoille ylläpitoon tai toimitettavaksi asiakkaille. Mansikan mikroviljelmien jakoväli on yleensä nelisen viikkoa. (Laamanen, Kauppinen & Uosukainen 2006.)

Juurrutuslustoilla versoja voidaan säilyttää hitaan kasvun olosuhteissa, ja ottaa sieltä haluttu määrä jatkotuotantoon aina tarpeen vaatiessa. Pääsääntöisesti viljelmät uusitaan kuitenkin joka vuosi. Jokaisesta lajikkeesta otetaan vuosittain useampi kasvupiste tuotantoon. Kasvupisteitä voisi sanoa erillisiksi tuotelinjoiksi saman lajikkeen sisällä. Kasvupisteistä saaduista viljelmistä osa karsiutuu pois mm. kontaminaatioiden ja materiaalin paljouden

vuoksi, tai mahdollisesti myös aitoushavaintoihin perustuen jo mikrolisäyksen alkuvaiheissa. Jatkokasvatukseen valituista kasvupisteistä saatuja versoja on jaettava aktiivisesti niin, että ne lisääntyvät tarvittavaksi taimimääräksi. (Laamanen, Kauppinen & Uosukainen 2006.)

2.4 Varmennetun taimiaineiston testaus

Mansikan tuotantoa säätelevät suurelta osin myös tuhoajatestauksille asetetut uusintavälit. Kasvintuhoojatutkimuksen voimassaoloaika on säädetty asetuksessa puutarhakasvien varmennetusta lisäys- ja taimiaineistosta ja se on lajikohtainen. Omenan ydinkasvien tuhoajatutkimuksen uusintaväli on 25 vuotta sekä avomaalla että kasvihuoneessa, vadelman puolestaan 5 vuotta avomaalla ja 10 kasvihuoneessa. Mansikka on alttiimpi erilaisille taudeille, joten sen testivälinä on ollut neljä vuotta kasvihuoneessa kasvatettuna. Avomaalla mansikan ydinkasvien säilyttäminen ei ole lainkaan sallittua. (Laamanen, Kauppinen & Uosukainen 2006.) Kryosäilytyksen onnistuminen jäädyttäisi myös tuhoajatutkimuksen voimassaolon, sillä siinä huomioidaan vain aika, jonka kasvit ovat kasvatuskierrossa (*in vivo*). Vasta säilytyksestä sulatetun ja elpyvän aineiston tuhoajatutkimuksen voimassaoloaika alkaisi taas kulua umpeen. Näin sopivalla kryosäilytysmenetelmällä ja pitkäaikaissäilytyksellä voitaisiin säästyä useilta testikerroilta tuotannon jatkuessa kuitenkin entisen kaltaisena.

Vuoden 2006 maaliskuussa astui voimaan uusi asetus varmennetusta lisäys- ja taimiaineistosta (MMM 09/2006), joka toi muutoksia mm. tautitestien voimassaoloaikoihin. Mansikan osalta testiväli kolmannelta testauskerrasta alkaen pidentyi kahdeksaan vuoteen, mikäli käytössä on yhdistetty ydinkasvihuone ja *in vitro* -ylläpitomenetelmä. Ensimmäisen ja toisen testikerran väli pysyi edelleen neljässä vuodessa. Mikäli aineistoa ylläpidettäisiin vain kasvihuoneissa, olisi testiväli jatkuvasti edelleen neljä vuotta.

Uuden asetuksen mukaan mansikka testataan 24:ää kasvintuhoojaa vastaan. Testattavana on kasvivirusien lisäksi bakteereita, homeita, sieniä ja pieneliöitä. Vaikka osalla testeistä pystytään testaamaan useampi tuhoaja samankertaisesti, on testejä suoritettava silti useita eri menetelmillä. Normaalin testikäytännön mukaan suoritettavien rinnakkaisnäytteiden lisäksi testataan osa tuhoojista kahdella eri menetelmällä. Kaikki testit suoritetaan kasvupistekohtaisesti.

Suurin osa testeistä tehdään tutkimusryhmän toimesta Laukaan toimipisteessä. Niitä ovat ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)-, inkubointi-, ympäys- ja mehutestit, mikroskopointi sekä kasvatus tuholaisselektiivisillä maljoilla. Muualla tehtäviä testejä ovat PCR-testit (Polymerase Chain Reaction), jotka suoritetaan satunnaisotoksista Elintarviketurvallisuusviraston toimesta. Koska lajikkeiden sekä siis myös testattavien kasvien määrä on suuri, on testejä porrastettu lajikkeittain eri vuosille. Näin yhtenä vuonna ei jouduta testaamaan koko mansikkakokoelmaa. Tästä huolimatta on vuosittain testattavien mansikan kasvupisteiden määrä Laukaan toimipisteessä noin 10, ja niiden vaatima testien ja rinnakkaisnäytteiden määrä on kaikkiaan yli 200.

3 Perinteiset geenisäilytysmenetelmät

3.1 Säilytyksen tarpeellisuus

Aikaisemmin villinä luonnossa eläneiden lajien monimuotoisuus alkoi vähentyä kasvien päädyttyä maatalojen viljelyksiin. Luonnollisesti suosittiin lajeja ja kantoja, jotka menestyivät parhaiten viljelyksillä niin maaperän kuin ilmanalankin suhteen. Teollistumisen myötä lajien geenivarat supistuivat edelleen merkittävästi. Samalla kuitenkin havaittiin kasvien geneettisen perimän säilyttämisen tarve mm. tulevaisuuden lajikekehittelyä varten. (Hammer, Diederichsen & Spahillari, 1999.)

Viljeltyjen kasvien kantoja on pyritty säilyttämään monin eri tavoin. Säilytystarve voi olla kasvin käyttötarkoituksesta riippuen lyhyt- tai pitkäaikainen. Lyhytaikaisen, noin 6 - 24 kuukauden, säilytyksen muotoja ovat esimerkiksi kasvien kylmävarastointi lepokauden yli. Pitkäaikaissäilytyksessä paljon käytetty menetelmä on siemensäilytys. (George 1993.) Geenipankin perustamisen näkökulmasta sopivia vaihtoehtoja ovat vain pitkäaikaiseen säilytykseen soveltuvat menetelmät. Näistä kaikki menetelmät eivät kuitenkaan sovi kaikille kasveille, tai niiden käytölle on muita esteitä. Geenien säilyttämiseen pyritään käyttämään aina mahdollisimman varmaa, kontaminaatiovapaata ja tehokasta menetelmää.

3.2 Siemenet ja siitepöly

Siemensäilytys on yleinen ja helppo säilytysmenetelmä useallekin kasville. Siemeniä voidaan säilyttää kuivattuina tai kylmäsäilytysmenetelmin. Osa siemenistä ei kuitenkaan kestä kosteuspitoisuuden laskemista tasolle, jolla säilytys olisi mahdollista. Geenisäilytykseen se soveltuu vain niille kasveista, jotka tuottavat sellaisia siemeniä, joista kasvaa emokasvia vastaava taimi. On kuitenkin paljon kasveja, jotka tuottavat geneettisesti vaihtelevia siemeniä sekä niitä, jotka eivät tuota siemeniä lainkaan. Tällaisissa tapauksissa säilytys geenipankin kannalta on hyödytöntä tai mahdotonta. Näiden seikkojen vuoksi useita kasveja lisätäänkin kasvullisesti (esim. mikrolisäys) kloonien saamiseksi. (Engelman 1998.)

Mansikkaa voidaan säilyttää siemeninä hyvinkin pitkiä aikoja. Siemenet kestävät hyvin kylmää eivätkä ole herkkiä maatumään, mutta niiden itämisprosentti vaihtelee paikoitellen suuresti. Siemeninä mansikasta voidaan harvoin säilyttää tarkalleen tiettyä genotyyppiä, joka geenipankissa on peruslähtökohta. Mansikan siemen ei nimittäin useinkaan tuota emokasvien perimän mukaista kasvua. (Reed & Hummer 1995, 357.)

Mansikan siitepölyä on säilytetty onnistuneesti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa useita vuosia. Se on säilynyt pääosin elinvoimaisena myös nestetyypessä säilytettynä kahden vuoden ajan. Siitepölystä ei kuitenkaan saada lisättyä tarkalleen tietyn genotyypin taimimateriaalia, joten sen käyttö geenisäilytysmielessä on turhaa. (Reed & Hummer 1995, 357.)

3.3 Avomaa

Yleisesti viljellyn mansikan geenisäilytykseen käytetään avomaalla kasvatusta, joskaan se ei ole ydinkasveille sallittu säilytysmenetelmä. Se tarjoaa erittäin hyvät mahdollisuudet havainnoida taimien kasvua, ominaispiirteitä ja lajikkeen aitoutta. Avomaa-kasvatusta käytetään kuitenkin lähinnä jonkin toisen säilytysmenetelmän tukena, sillä siihen liittyy monia riskitekijöitä. (Reed & Hummer 1995, 357 – 358.)

Avomaalla mansikka, kuten muutkin kasvit, on alttiina taudeille ja tuholaisille. Ne voivat levitä jopa siitepölyn välityksellä. Tuholaisten lisäksi kasveille aiheutuu usein myös fyysisiä vaurioita. Avomaan kenttäkokoelmat vaativat kasvimäärästä riippuen runsaasti tilaa ja mittavat hoitotoimet. Taimet vaativat myös säännöllisen uudelleenistutuksen. Kokoelmien ylläpito on siis riskialtista ja kallista. (MTT Kasvintuotannon tutkimus, hankesuunnitelma, 2006)

3.4 Ydinkasvihuone

Ydinkasvihuoneissa kontrolloiduissa kasvuolosuhteissa kasvatus poistaa suurelta osin tuholaisriskin. Taimet kasvatetaan yksilöinä omissa astioissaan suojassa ulkopuolisilta häiriöiltä, jolloin siis myös kasvuolosuhteet ovat hallittavissa. Kuitenkin, vaikka esimerkiksi tuhohyönteiset voidaan torjua biologisin tai kemiallisin asein, on virusten ja pieneliöiden torjuminen hankalampaa. Tuholaiset voivat kulkeutua kasvihuoneisiin mm. ilman, kasteluveden tai kasvihuoneissa liikkuvien ihmisten mukana. Eri kasvien käsittely samoilla välineillä tai jopa kasteluveden roiskuminen saattaa levittää tuholaisia kasvista toiseen. Mansikan osalta vaikeutena on kasvihuoneissa, kuten myös avomaalla lisäksi rönsyn muodostus. Rönsyt saattavat juurtua huomaamatta viereisen taimen juurelle, jolloin aineistot menevät sekaisin. Myös kasvihuonekasvatus on paljon käytetty säilytysmuoto, mutta sekin vaatii melko paljon tilaa.

3.5 Mikroviljelmät

Säilytys *in vitro* -mikroviljelmissä soveltuu mansikalle hyvin. Versoja voidaan säilyttää muutaman celsiusasteen lämpötilassa elinvoimaisina jopa vuosia. Tuholaisten sekä tautien riski on melko pieni, mikäli kasvatukseen valitaan alusta alkaen testattua, puhdasta materiaalia. (Reed & Hummer 1995, 358.) Erityisesti mikroviljelmien kohdalla on kuitenkin huolehdittava työvälineiden sekä ympäristön puhtaudesta, jotta bakteeri- ja homekontaminaatioilta vältyttäisiin. Jakamalla mikroviljelmiä saadaan nopeasti suuri määrä puhdasta taimiaineistoa riippumatta vuodenajasta, mutta viljelmien ylläpitäminen on melko työlästä. Myös inhimillinen virhe voi olla kohtalokas, esim. virhemerkinnän tai aineistojen sekoittumisen muodossa. (Matala 2006, 210.)

Mikroviljelmissä myös kasvien muuntuminen on mahdollista. Kasvualustoissa käytettävien hormonien vaikutuksesta saattaa jälkeläisistä kasvaa emokasveista poikkeavia yksilöitä. Muuntuminen voi olla myös hyvin pientä, esim. rönsyjen tuoton lisääntyminen, joka ei sinänsä vaikuta itse taimen perimään. (Matala 2006, 210.) Muuntumisen ehkäisemiseksi useat maat ovat rajoittaneet mansikkaviljelmien jakokertojen määrän korkeintaan kymmeneen. Tämä sääntö on voimassa myös Suomessa (MMM 09/2006).

4 Kylmäsäilytysmenetelmät

4.1 Perinteiset jäädytysmenetelmät

Perinteisinä jäädytysmenetelminä pidetään kasvin tai sen osan upottamista suoraan nestetyypeen, sekä vaiheittaista jäädytystä pakastimessa ennen nestetyypeen upottamista. Pakastimessa vaiheittain jäädytys voidaan tehdä tasaisesti lämpötilaa laskemalla 0,2 - 1 °C minuutissa noin -40 °C:n lämpötilaan, jonka jälkeen näyte upotetaan nestetyypeen. Tästä menetelmästä käytetään nimitystä kaksivaihejäädytys. Toinen tapa on laskea lämpötilaa vaiheittain -20 °C:sta aina nestetyypeä vastaavaan -196 °C:n lämpötilaan saakka. (Laa-

manen, Kauppinen & Uosukainen 2006.) Hitaan jäädytyksen aikana soluneste alijäähtyy, kun varsinainen jäätyminen tapahtuu hiljalleen solujen välitilassa. Solukalvo estää jään pääsyn solujen sisälle. Kun solujen veden höyrynpaine ylittää ympäröivän jään paineen, alkavat solut tasapainottaa tilaa vapauttamalla vettä ulkopuolelleen. Seurauksena tästä ei solun sisälle muodostu lämpötilan edelleen laskiessa jääkiteitä, vaan neste jähmettyy ja muuttuu kiinteäksi kasvattamatta tilavuuttaan. (Engelman 1998.)

Näitä menetelmiä käytetään muun muassa lepotilassa olevien silmujen säilytykseen. Säilytykseen otetaan tällöin esim. puun oksa, jossa on silmuja. Silmut säilötään putkiin oksaan kiinnittyneinä, ja kasvupisteiden otto niistä tapahtuu vasta sulatuksen jälkeen, samalla tavalla kuin kryokäsittelmättömän aineistonkin kohdalla.

Perinteisillä menetelmillä säilytettyjen kasvupisteiden on havaittu tuhoutuvan merkittävilta osin. Sulatuksen jälkeinen kasvu alkaa usein erikoistumattomana kallussolukkona, josta myöhemmin versot kehittyvät. (Sakai 1998) Menetelmät sopivat niille kasveille, joilla on luonnostaan kylmän sietokykyä. Muiden kasvien osalta niiden käyttö onnistuneesti on epävarmaa. Nämä menetelmät vaativat lisäksi panostusta laitteistoon. Esimerkiksi lämpötilan tasaista laskemista varten tarvitaan ohjelmoitava pakastin. (Engelman, 1998)

4.2 Vitrifikaatio- ja dehydraatiomenetelmät

Sekä vitrifikaatiomenetelmän (Sakai, Kobayashi & Oiyama 1990) että dehydraatiomenetelmän (Fabre & Dereuddre 1990) periaatteena on poistaa soluilta niiden käytössä oleva vesi, jolloin soluista tulee toiminnaltaan pysähtyneitä, ja ainakin teoriassa niiden säilöminen olisi näin mahdollista. Vettä voidaan poistaa haihduttamalla, mutta sen koostumusta ja käyttäytymistä voidaan myös muuttaa, jolloin sen vaikutukset soluissa estyvät.

Dehydraatiomenetelmällä on säilötty onnistuneesti jo muun muassa koisokasveja (Fabre & Dereuddre 1990). Vitrifikaatiomenetelmällä puolestaan mm. vadelmaa (Wang, Laamanen, Uosukainen & Valkonen 1995) ja banaania (Panis, Piette & Swennen 2005).

4.2.1 Vitrifikaatiomenetelmä

Vitrifikaatio tarkoittaa veden muuttumista kovaksi erilaisten lisättyjen aineiden avulla ilman jääkiteiden muodostumista. Solutasolla jäätymisestä aiheutuvat vahingot johtuvat juuri muodostuvista jääkiteistä, jotka rikkovat solujen rakenteita laajentuessaan. Vedellä on alhainen viskositeetti, joka lisääntyy vain hieman vettä jäähdytettäessä. Kun se saavuttaa jäätympisteensä, muodostuu jääkiteitä nopeasti ja yhtäkkisesti. Tätä voidaan osittain estää jäädyttämällä vesi erittäin nopeasti hyvin alhaiseen lämpötilaan, jolloin vesimolekyyleillä ei ole aikaa järjestäytyä hilamuotoonsa. (Zachariassen & Kristiansen 2000.)

Veden jäätympiste on yleisesti 0 °C, mutta täydellisen puhdas vesi ei jäädy vasta kuin noin -40 °C:n lämpötilassa. Tämä johtuu siitä, että kiteytyäkseen vesi tarvitsee ns. kideytimiä, jotka usein ovat pieniä epäpuhtauksia. Kun vesi kiteytyy niin, että joukossa on myös muita molekyylejä, kutsutaan sitä heterogeeniseksi ydinmuodostukseksi. Homogeenisessä ydinmuodostuksessa kaikki molekyylit ovat puolestaan vesimolekyylejä. Heterogeeninen ydinmuodostus tapahtuu homogeenistä herkemmin. (Zachariassen & Kristiansen 2000.)

Kideytimien muodostumisen lisäksi vedessä tapahtuu kiteiden kasvua, jolloin kideytimiin liittyy lisää molekyylejä (Zachariassen & Kristiansen 2000). Lasimaisena jähmettynyt liuos voi myös muodostaa jäätä sulatuksen aikana, mikäli lämpötilan muutos ei ole riittävän nopea (Baudot, Alger & Boutron. 2000.) Vitrifikaatiossa jäädyttämistä kriittisempi vaihe on

itse asiassa sulattaminen, sillä kiivaimman kiteiden kasvun katsotaan tapahtuvan kideydinten muodostusta hieman korkeammassa lämpötilassa. Näin ollen mikäli jäädytysvaiheessa ytimiä ehtiikin muodostua, on sulattamisen tapahduttava niin nopeasti, että kiteiden kasvulta vältytään.

Kiteiden kasvun vaihe on solujen kannalta vaarallisempi kuin ydinten muodostuksen vaihe. Ydinten kasvu tapahtuu alkuun päästyään hyvin nopeasti, ja veden laajentuessa vauriot solurakenteisiin ovat hyvin todennäköisiä. Ydinten kasvun estäminen on siis kenties tärkein osa vitrifikaation onnistumista ja toipumisen mahdollistamista. Kideydinten muodostuminen ei aiheuta soluille samanlaista vahinkoa, kuin kiteiden kasvu. Silti, ilman kideytymiä ei kasvuakaan tapahtuisi. Näin ollen ydinten muodostus on osaltaan myös suuri riskitekijä vitrifikaatiossa. Mikäli edes toinen näistä vaiheista pystytään minimoimaan, on vitrifikaation onnistuminen mahdollista. Kumpaakaan vaihetta ei pystytä täysin eliminoimaan prosessista, mutta niitä voidaan estää erilaisilla jäänesto- ja suoja-aineilla.

Vitrifikaatiomenetelmää käytetään usein meristeemien, eli kasvupisteiden säilytykseen. Niissä solut ovat pieniä, aktiivisessa kasvuvaiheessa ja sisältävät vähän vakuoleja. Tämän vuoksi meristeemit kestävät hyvin kuivumista ja toipuvat pakastuksesta yleensä hyvin. (Engelman, 1998.)

4.2.2 Dehydraatiomenetelmä

Dehydraatiomenetelmässä silmujen kosteuspitoisuutta pienennetään kuivattamalla niitä laminaarin ilmavirrassa. Käsittely suoritetaan kapselointi-dehydraationa, jolloin silmuja käsitellään suojakapseliin upotettuina. Käsittelyaika on usein melko pitkä, mm. Fabren ja Dereuddren (1990) menetelmässä kuivatusaika on neljä tuntia. Varsinaisia käsittelyliuoksia ei dehydraatiossa ole. Ainoastaan esikasvatusalustoilta silmuihin imeytyvä sokeri toimii suojana jäätymistä vastaan menetelmän peruseräteen, ilmakeivauksen, lisäksi. Kuivatusaika on käsittelyssä muuttuja, joka pitää sovittaa jokaiselle lajille sopivaksi. Lajin lisäksi myös jokainen laminaari on erilainen. Kuivatusajan on siis oltava suhteutettu lajin lisäksi käytössä olevan laminaarin tehoon, sekä kulloinkin vallitsevaan ilmankosteuteen.

4.2.3 Kuivaus- ja esikasvatusmenetelmät

Dehydraation ja vitrifikaation lisäksi on käytössä myös kuivaus- ja esikasvatusmenetelmät. Kuivausmenetelmä perustuu kasvin osan kuivattamiseen ilmavirrassa, kuten dehydraatiosakin, mutta suojakapselia ei käytetä. Vesipitoisuuden tulee pienentyä todella alhaiseksi, noin 10 – 20 prosentin välille, jotta toipuminen olisi optimaalinen. Esikasvatusmenetelmä perustuu silmujen kasvatukseen alustoilla, joista ne imevät suoja-aineita pakastusta varten. Ennen pakastamista ei esikasvatuksen lisäksi muita käsittelyjä suoriteta. Näitä voidaan käyttää myös yhdessä esikasvatus-kuivatusmenetelmänä, mutta usein ne myös sisältyvät toisiinsa käsittelyihin, esim. esikasvatus ennen vitrifikaatiota. (Engelman 1998.)

4.2.4 Kapselointimenetelmät

Dehydraatiomenetelmässä silmut tai versonkärjet usein kapseloidaan. Puhutaan kapselointi-dehydraatiosta. Kapseli muodostuu algiinaattiliuoksen ja kalsiumdikloridin yhdistelmästä. Versonkärki tai silmu poimitaan pipettiin algiinaattiliuoksen mukana ja tipautetaan pisarana CaCl_2 -liuokseen. Jonkin ajan päästä kapselit kovettuvat helmiksi, joista jokaisen sisällä on yksi silmu tai versonkärki. (Fabre & Dereudre 1990.)

Myös kapselointi-vitrifikaatiota käytetään useille lajeille. Kapselointi tapahtuu kuten kapselointi-dehydraatiossakin, mutta käsittely suoritetaan vitrifikaatiomenetelmän mukaan.

4.2.5 Pisaramenetelmä

Vitrifikaatiosta voidaan myös käyttää pisara-vitrifikaatiomenetelmää (Shäfer-Menuhr, Müller & Mix-Wagner 1996). Tällöin kasvista otetut silmut tai versonkärjet säilötään vitrifikaatiomenetelmällä nestetyyppeen nimensä mukaisesti pisaran sisällä. Silmun sisäänsä sulkeva nestepisara muodostuu suojaavasta PVS2-liuoksesta, joka asetetaan foliosuikaleen päälle. Schäfer-Menuhrin, Müllerin ja Mix-Wagnerin menetelmässä folioliuska silmuineen jäädytetään suoraan nestetyyppeen, josta se siirretään nestetyypellä täytetyn kryosäilytysputken sisälle. PVS2-liuoskäsittely tehdään menetelmän mukaan jäähähteessä.

5 Tutkimuksen lähtökohdat

5.1 Perusteet pisara-vitrifikaatiomenetelmän tutkimiselle

Tutkimuksia kasvien kryosäilytyksestä on tehty vasta suhteellisen vähän. Tutkimukset ovat menetelmä- ja lajikohtaisia, ja niillä saavutetut menetelmät ovat usein käytettävissä sellaisenaan vain kyseiselle kasvilajille. Menetelmän valintaan vaikuttavat kasvi-lajin lisäksi mm. laboratorion käytännön toimintamahdollisuudet, kuten käytettävissä oleva laitteisto sekä menetelmän sopivuus jo käytössä oleviin kryosäilytystoimenpiteisiin. Lisäksi mm. dehydraatio- sekä vitrifikaatiomenetelmien peruslähtökohtana on toiminnassa oleva mikrolisäysmenetelmä. Laukaan toimipaikassa on käytössä jo aiemmin vadelmalle mukautettu pisara-vitrifikaatiomenetelmä, joten myös muiden kasvien osalta säilytysmenetelmä pyritään ensisijaisesti löytämään pisara-vitrifikaatiota käyttäen. Mansikan osalta säilytystä on aiemmin tutkittu vain kapselointi-vitrifikaatiomenetelmällä (Hirai, Shirai, Shirai & Sakai 1998) sekä perinteisellä hitaalla jäädytyksellä (Sakai, Yamakawa, Sakata, Harada & Yakuwa 1978; Kartha, Leung & Pahl 1980). Pisara-vitrifikaation osalta ei aikaisempia tutkimuksia ole tehty, joten tutkimuksen tarkoituksena oli myös selvittää onko mansikan säilyttäminen pisara-vitrifikaatiolla ylipäätään mahdollista.

5.2 Kokeiden pääpiirteet ja muuttujat

Ennen varsinaisten kokeiden aloittamista suoritettiin viiden esikokeen sarja, jolla haarukoiitiin optimaalisia käsittelyaikoja, silmujen kokoa sekä regeneraatioalustojen koostumusta.

Tutkimuksessa suoritettiin esikokeiden jälkeen 18 varsinaista koekertaa. Kokeiden lähtökohdat perustuivat esikokeista saatujen viitteiden lisäksi aikaisempaan tietoon mansikan kasvusta ja vaatimuksista sekä pisara-vitrifikaatiomenetelmään.

Kokeissa käytettiin mansikan lajikkeita 'Polka', 'Jonsok', 'Senga Sengana', 'Lina' ja 'Kent'. Lajikkeilla 'Korona' sekä 'Cavendish' suoritettiin kummallakin vain yksi koe käyttäen pistokoealustoja. Materiaali kokeisiin otettiin kylmäsäilytyksestä, MTT:n tuotannossa käytetystä mikrolisätystä valiokasviaineistosta. Mikroviljelmien esikasvatusalustojen valinta pohjautui tuotannossa jo käytössä olevaan alustakiertoon. Kiertoa pyrittiin mukailemaan, jotta saatujen tulosten vertaaminen nykyiseen tuotantoon olisi yksinkertaisempaa, ja ettei näistä seikoista aiheutuisi lisämuuttujia kokeisiin. Viljelmistä kokeisiin otetut silmut jakautuivat kokeiden sisällä ryhmittäin erilaisiin käsittelyihin, joita kertyi kaikkiaan 149 kappaletta (Liite 1).

Koemenettely oli valittuja muuttujia lukuun ottamatta jokaiselle käsittelylle samanlainen. Silmujen ottoa edeltänyt samoin kuin maljoilla tapahtunut esikasvatus olivat aina kestoltaan yhtä pitkiä sekä kasvualustoiltaan samoja. Kasvatusalustoina käytettiin jokaisessa vaiheessa Laukaan toimipaikalla jo käytössä olleita alustatyyppisiä. Silmujen otot, siirrot ja varsinaiset kokeet suoritettiin steriilisti laminaarissa. Myös välineistö ja liuokset olivat steriilejä, lukuun ottamatta nestetyppeä sekä vesihaudetta. Kahteen jälkimmäiseen silmuilla ei kuitenkaan ollut suojaamatonta kontaktia. Käsittelyille tehtiin myös kontrollit ilman nestetyppeä ja sulatusta (-LN).

Muuttujat

Kokeissa selvitettiin ensinnäkin optimaalista käsittelyaika PVS2-liuokselle. Käyttämällä eripituisia käsittelyaikoja pyrittiin selvittämään aika, joka olisi käsittelyä riittämätön, sekä aika, jolloin käsittely on ollut liian voimakas. Liuoksien käsittelyajat määriteltiin kokeissa hetkestä, jolloin koe-erän kaikki silmut olivat liuoksessa siihen asti, kun ensimmäinen silmu nostettiin pois liuoksesta. Näin ollen osalle silmuista toteutunut käsittelyaika oli todellisuudessa hiukan ilmoitettua pidempi.

Kokeissa pyrittiin myös löytämään kullekin lajikkeelle sopiva regeneraatioalusta. Pääosin kokeissa käytettiin valittuja neljää glukoosipohjaista alustaa, mutta osassa käsittelyistä kokeiltiin pistokokeenomaisesti näistä hyvin poikkeavia alustoja. Täysin hormonittomalla alustalla selvitettiin lisähormonin tarvetta ylipäättään silmujen sulatuksen jälkeisen kasvuun lähdön kannalta. Tuotannossa normaalisti meristeemialoitusten kasvualustana käytettyä ja siinä hyvin toimivaa alustaa (P) kokeiltiin myös tässä. P-alustalla kasvatettiin myös yksi täysin käsittelemätön erä, jonka perusteella voitiin todeta silmujen oton onnistuneen. Näiden lisäksi kokeiltiin yhtä fruktoosipohjaista alustaa, sekä hormonipitoisuuksiltaan huomattavasti muista poikkeavia glukoosi- ja sakkaroosialustoja. Pienien koe-erien kasvatusta kokeiltiin myös esi- ja jatkokasvatus-alustoilla. Käytetyt regeneraatioalustat selviävät käsittelyittäin tarkemmin liitteestä 1.

Myös muiden prosessin osien mahdollisia vaikutuksia tarkasteltiin pienimuotoisesti. Tällaisia kohteita olivat LS-liuoksen vaikutusaika, sulatuksen kesto vesihauteessa, Supercool X-1000TM-lisäaineen merkitys PVS2-liuoksessa ja erot kärki- ja hankasilmujen, sekä erikokoisten silmujen eloonjäämisen välillä.

6 Kokeiden suoritus ja vaiheet

6.1 Esikasvatus

Kokeisiin valituista lajikkeista aloitettiin mikroviljelmät aina kahdeksan viikkoa ennen kutakin suunniteltua koeajankohtaa. Versot otettiin kylmäsäilytyksestä alustalle D, jolla ne kasvoivat neljän viikon ajan. Tästä tuppaisi kasvaneet versot siirrettiin lisääntymisalustalle, josta neljän viikon kuluttua otettiin silmut kokeisiin.

Silmujen ottoa edeltäneeksi kasvatukseksi määriteltiin vastaava kasvatusrytmi, joka olisi ylläpidon mikroviljelmästä otetulla, tuotantoon otettavalla taimella. Kasvatusalustat ja -ajat olivat kussakin esikasvatusta edeltäneessä siirtovaiheessa normaalia lisäystä vastaavat.

6.2 Silmujen otto

Silmut, joiden sisällä säilytettävät meristeemit sijaitsevat, irrotettiin mikroversoista (Kuva 1) laminaarissa stereomikroskoopin, kirurgin veitsen ja pinsettien avulla. Silmut olivat pääosin kärkisilmuja, mutta myös hankasilmuja käytettiin muutamissa koe-erissä. Versoa kuorittiin lehti lehdeltä niin lähelle kasvupistettä, kuin oli meristeemiä vahingoittamatta mahdollista (Kuva 2), ja silmu leikattiin irti versosta. Kokeissa käytettiin kooltaan 0,5 - 3 mm:n silmuja (Kuva 3).

Mansikan osalta silmujen erottelu kärki- ja hankasilmuihin ei ole niin yksiselitteistä kuin monen muun kasvilajin kohdalla johtuen mansikan kasvutavasta. Silmuja, jotka voitiin epäilyksettä tulkita hankasilmuiksi, esiintyi käytetyissä viljelmissä varsin vähän. Ne olivat kooltaan pieniä ja olemukseltaan heiveröisiä. Tämän vuoksi kokeissa päädyttiin painottamaan kärkisilmujen osuutta, mutta hankasilmujen käytön mahdollisuutta päätettiin kuitenkin myös kokeilla.

6.3 Esikäsittely

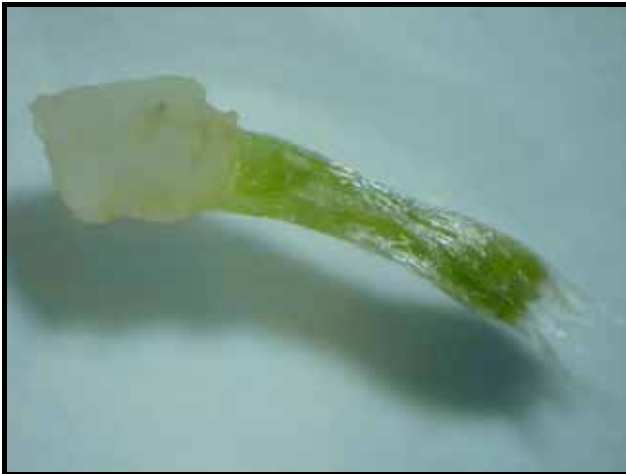
Silmut asetettiin kasvamaan petrimaljalle ensimmäiselle esikäsittelyalustalle (Kuva 4), jossa sokerikonsentraatio oli 0,25 M. Noin vuorokauden päästä silmut siirrettiin pitoisuudeltaan vahvemmalle alustalle ja tästä edelleen vuorokauden kuluttua viimeiselle ja vielä voimakkaammalle alustalle. Alustojen sokerikonsentraatio kasvoi asteittain jokaisen siirron yhteydessä. Sakkaroosimolaarisuudet käytetyillä alustoilla olivat 0,25 M, 0,50 M ja 0,75 M. Maljoja kasvatettiin 21 ± 3 ° C:n lämpötilassa kasvatushuoneessa, jossa valoisan ajan pituus vuorokaudesta oli 16 tuntia.



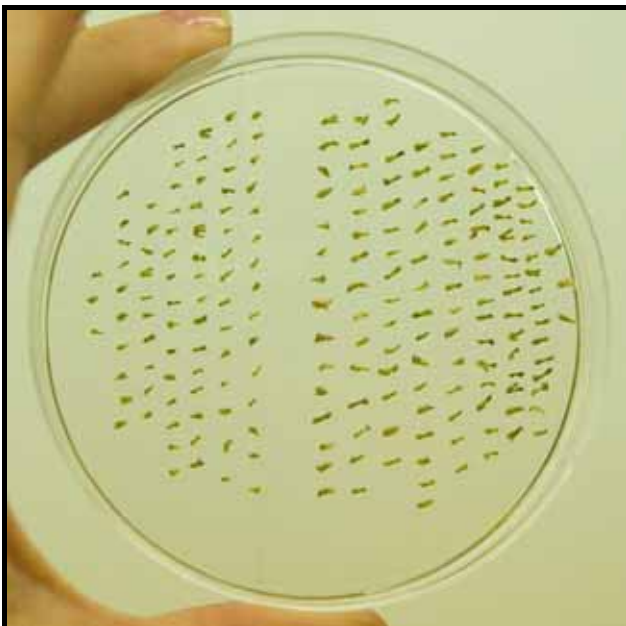
Kuva 1. Silmut otettiin mikroversoista.



Kuva 2. Silmu kuorittiin lehtien sisältä.



Kuva 3. Versosta irrotettu silmu.



Kuva 4. Silmut esikäsittelymaljalla.

Silmujen kasvatus sokeripitoisilla esikäsittelyalustoilla lisää niiden dehydraation sekä kylmyyden sietokykyä. Sokereilla on suurin vaikutus solumembraanien tasapainoon kuivumisen aikana. (Sakai 1998.) Esikäsittelyalustat sekä -ajat mukailivat Wangin (2004) vadelmalle kehittämän pisara-vitrifikaatiomenetelmän vastaavia. Taulukosta 1 ilmenee kunkin esikäsittelyalustan ainekoostumus.

Taulukko 1. Esikäsittelyalustojen koostumus litraa kohden.

	0,25 M	0,50 M	0,75 M
Murashige-Skoog-jauhe	4,30 g	4,30 g	4,30 g
Vitamiinit	10 ml	10 ml	10 ml
Sakkarosi	85,50 g	171,00 g	256,50 g
Myoinositoli	0,10 g	0,10 g	0,10 g
Gelriitti	2,60 g	2,60 g	2,60 g
pH	5,7 – 5,8	5,7 – 5,8	5,7 – 5,8

6.4 Vitrifikaatio ja käytetyt liuokset

Kokeissa käytetyt liuokset olivat huoneenlämpöisiä ja kaikki käsittelyt suoritettiin huoneenlämpötilassa. Tämä poikkeaa PVS2-liuoksen osalta useasta aikaisemmasta menetelmästä (mm. Wang ym. 2005, Hirai ym. 1998), joissa PVS2-liuoskäsittely on suoritettu aina jäähauteessa 0 ° C:n lämpötilassa. Silmut nostettiin pinseteillä liuoksiin, joita oli kaadettu pienille petrimaljoille. Halutun vaikutusajan jälkeen silmut nostettiin liuoksista imupaperin kautta seuraaviin liuoksiin ja lopuksi ilman imupaperikuivausta foliosuikaleelle pakastusta varten (Kuvat 5 ja 6). LS-liuoksessa silmuja käsiteltiin 20 - 40 minuuttia ja PVS2-liuoksessa 20 - 120 minuuttia. Foliot suljettiin kryosäilytysputkiin, jotka puolestaan upotettiin välittömästi nestetyppeen.



Kuva 5. Silmut nostettiin vitrifikaatioliuosten välillä imupaperille.



Kuva 6. Silmut laitettiin säilytysputkiin foliosuikaleen päällä.

Putkia pidettiin nestetyössä vähintään tunnin ajan, mutta useimpien kokeiden osalta tämä aika venyi useampaan tuntiin. Teoriassa kuitenkin oletetaan, että jo tunnin nestetyppisäilytys on verrattavissa pitkäaikaiseen säilytykseen ja että sen vaikutukset kasvisolukolle ovat verrattavissa vuosien säilytyksestä aiheutuneisiin vaikutuksiin. Nestetyöistä putket nostettiin nopeasti 40 ° C:n vesihauteeseen. Sulatuksen kestonä kokeiltiin yhtä, kolmea ja viittä minuuttia.

Sulatuksen jälkeen putket pintasteriloitiin laminaariin ja niihin pipetoitiin pesuliuosta. Foliosuikaleet poistettiin putkista ja pesuliuoksen annettiin vaikuttaa pimeässä 20 minuuttia.

Liuokset

Jokaisen käsittelynesteen pohjana on sakkaroosiliuos. Sokeria on löydetty suurina pitoisuuksina kylmien olojen kasveista ja eläimistä, joissa niiden on todettu toimivan suoja-aineina jäätymistä vastaan. Muun muassa pohjoisen sammakot pystyvät horroksen aikana osittain jäätyämään ja palautumaan tästä sokerikonsentraation nousun ansiosta. Sokerit suojaavat proteiineja ja solukalvoja jäätymiseltä, sekä sitovat niitä molekyylejä, jotka muodostavat jääkiteiden keskuksia. Kasveista yleisimmin löydetty sokeri on disakkaridi, sakkaroosi. (Conlon, Yano, Chartrel, Vaudry & Storey 1998.)

LS-liuos

Loading Solution -liuoksen, LS-liuoksen ainesosina ovat pääasiallisesti sokeri sekä glyseroli. Glyseroli on paljon käytetty kryosuojaa-aine, joka sekoittuu täydellisesti veteen ja alentaa jäätympistettä. Glyserolin suojaava vaikutus vaatii liuoksessa suuren konsentraation, mutta toisaalta sen on havaittu tällöin olevan usein muutoin vahingollista soluille. (Kashiwazaki, Okuda, Seitä, Hisamatsu, Sonoki, Shino, Masaoka & Inomata 2006.)

LS-liuoksen onkin ajateltu vaikuttavan eniten solujen vesipitoisuuden vähentymisestä aiheutuvaan sokerikonsentraation nousuun. Esikasvatusalustoilta imeytyneen sokerin suhteellinen määrä kasvaa veden vähentyessä soluista. (Sakai 1998.)

PVS2-liuos

Plant Vitrification Solution 2 -liuos eli PVS2-liuos (Sakai ym. 1990) sisältää glyserolin lisäksi dimetyylisulfoksidia, DMSO:ta sekä etyleeniglykolia. DMSO:ta käytetään usein vitrifikaatioissa, sillä sen vaikutus on nopea ja sen ominaisuus muodostaa liuoksista jähmettyessään lasimaista on suuri (Fahy, Levy & Ali 1987).

Jäänestoaineiden, lähinnä PVS-liuosten lisänä voidaan käyttää mm. solurakenteita suojaavia proteiineja. Tiettyjen proteiinien määrien on havaittu kasvavan luonnonvaraisissa kasveissa lämpötilan laskun myötä. Näiden käyttö lisäaineena on kuitenkin varsin kallista. 21st Century Medicine on kehittänyt synteettisen molekyylin, Supercool X-1000TM:n, joka toimii proteiinien tavoin vitrifikaatioliuosten lisäaineena, mutta on kustannuksiltaan huomattavasti niitä edullisempi. (Supercool X-1000TM, Enhanced Vitrification Performance. 2004; Panis 2006) Osassa tässä tutkimuksessa suoritetuista kokeista käytettiin Supercool X-1000TM:a PVS2-liuoksen lisäaineena ja tarkasteltiin sen vaikutusta silmujen toipumiseen. Supercoolin käyttöliuoksen vahvuus oli 0,1 %.

Pesuliuos

Nestetypestä otettaessa silmut sulatetaan vesihauteessa. Tällöin PVS2-liuos, josta muodostuvien pisaroiden sisään silmut pakastettaessa laitettiin, alkaa jälleen vaikuttaa. Liuoksen vaikutus keskeytetään pesuliuksella, joka laimentaa PVS2-liuoksen pitoisuuden niin pieneksi, että sen vaikutus silmuissa lakkaa. Pesuliuksena käytettiin 1 molaarista sakkaroosiliuosta, IMS-liuosta.

6.5 Regeneraatio

Lopuksi silmut nostettiin pesuliuksesta imupaperin kautta petrimaljoille regeneraatioalustoille. Maljoja kasvatettiin 21 ± 3 ° C:n lämpötilassa kasvatushuoneessa ja ne peitettiin valolta ensimmäisten kolmen vuorokauden ajaksi. Valolta suojaaminen pehmentää siirtymistä kasvukauteen sulatuksen jälkeen. Ensimmäiset tulokset havainnoitiin maljoilta viikon kuluttua kokeesta ja havainnointia jatkettiin viikoittain neljän viikon ajan. Tämän jälkeen havainnointiväliä pidennettiin kahteen viikkoon.

Kokeiden jälkeisiksi kasvualustoiksi valittiin neljä hieman toisistaan poikkeavaa alustaa. Jokainen niistä on glukoosipohjainen, ja toisistaan ne erosivat vain BAP:n (bentsylaminopuriini) ja IBA:n (indoli-3-voihappo) määrien suhteen. Taulukosta 2 ilmenevät alustojen koodit ja ainemäärät litraa kohden. BAP:n ja IBA:n perusliukset olivat pitoisuudeltaan 100 mg/l.

6.6 Jatkokasvatus

Kokeiden tuloksia seurattiin ensin viikon välein ja myöhemmin kahden viikon välein. Siirrot uusille alustoille tehtiin aina neljän viikon välein. Siirtoajankohtaan mennessä versoon-tuneiksi lasketut silmut siirrettiin erlenmeyer-pulloihin, joissa kasvualusta oli sama kuin kokeen jälkeisellä regeneraatiomaljalla. Versomattomat silmut siirrettiin uudelle maljalle, jossa kasvualusta oli myös sama. Erlenmeyereista versot siirrettiin neljäviikkoisina foliokantisiin kasvatuspurkkeihin, joissa kasvu-aika oli jälleen neljä viikkoa. Tämän jälkeen versoja kasvatettiin vielä viimeiset neljä viikkoa suuremmissa kasvatuspurkeissa (hillopurkki), jonka jälkeen tupaat jaettiin ja laskettiin.

Taulukko 2. Regeneraatioalustojen koostumus litraa kohden. BAP:n ja IBA:n käyttöliuosten vahvuudet olivat 100 mg/l.

	A	B	C	D
Glukoosi	30 g	30 g	30 g	30 g
Myoinositoli	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
75 % ABKN	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Rauta	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
C-10	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
E-knopp	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Vitamiinit	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
BAP	1 ml	2,5 ml	5 ml	7,5 ml
IBA	0,5 ml	1,25 ml	2,5 ml	4 ml
Agar	7,75 g	9 g	9 g	7,75 g
Bactopeptone	0,27 g	0,27 g	0,27 g	0,27 g
pH	5,0	5,0	5,0	5,0

7 Tulokset

7.1 Yleiset havainnot

Jo esikokeiden myötä saatiin todisteita pisara-vitrifikaatiomenetelmän käytön mahdollisuudesta mansikan säilytykseen. Tämä tulos vahvistui varsinaisten kokeiden myötä. Silmujen eloon jääminen, joka oli jopa odotettua parempi, osoittaa sen, että pisara-vitrifikaatio on mahdollista optimoida mansikalle sopivaksi. Käytännön kannalta kuitenkin pelkkä silmujen eloon jääminen ei ole tuloksena riittävä. Aktiivisessa käytössä menetelmän tulisi tuottaa riittävä määrä myös versoja ja jakautuvia viljelmiä. Myös näitä saavutettiin vaihtelevasti erilaisilla koekäsittelyillä.

7.1.1 Kontaminaatiot

Pisara-vitrifikaatio menetelmänä ei ollut altis kontaminaatioille. Kokeissa vähäisesti ilmenneet bakteerit ja homeet johtuivat maljoilla pääosin jälkikontaminaatioista, ja ilmenivät vasta vanhoilla tyhjillä maljoilla. Kasvatuspurkeissa kontaminaatioita esiintyi normaaliin tuotantoon verrattavasti, tai vähemmän. Kokeissa käytetyt epästeriilit vesihaude ja neste-typpi eivät lisänneet kontaminaatioiden määrää, ja näiden aikana silmut olivatkin suojattuina steriilisti säilytysputken sisään.

7.1.2 Lajike-erot

Kokeet toivat esiin eri lajikkeiden väliset huomattavat erot. Lajikkeista 'Polka' oli melko sopeutuvainen useampiin käsittelyihin. Se myös versoontui paremmin kuin muut. Vaikka muidenkin lajikkeiden silmujen eloonjääminen oli ainakin paikoitellen melko onnistunutta, eivät silmut kuitenkaan jaksaneet versoa yhtä hyvin. Kokeiden jälkeinen eloonjääminen oli puolestaan heikointa 'Linan' ja 'Kentin' kohdalla, jolloin luonnollisesti myös versoontuminen jäi vähäiseksi.

7.2 Eloojääminen

Kokeissa ilman nestetyppeä käsitellyt kontrollierät jäivät eloon lähes sataprosenttisesti. Tämä osoittaa, että pelkästään käsittelyaineiden vaikutus ei käytetyillä käsittelyajoilla ollut liian voimakas tai myrkyllinen silmuille. Tyydestä tulleista koe-eristä voitiin puolestaan havaita kasvua jokseenkin vaihtelevasti. Pääpaino on kuitenkin selkeästi 50 prosentin paremmalla puolella, sillä kaikista 102:sta + LN koe-eristä vain kahdeksassa eloonjäämisprosentti oli 50 tai huonompi neljän viikon kuluttua kokeesta. Kasvuun lähtöön kuluvat ajat erosivat koe-erien ja kontrollien välillä. Kontrollit aloittivat kasvunsa voimakkaasti jo ensimmäisen viikon kuluessa, kun taas vastaavissa koe-erissä uusia kasvun aloittavia silmuja havaittiin vielä kolmen, neljän viikon kuluttua.

Taulukosta 3 ilmenevät koe-erien määrät kokeissa eloonjääneiden silmujen prosentuaalisen määrän suhteen. Prosenttiosuus on laskettu tilanteesta, jolloin kokeesta on kulunut neljä viikkoa. Taulukosta on selkeästi luettavissa huomattavasti suurimman osan koe-eristä jääneen eloon yli 80-prosenttisesti. Myös nestetypellä käsitellyistä koe-eristä yli puolet jäi eloon vähintään 80-prosenttisesti. Kokeissa eriä oli yhteensä 149 kappaletta, joista nestetypikkäsittelyn (+LN) sai 102 kappaletta. Tarkempi kuvaus koe-eristä ilmenee liitteestä 1 ja kasvuun lähdöistä liitteestä 2.

Taulukko 3. Koe-erien määrät silmujen eloonjäämisprosentin mukaan jaoteltuna neljän viikon kuluttua kokeista.

Silmuista elossa	Koe-erien määrä yht.	Joista +LN
0,0 – 50,0 %	8	8
50,1 – 79,9 %	18	18
80,0 – 99,9 %	37	34
100 %	86	42

7.3 Versoontuminen

Kokeissa versoontuneiksi silmuiksi luokiteltiin ne silmut, joissa havaittiin vähintään kahden silmusta kehittyvän uuden lehden kasvu, ja jotka näin ollen siirrettiin maljalta jatkokasvatukseen. Nestetypestä sulatettujen silmujen versoontuminen oli vaihtelevaa, ja näin oli myös versojen jakautumisen osalta. Osasta versoja saatiin reilusti yli sata jaettua versoa, mutta myös usein saanto jäi pariin kymmeneen, jopa ainoastaan yhteen versoon. Nestetyypessä käyneistä eristä kuitenkin yli puolet versoontuivat yli 25-prosenttisesti. Kontrollieris-

sä versoontuminen oli hieman parempaa. Kaikkiaan eristä vain muutama versoontui yli 80-prosenttisesti, ja näistä vain kaksi oli + LN koe-eriä. Taulukosta 4 selviävät koe-erien lukumäärät versoontuneiden silmujen prosentuaalisen määrän mukaan. Liitteessä 3 on eritelty versoontuneiksi luetut silmut käsittelyittäin tarkemmin.

Taulukko 4. Koe-erien määrät silmujen versoontumisprosentin mukaan jaoteltuna. Luvuissa ovat mukana kaikki kokeiden aikana saadut versot.

Versoontuneita	Koe-erien määrä yht.	Joista +LN
0,0 %	21	17
0,1 – 25,0 %	28	22
25,1 – 50,0 %	51	38
50,1 – 80,0 %	38	23
80,1 – 99,9 %	8	2
100 %	3	0

Versoontuneita silmuja kerättiin jatkokasvatukseen noin kolmen kuukauden ajan kunkin kokeen jälkeen. Tämän ajan jälkeen vielä kenties elossa olevien silmujen versoontumisen todettiin olevan hyvin epätodennäköistä, joten siirtoa maljoilta ei enää suoritettu. Silmujen yleistä kuntoa ja todennäköisyyttä silmujen versoontumiselle havainnoitiin tapauskohtaisesti kokeiden jälkeen. Mikäli toivoa versoontumisesta ei todettu olevan, tai mikäli silmut olivat selkeästi taantumassa, lopetettiin koe jo ennen kolmen kuukauden kestoja. Silmut, joista versoontumista ei havaittu, kasvattivat runsaasti kallussolukkoa, joka pysyi eloisana läpi kokeen havainnoinnin ajan.

Täysin versoontumattomat käsittelyt

Taulukossa 4 esiintyvistä täysin versoontumattomista koe-eristä suurin osa koostuu niistä käsittelyistä, joiden regeneraatioalustana käytettiin ns. pistokoealustoja. Näistä eristä odotettu tulos olikin yleistä tulosta huomattavasti heikompi tai vaihtoehtoisesti hieman parempi. Pistokoealustoilta toivottu tulos oli joka tapauksessa normaalista kasvusta selkeästi poikkeava suuntaan tai toiseen. Lähes kaikki pistokoealustat tuottivat suhteellisen huonon tuloksen versoontumisen suhteen. Niiltä ei myöskään saatu jakautuvia viljelmiä yhtä paljon kuin eristä, joissa käytettiin varsinaisia koealustoja.

Taulukossa 5 on eritelty pistokoealustojen mukaan keskimääräinen eloonjäämisprosentti sekä versoontuminen, niin nestetyypessä käyneiden, kuin kontrollierienkin osalta. Eloonjäämisprosentti on laskettu tilanteesta, jolloin kokeesta on kulunut neljä viikkoa. Versoontuminen on puolestaan määritelty koko kokeen keston ajalta, ja siihen on laskettu kaikki kokeen aikana versoontuneiksi lasketut silmut. Tarkemmat tiedot käsittelyittäin selviävät liitteistä 2 ja 3.

Taulukko 5. Pistokoealustoilta saadut eloonjäämis- ja versoontumisprosentit. Eloojäämisprosentti on määritelty neljän viikon kuluttua kokeista. Versoontumisprosenttiin on laskettu kaikki kokeen aikana saadut versot.

	Eloojäämisprosentti		Versoontuminen	
	+ LN	- LN	+ LN	- LN
E	81,7 %	100 %	20,0 %	57,5 %
F	51,7 %	100 %	34,5 %	72,5 %
G	56,3 %	100 %	0 %	0 %
H	53,8 %	80,0 %	0 %	0 %
I	93,8 %	100 %	38,8 %	45,5 %
J	57,5 %	100 %	0 %	30,0 %
K	57,5 %	100 %	0 %	20,0 %
L	68,4 %	100 %	36,8 %	80,0 %
M	65,0 %	100 %	15,0 %	45,5 %
N	100 %	100 %	40,0 %	90,0 %
O	92,5 %	-	40,0 %	-

Näiden alustojen lisäksi kokeiltiin myös tuotannossa käytettyä aloitusalustaa (P) yhdellä + LN erällä. Sen osalta sekä eloonjäämisprosentti, että versoontuminen olivat 0 %. Ilmoituksesta 21:stä täysin versoontumattomasta koe-erästä pistokoealustoilla olleiden osuus on 16 kappaletta.

Jäljelle jääneitä versoontumattomia koe-eriä yhdistävä tekijä on lajike. Näissä viidessä täysin versoontumattomassa erässä koelajike on kaikissa ollut 'Jonsok'. Muutoin koe-erät sijoittuvat eri kokeisiin ja ovat käsittelyiltään erilaisia.

7.4 Viljelmät

Kaikki versoontuneiksi lasketut silmut eivät säilyneet elossa jatkokasvatuksesta. Tämän vuoksi lopullisessa viljelmien jakovaiheessa jaettavia versoja oli versoontuneiksi laskettuja vähemmän. Versojen kuolemiseen on monia syitä, kuten esimerkiksi versojen siirtäminen suurempaan kasvatuspurkkiin liian pieninä. Yksi vaikuttava tekijä on myös versoontuneeksi tulkitsemisen eroavuudet. Osa silmuista sisälsi vain ns. lehtiaiheen, josta regeneraatiovaiheessa alkoi kehittyä lehti. Lehden kehittymisen jälkeen tällainen silmu kuitenkin lopetti kasvunsa ja kuoli nopeasti. Lehden kasvun aikana silmu on kuitenkin helppo tulkita versovaksi, ja siirtää sen myötä jatkokasvatukseen.

Huolimatta versojen vähentymisestä jatkokasvatuksen aikana, kokeista saatiin kaikkiaan melko runsaasti viljelmiä. Kun pistokoealustoilla olleet koe-erät jätetään tarkastelun ulkopuolelle, nestetyössä käyneistä 71:stä + LN erästä vain 10 oli sellaisia, joista jaettavia versoja ei saatu lainkaan. Pistokokeiden osalta kaikkiaan 31:stä + LN koe-erästä 16 oli sellaisia, joista ei saatu ainuttakaan versoa eikä näin ollen myöskään viljelmiä.

Kontrollierät

Lähes kaikki kontrollierät (- LN) lähtivät hyvin kasvuun ja niistä saatiin lähes poikkeuksetta tulokseksi hyvin jakautuvia viljelmiä. Näitä kontrolliviljelmiä havainnoitiin silmämääräisesti ja niiden todettiin noudattavan normaalia kasvutapaa ja lisääntymismäärää. Versoja ei niiden kohdalla laskettu yksitellen, sillä tämä olisi ollut turhan työlästä ja aikaa vievää, kontrollieristä kun viljelmät saatiin miltei jokaisesta silmusta.

Hyvin jakautuvat viljelmät

Kokeissa pyrittiin saavuttamaan menetelmä, jolla nestetypestä sulatetuista silmuista saataisiin jokaisesta pakastetusta erästä vähintään kolme hyvin jakautuvaa viljelmää. Tavoitteena oli myös, että säilytyserien suuruus olisi korkeintaan 20 silmua.

Hyvin jakautuvaksi viljelmäksi kokeessa määriteltiin ne viljelmät, jotka jaettaessa ylittävät niille määritellyn jakautumiskertoimen. Jakautumiskerroin on tuotannossa toteutuva jakautumiskeskisarvo, joka ilmoittaa yhdestä versosta keskimäärin saatujen versojen määrän. Jokaiselle lajikkeelle on oma jakautumiskertoimensa ja ne poikkeavat toisistaan huomattavasti. Taulukosta 6 selviävät tuotannon jakautumiskertoimet lajikkeittain. Luvut kuvastavat tavallaan myös lajikkeiden vaatiman työstön määrää. Esimerkiksi 'Polkasta' saadaan lähes viisinkertainen versomäärä 'Kentiin' nähden, jolloin 'Kentiä' on jaettava useamman kerran tai lähtöaineiston on oltava suhteessa suurempi.

Taulukko 6. Mansikan jakautumiskertoimet tuotannossa lajikkeittain. Keskimääräiset jakautumiskertoimet vuonna 2006.

Polka	Senga Sengana	Jonsok	Lina	Kent
30,68	23,72	18,56	15,67	6,78

Jakautumiskertoimet perustuvat aktiivisen jakamisen myötä saatuihin lukumääriin, kun taas kokeissa silmuista saatuja versoja ei jaettu tarkoituksella yhdessäkään siirtovaiheessa. Useampana tuppaana käsiteltiin vain niitä versoja, jotka jakautuivat ja lohkesivat itsenäisesti useampaan osaan. Koeversojen aktiivinen jakaminen jätettiin tekemättä, sillä tarkoitus oli selvittää saadaanko pisara-vitrifikaatiomenetelmällä säilytetyistä mansikoista ylipäättään viljelmiä. Saadun materiaalin jakaminen olisi lisännyt kokeen tilan tarvetta kohtuuttomasti ja aiheuttanut todennäköisesti tulosvirheitä jakautumisen laskussa.

Koska normaalia taimituotantoa vastaavia jakoja ei suoritettu, ei kokeista saatuja versomääriä voida myöskään verrata tuotannon määriin. Kokeissa saadut viljelmät luokiteltiin kolmeen ryhmään saatujen versomäärien mukaan niiden keskinäisen vertaamisen helpottamiseksi. Ei jakautuvien ryhmään sijoittuvat ne viljelmät, joista on yhdestä versosta saatu versoja alle 50. Hyvin jakautuviksi on määritelty viljelmät, joissa silmu on tuottanut 100 versoa tai enemmän. Näiden kahden luokituksen väliin jäävät jakautuvat viljelmät. Kokeissa käsittelyille laskettiin jakautumiskeskisarvo suhteessa käsittelyn silmujen kokonaismäärään, sekä keskimääräinen jakautuminen käsittelystä saaduille viljelmille. Käsittelyiden viljelmiä ei tarkasteltu yksittäisinä, sillä jokaisesta viljelmästä ei laskettu tarkkaa jakoversojen määrää. Tuloksia on siis käsitelty käsittelyiden keskimääräisten arvojen perusteella.

Yksittäiset viljelmät

Kokeissa havaittiin edellisen määrityksen mukaan luokiteltuna vain vähän ei jakautuvia viljelmiä. Hyvin suuri osa viljelmistä, jotka ylipäätään jakoutuivat suhteellisen normaalisti, olivat luokiteltavissa hyvin jakautuviksi. Taulukkoon 7 on koottu käsittelyn keskimääräisen jakautumiskertoimen mukaan ei jakautuviin, jakautuviin ja hyvin jakautuviin kuuluvien + LN käsittelyiden määrät. Keskimääräinen jakautumiskerroin ilmoittaa käsittelystä saatujen viljelmien jakautumisen keskiarvon. Taulukosta 7 ilmenee myös näistä saatujen viljelmien kokonaiskappalemäärä. Mukaan ei ole laskettu pistokoealustoilla olleita koe-eriä eikä niitä koe-eriä, joista jakoon ei saatu yhtään versoa.

Taulukko 7. Käsittelyiden määrät saatujen viljelmien jakautumiskeskiarvon mukaan luokiteltuna sekä niistä saatujen viljelmien määrät. Mukana eivät ole pistokoealustoilla olleet erät eivätkä ne koe-erät, joista jakoon ei saatu yhtään versoa.

	Käsittelyitä (+ LN)	Saatuja viljelmiä (kpl)
Ei jakautuvia,		
jakautumiskeskiarvo < 50 kpl	5	21
Jakautuvia,		
jakautumiskeskiarvo 50 - 99 kpl	23	92
Hyvin jakautuvia,		
jakautumiskeskiarvo \geq 100 kpl	33	111

Viljelmien luokittelu suhteessa käsittelyihin silmuihin

Verrattuna saatujen viljelmien jakautumiskeskiarvoon, käsittelyn optimaalisuutta kuitenkin kuvastaa paremmin viljelmien jakautumisen keskiarvo suhteutettuna käsittelyssä olleiden silmujen lukumäärään. Taulukon 7 luvut eivät kuvasta millään tavalla sitä todennäköisyyttä, jolla käsittelystä ylipäätään saadaan viljelmiä. Näin ollen 20 silmun käsittely, josta saadaan yksi hyvin jakautuva viljelmiä, voi saada korkeamman keskimääräisen jakautumiskertoimen, kuin kymmenen silmun käsittely, josta saadaan yhdeksän normaalisti jakautuvaa viljelmiä. Taulukossa 8 käsittelyt on luokiteltu käsittelyn kokonaissilmumäärään suhteutettujen viljelmien jakautumiskeskiarvon mukaan. Arvo on laskettu jakamalla kaikkien käsittelystä saatujen viljelmien jakojen jälkeinen kokonaisversomäärä käsittelyn alkuperäisellä silmumäärällä. Tämän määrittelyn mukaan suurimmasta osasta + LN koe-eriä saadaan yhtä silmua kohti lopullisen jaon jälkeen keskimäärin 20 - 50 versoa. Tarkemmin käsittelyistä saadut viljelmät sekä niiden jakautuminen selviävät liitteestä 3.

Taulukko 8. Käsittelyiden määrät käsittelyn kokonaissilmumäärään suhteutetun viljelmien jakautumiskeskisarvon mukaan luokiteltuna. Luvuissa ovat mukana kaikki + LN koe-erien silmut.

Jakautumiskeskisarvo	Käsittelyitä (+ LN)	Saatuja viljelmiä (kpl)
< 20	13	23
20 - 50	33	130
< 50	15	71

Keskimääräinen jakautumiskerroin

Jokaisesta koe-erästä saaduille viljelmille laskettiin keskimääräinen jakautumiskerroin. Se kuvastaa yhdestä kyseisen käsittelyerän versosta saatavien jakoversojen määrää. Taulukossa 9 on ilmoitettu lajikkeittain prosentuaalinen todennäköisyys sille, että kokeissa käytettyä silmusta saadaan viljelmiä, sekä kaikkien saatujen viljelmien keskimääräinen jakautumiskerroin. Luvuissa ovat mukana vain nestetyypessä olleet (+ LN) käsittelyt, eikä niihin sisälly pistokoealustoille laitettut erät.

Taulukko 9. + LN käsittelyistä saatujen viljelmien keskimääräinen todennäköisyys ja jakautuvuus lajikkeittain. Lukuihin eivät sisälly pistokoealustoilla olleet erät.

Lajike	Viljelmän todennäköisyys	Keskimääräinen jakautumiskerroin
Polka	41,4 %	112,7
Senga Sengana	18,5 %	140,0
Jonsok	20,6 %	115,2
Lina	15,0 %	185,9
Kent	25,0 %	86,8

Saatujen tulosten mukaan esimerkiksi 'Polkan' kymmentä käsiteltyä silmua kohti saadaan noin neljä viljelmiä. Tällaisesta viljelmästä saadaan jakamalla keskimäärin 113 versoa. 'Linan' käsitellyistä silmuista viljelmiä saadaan puolestaan noin kolmesta silmusta jokaista 20 silmun erää kohti. Jaon jälkeen näistä viljelmistä saadaan kustakin keskimäärin 186 versoa. Näin siis 'Polkasta' saataisiin viljelmiä todennäköisemmin kuin 'Linasta', mutta 'Linan' viljelmistä saatu versomäärä olisi suurempi kuin 'Polkan' vastaava. Näiden kahdenkin arvon perusteella lajikkeita voidaan vertailla, mutta kokonaisvertailu on helpompaa yhden arvon perusteella.

Kertomalla kunkin lajikkeen keskimääräisen jakautumiskertoimen viljelmän saamisen todennäköisyydellä saadaan viitteelliset, mutta helpommin keskenään verrattavat arvot. Nämä arvot kuvastavat keskimääräistä jakokerrointa, kun se suhteutetaan kaikkiin kokeissa olleisiin kyseisen lajikkeen silmuihin, toisin sanoen sitä, kuinka monta versoa käsittelystä saadaan yhtä käsiteltyä silmua kohti. Luvut on esitetty seuraavassa taulukossa (Taulukko 10).

Taulukko 10. Lajikkeiden silmumäärään suhteutetut keskimääräiset jakokertoimet. Lajikkeiden keskimääräiset jakautumiskertoimet suhteutettuna viljelmän saamisen todennäköisyyteen.

Polka	Senga Sengana	Jonsok	Lina	Kent
46,7	25,9	23,7	27,9	21,7

'Polkan' kohdalla esimerkiksi jokaista käsiteltyä silmua kohden saatiin keskimäärin 47 versoa. 'Linan' silmuista saatiin puolestaan keskimäärin 28 versoa. Kaikkia edellä olleita lukuja ja taulukoita verratessa on kuitenkin huomioitava se, että kokeissa käytettiin eri määrät kunkin lajikkeen silmuja. Pienemmällä otannalla on todennäköisyyden määrittäminen kyseenalaisempaa kuin laajemman materiaalin osalta. Lajikkeista 'Polkaa' käytettiin kokeissa selkeästi eniten ja 'Kenttä' vähiten.

7.5 Muuttujien merkitys

7.5.1 Silmut

Kokeissa käytettiin 1 - 4 millimetrin hanka- ja kärkisilmuja. Pienimmät silmut, 1 - 2 mm, eivät selviytyneet käsittelyistä yhtä hyvin kuin isommat silmut, mutta niiden käyttöä ei ole syytä pois sulkea. Kokeissa 1 - 2 mm silmuja käytettiin vain kahden lajikkeen, 'Polkan' ja 'Linan', kohdalla. Sekä eloonjäämisprosentista että versoontumisesta oli selkeästi luettavissa 'Polkan' menestyvän yleisesti paremmin myös pienempiä silmuja verratessa. 'Polkalla' tehdyistä 1 - 2 mm silmujen käsittelyistä saatiin useampia jakautuvia viljelmiä, kun puolestaan 'Linan' vastaavan kokoisista silmuista ei saatu yhtäkään versoa. Tulosten perusteella kummankin osalta on kuitenkin todettavissa, suurempiin silmuihin verrattaessa, lyhyemmän PVS2-liuoksen käsittelyajan olevan pienille silmuille parempi. 1 - 2 mm silmujen osuus kokeissa oli kuitenkin melko suppea, joten niistä saatujen tulosten perusteella tehdyt johtopäätökset ovat vain viitteellisiä.

Eroja 2 - 4 mm silmujen selviytymisen välillä ei merkittävästi ilmennyt, mutta 2 - 3 mm silmujen käyttöä puoltaa suurelta osin niiden suuri saanto silmujenottovaiheessa. Hanka- ja kärkisilmuja verrattaessa hankasilmut kestivät käsittelyjä kärkisilmuja heikommin.

7.5.2 PVS2-liuoksen käsittelyaika

PVS2-liuoskäsittelyn kestoina kokeissa käytettiin aikoja 20 minuutista 120 minuuttiin. Käytetty kahden tunnin käsittelyaikakaan ei tappanut silmuja, joten pidempikin käsittely olisi tarpeen vaatiessa mahdollinen. Käytännössä näin pitkät käsittelyajat eivät kuitenkaan olisi toivottavia. Eloon jäämisen suhteen paras käsittelyaika oli 45 minuutin ja 80 minuutin välillä, kun käytettiin 2 - 3 mm:n kärkisilmuja. Versoontumisen kannalta paras käsittelyaika on tulosten perusteella 45 - 60 minuuttia.

7.5.3 Regeneraatioalustat

Kokonaisvaltaisesti silmujen eloonjääminen oli runsainta alustoilla B ja C. Nämä alustat sopivat keskimäärin parhaiten jokaiselle lajikkeelle. A ja D alustat eivät yleisen eloonjäämisen suhteen poikenneet suuresti edellä mainituista, mutta niiden kohdalla havaittiin enemmän vaihtelua lajikkeiden kesken. Pistokokeina testatut erikoisemmat alustat eivät

tuottaneet positiivisia yllätyksiä. Kasvu oli näillä alustoilla lähes poikkeuksetta huonompaa kuin kokeisiin valituilla neljällä alustatyypillä. Versoontumista ja eloonjäämistä pistokoealustoilla on tarkasteltu versoontumisen yhteydessä.

Taulukosta 11 ilmenevät lajikkeittain eri koealustoilla saadut keskimääräiset eloonjäämis- sekä versoontumisprosentit. Luvut ovat keskiarvoja kaikista lajikkeen kyseisellä alustalla kasvatettujen + LN koe-erien tuloksista. Jokaista alustaa ei kokeiltu kaikille lajikkeille, mikä näkyy myös taulukosta.

Regeneraatioalustoja käytettiin kokeissa vaihtelevasti. Osaa alustoista käytettiin useammassa kymmenessä käsittelyssä, kun toisille toistoja kertyi alle kymmenen. Tämä on huomiotava verrattaessa alustoihin liittyviä tuloksia toisiinsa. Selkeästi kaikkiaan käytetyimmät alustavaihtoehdot olivat B ja C.

Taulukko 11. Eloonjääminen ja versoontuminen koealustoilla lajikkeittain. Eloonjääminen on laskettu neljän viikon kuluttua kokeista. Versoontumisprosentissa ovat mukana kaikki kokeen aikana saadut versot.

		Polka	Senga Sengana	Jonsok	Lina	Kent
A	Eloonjääminen	93,3 %	90,0 %	-	-	70,0 %
	Versoontuminen	51,2 %	27,5 %	-	-	45,0 %
B	Eloonjääminen	90,7 %	97,5 %	96,7 %	95,0 %	-
	Versoontuminen	49,9 %	32,5 %	30,0 %	18,3 %	-
C	Eloonjääminen	85,7 %	92,4 %	97,8 %	-	-
	Versoontuminen	42,2 %	46,4 %	31,1 %	-	-
D	Eloonjääminen	70,3 %	97,5 %	-	-	70,0 %
	Versoontuminen	35,8 %	32,5 %	-	-	30,0 %

7.5.4 Supercool

Supercoolin (Supercool X-1000TM, 21st Century Medicine, USA) lisääminen PVS2-liuokseen ei havaittu tuottavan merkittäviä muutoksia silmujen eloonjäämiseen verrattaessa ilman Supercoolia käsiteltyihin + LN koe-eriin. Vastaavasti kontrollierien suhteen ei havaittu Supercoolin lisäävän PVS2-liuoksen haitallisuutta.

Silmujen eloonjäämisprosentti vastasi pääosin tavallisella PVS2-liuoksella käsiteltyjen kontrollierien eloonjäämisprosenttia, joskin osassa käsittelyistä havaittiin hieman suurempi eloonjäämisprosentti, kuin vastaavassa tavallisella PVS2-liuoksella käsitellyssä koe-erässä. Ominaisuus ei kuitenkaan ollut selkeästi toistuva, joten pelkästään näiden kokeiden perusteella ei Supercoolin hyödyistä voi luotettavaa arviota tehdä.

Myöskään versoontumisen tai saatujen viljelmien suhteen ei pystytty osoittamaan Supercoolin vaikutuksia versojen kasvuun. Niin versoontuminen, versojen määrä ennen jakoa kuin viljelmistä saatu versomäärä mukailivat ilman Supercoolia tehdyistä vastaavista käsittelyistä saatuja määriä.

7.5.5 Latausaika ja sulatuksen kesto

Sekä latausliuoksen käsittelyajan että sulatuksen keston vaikutusten havainnointiin käytettyjen koe-erien määrät olivat hyvin suppeita. Tuloksien perusteella LS-liuoksen käsittelyajan merkityksestä ei voida vetää johtopäätöksiä. Sulatuksen kestolla puolestaan ei todettu olevan kokeiltujen yhden, kolmen ja viiden minuutin välillä juurikaan eroja. Mutta koska lyhyemmälläkin sulatusajalla saatiin menestyviä silmuja ja versoja, voidaan todeta viiden minuutin sulatuksen olevan tarpeettoman pitkä.

7.6 Menetelmäehdotus

Tulosten perusteella voidaan ilmoittaa käyttöön soveltuvan menetelmän muuttujat. Jokaiselle lajikkeelle ei pyritä löytämään omaa optimaalista menetelmää, vaan kaikille yhteinen, riittävän tehokas menetelmä. Suoritettujen kokeiden perusteella tällaisen menetelmän LS-liuoksen käsittelyaika on 30 minuuttia, PVS2-liuoksen käsittelyaika on 45 - 60 minuuttia ja 1 M S-liuoksen vähintään 20 minuuttia. PVS2-liuoksessa ei Supercool ole välttämätöntä. Sulatus suoritetaan 40 ° C:n lämpöhauteessa ja se on kestoltaan 3 minuuttia. Regeneraatioalustana käytetään B tai C alustaa.

8 Tulosten tarkastelu

8.1 Suoritus ja saadut tulokset

Ensimmäisistä kokeista lähtien eloonjäämisen tuloksia havainnoitiin viikoittain, ja pohdittiin muutoksia seuraaviin suoritettaviin kokeisiin. Kontrollieriin verraten koe-erät näyttivät pääosin huonokuntoisilta, eikä versoontuminen näyttänyt kovinkaan todennäköiseltä. Kuitenkin pikkuhiljaa koe-eristä alettiin saada versoja jakoon asti, jolloin niiden määrä yllätti melkoisesti. Tuloksena totesimme koe-erien lähtevän kasvuun huomattavasti hitaammin kuin kontrollierät. Tämä oli tietysti kokeen tulosten kannalta positiivinen asia, mutta koeaika-aulun kannalta se toi uutta haastetta tutkimukseen. Suunnitelluista ja suoritetuista kokeista ei kuitenkaan haluttu luopua, joten tulosten viivästyminen hyväksyttiin ja aikataulua korjattiin.

Vaikka kokeissa esiintyneiden muuttujien määrä rajattiin jo suunnitteluvaiheessa mahdollisimman pieneksi, oli niitä tästä huolimatta runsaasti. Erilaisista koe-eristä saatuja tuloksia oli hankala osoittaa jostakin tietystä muuttujasta johtuviksi, sillä käsittelyt pitivät sisällään useampia muuttujia yhtäaikaaisesti. Samat käsittelyt toistettiin tutkimuksen aikana useasti, mutta kohteena olivat eri lajikkeet. Ja koska lajikkeet erosivat jo huomattavasti toisistaan, ei muuttujien vaikutuksia ollut aina helppoa tulkita. Vaikka näiden kokeiden perusteella saavutettiin käytettävä säilytysmenetelmä, olisi sitä jatkotutkimuksilla mahdollista tulevaisuudessa parantaa. Todennäköisintä on, että erityisesti regeneraatioalustan koostumuksen optimoinnilla olisi suurin vaikutus versoontumisen lisääntymiseen.

Täysin versoontumattomista koe-eristä viisi oli sellaisia, joissa lajikkeena oli 'Jonsok'. Se on kasvuaateiltaan muista lajikkeista poikkeava, ja sen vuoksi se myös tuotannossa kasva-

tetaan omalla versoontumisalustallaan. Tässä tutkimuksessa 'Jonsokille' kokeiltiin regeneraatioalustana myös tätä tuotannossa käytettyä alustaa (pistokoealusta I). Versoontumattomista 'Jonsok' eristä ei yhdessäkään regeneraatioalustana ollut 'Jonsokin' versoontumisalusta.

8.1.1 Kalluksen kasvu

Useassa toipuneessa silmussa havaittiin kallussolukon kasvua. Osassa näistä silmuista kehittyi myös verson kasvua, mutta toisissa kallusaste jäi pysyväksi. Versoontuminen ei siis ole varmaa. Vaikka kalluksesta voidaan hormoneilla saada kasvamaan versoja, ei niiden kasvun varaan voi kehittää tuotannossa käytettävää toimintaohjetta. Kalluksen kasvu ei ylipäätään ole toivottavaa, sillä sen aikana voi kasvissa tapahtua muutoksia. Syntyvät versot eivät välttämättä vastaa emokasvin perimää, joten kalluksen kasvu on arveluttavaa geenisäilytystä ajatellen.

Kallus kertoo osaltaan myös syntyneistä soluvaurioista. Se on merkki siitä, että kyseisessä käsittelyssä on vielä parannettavaa, sillä tarkasti optimoidulla käsittelyllä voidaan saavuttaa versonkasvu suoraan silmusta ilman kalluksen muodostusta. Suoritetuissa kokeissa ilmenneet kalluskasvut ilmaisevat käsittelyistä sellaiset, joissa muuttujat ovat vääränlaiset. Nämä tulokset helpottavat menetelmän kehittelyä myöhemmin.

8.1.2 Mahdolliset virhelähteet

Tutkimuksessa suurimmat hankaluudet johtuivat suhteellisen lyhyestä suoritusajasta ja tutkimuksen kohteen luonteesta. Mansikan kasvuaika kasvatusalustoilla on neljä viikkoa, ja suunnitellussa koesuorituksessa käsittelyn jälkeinen kasvatuskierto piti sisällään neljä eri kasvatusvaihetta. Pelkästään tämän seikan vuoksi yhden kokeen kesto oli vähintään neljä kuukautta, ilman esikasvatukseen kulunutta aikaa. Koska koesuunnitelma tehtiin pitkälti oletuksiin perustuen, johtuen vähäisestä ennakkotutkimusten määrästä, oli muutoksia koe-menettelyihin odotettavissa jo aikaisessa vaiheessa.

Kokeista saadut tulokset perustuvat suhteellisen suppeaan otantaan. Jokaiselle koekäsittelylle ei suoritettu muuttujiltaan täsmällistä rinnakkaiskäsittelyä, jonka vuoksi tulokset ovat painokkaasti viitteellisiä. Tulosten varmentamiseksi tulisi vielä suorittaa useampia rinnakkaiskäsittelyitä halutuilla muuttujilla. Varsinkin käyttöön otettavien menetelmien osalta on menetelmän toimivuutta hyvä tarkkailla jatkuvasti.

Versoista kehittyneiden tuppaiden jakoa ja laskua ei suoritettu jokaiselle tuppaille. Kontrollieristä laskettiin summittain vain muutamia tuppaita, mutta suurimmaksi osaksi ne arvioitiin vastaavan normaalia jakautumiskasvua vain silmämääräisesti. Nestetyypikäsittelyistä koe-eristä laskettiin jokaista kasvatuspurkkia kohden vähintään yksi tupas. Lasketta- vaksi valittiin aina purkin vähiten jakautuneelta vaikuttava verso, ja sen laskemisesta saatu tulos annettiin myös muille purkin tuppaille. Näin toimittiin, mikäli kaikki purkin versot olivat arviolta samankokoisia. Jos tuppaiden koot erosivat huomattavasti toisistaan, laskettiin niistä useampi. Näin ollen saatujen versojen määrät eivät kuvaa täsmällistä saantoa, mutta luku ilmoittaa kuitenkin luotettavasti suuruusluokan, jossa liikutaan. Versojen täsmälliset määrät jokaisen tuppiaan osalta olisivat olleet kokeiden kannalta liian tarkkoja tuloksena ilmoitettavaksi, ja niiden vaatima lisätyö myös turhaa.

Tutkimuksessa kaikki kokeet suoritti yksi henkilö. Myös silmujen otto, versojen siirto sekä viljelmien lasku tapahtui pääosin yhden henkilön toimesta. Tämä vähentää "käsiä"- ja tulkintaerojen aiheuttamien virheiden mahdollisuutta lopullisia tuloksia ajatellen. Lisäksi

kokeet suoritettiin aina samassa työpisteessä samoilla välineillä mainittuja muuttujia lukuun ottamatta.

8.2 Soveltaminen tuotantoon

Tutkimuksen aikana silmujen versoontumista odotettiin kolmesta neljään kuukautta. Tämä aika on tuotannon kannalta ajatellen liian pitkä, sillä se venyttäisi taimien tuotannon keston vähintään viiteen kuukauteen. Se myös vaatisi pienten silmujen siirron maljalta toiselle useamman kerran ennen versoontumista. Kokeiden aikana kuitenkin löydettiin myös käsittelyjä, joista versoja saatiin heti ensimmäisen kasvukuukauden jälkeen.

Osa silmuista tulkittiin kokeiden aikana taantuneiksi tai kuolleiksi, tai niiden katsottiin kasvavan vain kallusta, ja jätettiin näin ollen siirtämättä uudelle kasvualustalle. Useamman kerran kuitenkin havaittiin näiden silmujen alkavan versoa oltuaan samalla kasvatusmaljalla normaalia siirtoväliä pidemmän aikaa. Tulevaisuudessa tulisikin tutkia maljalta siirtämättä jättämisen vaikutusta silmujen versoontumiseen. Jos silmujen antaisi kasvaa samalla alustalla siirtämättä kahdeksan viikkoa, voisi se paikoitellen lisätä versojen kasvua. Tänä aikana versoontuvat silmut voisi toki poimia jatkokasvatukseen, mutta versoontumattomat silmut jätettäisiin siirtämättä. Koska kasvuun lähtökin selkeästi viivästyi nestetyypessä olleiden silmujen osalta, voisi sama päteä myös verson kasvuun. Nykyisellä siirtovälillä silmut eivät ehkä ehdi versonmuodostukseen, kun jo joutuvat jälleen totuttautumaan uuteen kasvualustaan.

Samalla alustalla pitäminen karsisi regeneraatiovaiheeseen liittyvää ja mahdollisesti turhaa työtä. Jokaista silmueraa ei näin ollen tarvitsisi siirtää automaattisesti uudelle alustalle, vaan siirtoja suoritettaisiin tarpeen mukaan. Alustojen käytön väheneminen olisi myös kustannussäästö. Maljojen käytön vähentäminen vaikuttaisi kustannuksiin ainakin, mikäli menetelmää sovelletaan tuotantoon, sillä toisin kuin kasvatuspurkit, ovat tässä käytetyt maljat kokonaisuudessaan kertakäyttöisiä.

Saman alustan käyttäminen ei toisi myöskään ongelmia alustakierron rajoitetun alustamäärän suhteen. Jokainen verso, olipa se sitten neljä- tai kahdeksanviikkoinen, lähtisi jatkokasvatukseen myös järjestysnumeroltaan samalta alustalta.

Lopullisia versomääriä laskettaessa havaittiin hillopurkkiin laitettujen versojen määrän vaikuttavan jakautumiseen merkittävästi. Tämä vaikutti osaltaan varmasti myös tuloksina ilmoitettuihin versojen määriin. Suuressa hillopurkissa yksittäinen verso tai tupas jakautui parhaimmillaan useisiin satoihin versoihin. Mikäli purkissa oli yhtäaikaaisesti useampi verso, oli niistä saatavien jakoversojen määrä selkeästi pienempi. Useampien versojen laitto samaan hillopurkkiin oli kuitenkin kokeissa perusteltua, sillä materiaalia oli erittäin runsaasti. Jos menetelmää sovelletaan tuotannossa, on samassa hillopurkissa olevien versojen määrä syytä pitää mahdollisimman pienenä. Kokeiden perusteella sopiva määrä purkkia kohden olisi kolmesta viiteen versoa.

8.3 Tutkimusehdotuksia ja kehittämisideoita

8.3.1 Kylmäkaraisu esikasvatuksessa

Useammassa tutkimuksessa (mm. Hirai ym. 1998) mainitaan versojen tai silmujen kylmäkäsittely ennen dehydraatio- tai vitrifikaatiokäsittelyä. Suorittamissamme koekäsittelyissä mansikan versot otettiin esikasvatukseen kylmäsäilöstä, mutta jo kaksi kuukautta ennen

kokeita. Versoja kasvatettiin kahdella lisäysalustalla normaalissa kasvatuslämpötilassa, jonka jälkeen niistä poimittiin silmut kryokäsittelyä varten. Koska silmut nestetyypikäsittelyn jälkeen olivat pääosin elossa, voitaisiin myös kylmäkäsittelyllä kenties lisätä versoontumista. Kasvatus toisella lisäysalustalla voitaisiin tehdä kylmässä, mukailleen näin Hirain ym. kapselointisäilytysmenetelmän esikasvatusvaihetta.

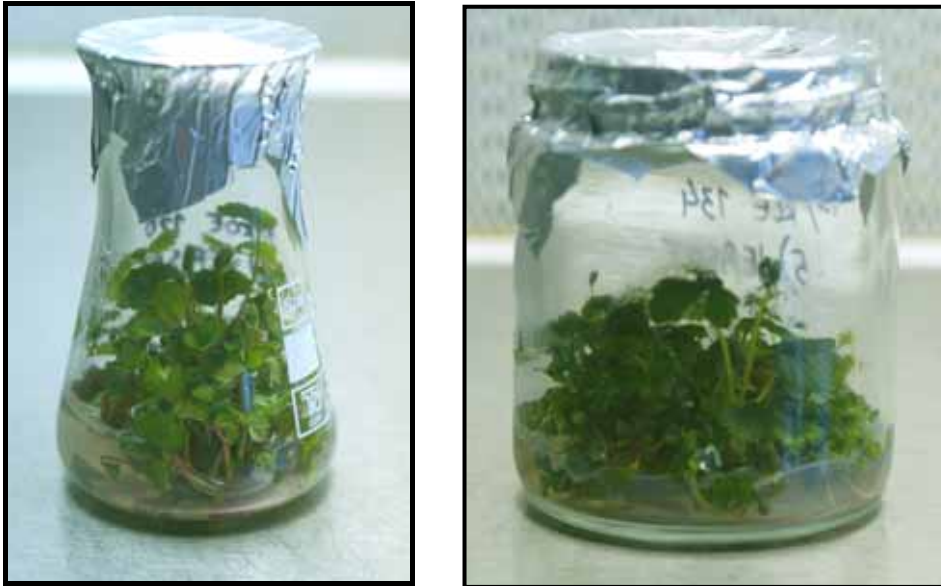
Kylmäkäsittely voisi auttaa silmuja asettumaan lepotilaan, ja näin valmistaa niitä myös sietämään paremmin tulevaa nestetyypisäilytystä. Vastaavalla tavalla kasvit varautuvat kylmän tulon luonnossa ilmojen alettua syksyllä viiletä.

8.3.2 Käsittelyaika pesuliouksessa

Kokeissa saatiin viitteitä pesuliouksen vaikutuksen merkityksestä silmujen kasvuun lähdölle ja versoontumiselle. Kesken tutkimuksen vaihdettiin silmujen pesumenetelmää, jonka myötä myöhempien kokeiden silmut pestiin pienemmällä määrällä 1 M S-liuosta. Alkupään kokeiden silmujen pesu tehtiin pienellä petrimaljalalla kuten muutkin liuoskäsittelyt. Pesumenetelmän vaihdon myötä pesuliuos pipetoiitiin suoraan kryoputkiin niiden sulattamisen jälkeen. Pesuliouksen määrä ja sen vaikutusaika saattoivat olla yksi vaikuttava tekijä versoontumisen suhteen, jota lisätutkimuksilla tulisi selvittää. Mikäli käytetään putkeen pipetointia, joka työskentelyn kannalta on kätevämpi vaihtoehto, on ilmeisimmin pesuliouksen vaikutusaikaa lisättävä.

8.3.3 Jatkokasvatusalustojen tarve

Versojen kasvuun vaikutti paljon kokeissa käytetyn kasvatuspurkin koko ja siirron ajankohta verson kokoon nähden. Liian pieninä suhteessa liian suureen purkkiin siirretyt versot kuolivat suurelta osin, eivätkä eloon jääneet versotkaan päässeet normaaliin kasvuun. Versoista ne, jotka eivät jatkokasvatuksessa menestyneet, kuolivat pääosin jo erlenmeyer-pulloissa. Hyvin kasvunsa aloittaneiden versojen siirtäminen foliokantisiin kasvatuspurkeihin tuntui puolestaan paikoitellen hieman turhalta välivaiheelta, sillä versot olivat kooltaan jo niin isoja, että ne olisi voinut siirtää suoraan hillopurkkiin. Erlenmeyer-pulloissa ja foliokantisissa kasvatuspurkeissa kasvaneet versot olivat usein verrattaessa lähes toistensa kokoisia, vaikka foliokantisissa purkeissa olleet versot olivat erlenmeyer-pulloissa olleita vanhempia (Kuva 7).



Kuva 7. Versot erlenmeyer-pullossa ja foliokantisessa kasvatuspurkissa.

Jatkokasvatusalustojen vähentäminen helpottaisi rajoitetusta alustakierrosta mahdollisesti aiheutuvia ongelmia. Koska menestyvät ja ei menestyvät versot erottuvat toisistaan hyvin jo erlenmeyer-vaiheessa, ja versojen koko on pääosin jo riittävän suuri, voitaisiin foliokantisessa kasvatuspurkin jättämistä pois alustakierrosta harkita. Vaihtoehtoisesti versot voitaisiin siirtää foliokantiseseen kasvatuspurkkiin, mutta lisäysjako tehtäisiinkin suoraan tästä vaiheesta, ilman siirtoa hillipurkkiin. Alustojen järjestyksen ja laadun on kuitenkin hyvä noudattaa tuotannon vastaavia. Kokeissa erlenmeyereissa kasvualusta oli versoille sama kuin regeneraatioalustalla. Vasta foliipurkki-vaiheesta alkaen alustat olivat normaalissa tuotannossakin käytettyjä. Jos yksi kasvatusvaihe poistetaan jatkokasvatuksesta, on poistettavan alustan oltava se, jota kokeissa käytettiin erlenmeyereissa. Erlenmeyer-pullot on kasvatuspurkkeina syytä säilyttää, mutta niissä oleva alusta voisi jo siinä kasvatusvaiheessa olla kokeissakin foliokantisissa kasvatuspurkeissa käytetty.

8.4 Tulevaisuuden visioita

Kokeilla saavutettiin menetelmä, jonka mukaan mansikkaa on alettu jo viemään nestetypipitankkiin pitkäaikaisen säilytyksen kokeita varten. Tarkoituksena on sulattaa säilytetyjä silmuja vuosittain, jonka jälkeen nestetypen mahdollisia pitkäaikaisia vaikutuksia niiden kasvulähtöön ja versoontumiseen voidaan havainnoida. Näistä silmuista voidaan myös kasvattaa taimet, jolloin morfologiset ja mahdollisesti geneettiset muutokset voidaan havainnoida.

Geenipankin ja kryosäilytyksen vaikutuksia tulevaisuuden kasvukannoille on mahdotonta ennustaa. Eri kasvilajeilla tehdyt tutkimukset viittaavat vahvasti kryosäilytyksen olevan tärkeä keino kasvigeenien säilyttämisessä. Nestetypen pitkäaikaisista vaikutuksista kasveille ei kuitenkaan tiedetä vielä paljoa. Niiden selvittämiseksi on tehtävä useita sulatuksia yhä pidempien aikojen kuluttua pakastuksesta, ja niistä kehittyvien taimien tarkkailua ja tutkimista. Ennustuksia ja väitteitä tulevasta voidaan kuitenkin esittää.

Säilytyksen aikana silmut läpikäyvät erittäin rasittavan jakson. Tästä selviävät ja eloon jäävät silmut ovat lähtökohdiltaan ja ominaisuuksiltaan ilmeisen vahvoja. Kun nämä silmut

kasvavat ja kehittyvät taimiksi tuotannon tarpeisiin, otetaan niistä myös uusia silmuja käytettyjen tilalle pakastusta ja säilytystä varten. Johtaako tämä kierto kenties pidemmällä aikavälillä lajikekantojen jalostumiseen? Mikäli aina tietyn kannan silmut jäävät eloon muita paremmin, kasvaa niistä siis myös enemmän taimia, joista otetaan edelleen eniten silmuja. Tämä johtaa ajan mittaan paremman kannan tai kantojen suhteellisen määrän kasvuun säilytettävien silmujen kokonaismäärästä.

Tämä voi mahdollisesti hieman pienentää kasvupistevalikoimaa, mutta voi tuoda mukanaan myös säilytystä hyödyttäviä puolia. Jos vahvojen silmujen valikoituminen jokaisen kasvatuskerran myötä kasvattaa niiden osuutta myöhemmässä säilytyksessä, kasvaa kenties myös silmuista saatavien versojen ja viljelmien määrä silmueraa kohti.

Tässä vaiheessa voidaan vain esittää arveluja kryosäilytyksen tulevaisuudesta, mahdollisuuksista ja vaikutuksista. Tulevaisuudessa tulemme kuitenkin varmasti saamaan ratkaisuja nyt mieleen nouseviin kysymyksiin ja esitettyihin hypoteeseihin. Kryosäilytys, niin kasvi- kuin eläinmaailman osalta, tulee varmasti olemaan paljon tutkittu ja nopeasti kehitetty aihealue.

9 Kirjallisuus

- Baudot, A., Alger, L. & Boutron, P. 2000. Glass-Forming Tendency in the System Water-Dimethyl Sulfoxide. *Cryobiology* 40, 151-158.
- Conlon, J. M., Yano, K., Chartrel, N., Vaudry, H. & Storey, K. B. 1998. Freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica* is associated with unusual structural features in insulin but not in glucagons. *Journal of Molecular Endocrinology* 21, 153-159.
- Engelman, F. 1998. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop*. 8 – 20. Presentation notes.
- Fabre, J. & Dereuddre, J. 1990. Encapsulation–dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters* 11, 413 – 426.
- Fahy, G. M., Levy, D. I. & Ali, S. E. 1987. Some Emerging Principles Underlying the Physical Properties, Biological Actions, and Utility of Vitrification Solutions. *Cryobiology* 24, 196-213.
- George, E. F. 1993. Storing and distributing clonal material. *Plant propagation by tissue culture*. Part 1: The technology, 163 – 182.
- Hammer, K., Diederichsen, A. & Spahillari, M. 1999. Basic studies toward strategies for conservation of plant genetic resources. Technical meeting on the methodology of the FAO world information and early warning system on plant genetic resources. Prague, Czech republic, June 1999. Kokousmateriaali.
- Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S. & Sakai, A. 1998. Cryopreservation of in vitro grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, Vol. 101, 109 – 115.
- Kartha, K.K., Leung, L. & Pahl, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *Journal of American Society for Horticultural Science* 105, 4, 481 – 484.
- Kashiwasaki, N., Okuda, Y., Seita, Y., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Shino, M., Masaoka, T. & Inomata, T. 2006. Comparison of Glycerol, Lactamide, Acetamide and Dimethylsulfoxide as Cryoprotectants of Japanese White Rabbit Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development* 52, 4, 511-516.

- Laamanen, J., Kauppinen, S. & Uosukainen, M. 2006. Laukaan tutkimusryhmän varmennetun lisäys- ja taimiaineiston tuotantopaikkakohtainen menettelyohje ydinkasveille. Julkaistu 11.9.2006.
- Matala, V. 2006, Mansikan viljely. 3. uud. p. Julkaisu nro 340. Puutarhaliitto.
- MMM 09/2006. Asetus varmennetusta lisäys- ja taimiaineistosta. Maa- ja metsätalousministeriö.
- Panis, B. 2006. Cryopreservation of crop species in Europe. Proposal for a new COST Action. 165th CSO meeting 27-28th June 2006. Tallin, Estonia. Kokousmateriaali.
- Panis, B., Piette, B. & Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168, 1, 45 – 55.
- Reed, B.M. & Hummer, K.E. 1995. Conservation of Germplasm of Strawberry (*Fragaria* species). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 32, Edited by Bajaj, Y. P. S. 354 – 370.
- Sakai, A. 1998. Development of cryopreservation techniques. Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop. 1 – 7. Presentation notes.
- Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. 1990. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel organs (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23, 1, 15 – 20.
- Sakai, A., Yamakawa, M., Sakata, D., Harada, T. & Yakuwa, T. 1978. Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196 ° C. *Low temperature Science series B* 36, 31 – 38.
- Satokausi käynnistynyt koko maassa. Sydänkesällä syödään mansikkaa! 2006. Hedelmän- ja marjanviljelijäin liiton sivusto. Tiedote julkaistu 29.6.2006. Viitattu 4.1.2007. <http://www.puutarhaliitto.fi/hml/tiedot.html>.
- Shäfer-Menuhr, A., Müller, E. & Mix-Wagner, G. 1996. Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. *Potato research*, Vol. 39, 4, 507 – 513.
- Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet (Hedelmä- ja marjakasvit). 2006. Maa- ja elintarviketalous 89. MTT Kasvintuotanto.
- Supercool X-1000™, Enhanced Vitrification Performance. 2004. 21st Century Medicinen sivusto. Viitattu 10.1.2007. <http://www.21cm.com/x1000.html>.
- Uosukainen, M. 2006. Kylmäsäilytystekniikan soveltaminen kasvillisesti lisättävien kasvien geenivarojen pitkäaikaissäilytyksessä. Hankesuunnitelma. MTT Kasvintuotannon tutkimus. Julkaistu 18.5.2006.
- Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M. & Valkonen, J.P.T. 2005. Cryopreservation of in-vitro grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*, Vol. 24, 5, 280 – 288.
- Zachariassen, K. E. & Kristiansen, E. 2000. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. *Cryobiology* 41, 257-279.

Liite 1. Mansikan kryokokeet

Koe	Tunnus	Kasvupiste	Käsittely	LN	PVS2-liuos	PVS2 aika	Regeneraatioalusta
104	LINA-85	5-37	1	+	Tavallinen	45 min	E
		5-37	2	-	Tavallinen	45 min	E
			3	+	Tavallinen	45 min	P
			4	+	Tavallinen	45 min	F
			5	+	Super Cool	45 min	E
			6	+	Tavallinen	45 min	E
			7	-	Tavallinen	45 min	E
			8	+	Tavallinen	45 min	F
			9	-	Tavallinen	45 min	F
109	SS-5	3-89	1	+	Tavallinen	45 min	D
			2	+	Tavallinen	45 min	C
			3	+	Tavallinen	45 min	B
			4	+	Tavallinen	45 min	A
			5	-	Tavallinen	45 min	D,A
112	POL-97	5-13	1	+	Tavallinen	30 min	C
			2	+	Tavallinen	45 min	C
			3	+	Tavallinen	60 min	C
			4	+	Super Cool	45 min	D
			5	-	Super Cool	45 min	D
			6	+	Super Cool	45 min	B
			7	-	Super Cool	45 min	B
			8	+	Super Cool	45 min	C
			9	-	Super Cool	45 min	C
			10	+	Super Cool	45 min	A
			11	-	Super Cool	45 min	A
			12	+	Tavallinen	45 min	D
			13	+	Tavallinen	45 min	B
			14	+	Tavallinen	45 min	C
			15	+	Tavallinen	45 min	A
			16	+	Tavallinen	30 min	B
			17	-	Tavallinen	30 min	B
			18	+	Tavallinen	45 min	B
			19	-	Tavallinen	45 min	B
			20	+	Tavallinen	60 min	B
			21	-	Tavallinen	60 min	B
115	JON-55	5-23	1	+	Tavallinen	45 min	B
			2	-	Tavallinen	45 min	B
			3	+	Tavallinen	60 min	B
			4	-	Tavallinen	60 min	B
			5	+	Tavallinen	45 min	C
			6	-	Tavallinen	45 min	C
			7	+	Tavallinen	60 min	C
			8	-	Tavallinen	60 min	C

Mansikan kryokokeet

120	SS-79	5-4	1	+	Tavallinen	30 min	C
			2	+	Tavallinen	45 min	C
			3	+	Tavallinen	60 min	C
			4	-	Tavallinen	60 min	C
			5	+	Tavallinen	45 min	C
			6	+	Tavallinen	60 min	C
121	POL-97	5-9	1	+	Tavallinen	20 min	B
			2	+	Tavallinen	30 min	B
			3	+	Tavallinen	40 min	B
			4	+	Tavallinen	50 min	B
			5	+	Tavallinen	60 min	B
			6	+	Tavallinen	70 min	B
			7	+	Tavallinen	80 min	B
			8	-	Tavallinen	80 min	B
125	KENT-1	5-38	1	+	Super Cool	45 min	D
			2	-	Super Cool	45 min	D
			3	+	Super Cool	60 min	D
			4	-	Super Cool	60 min	D
			5	+	Super Cool	45 min	A
			6	-	Super Cool	45 min	A
			7	+	Super Cool	60 min	A
			8	-	Super Cool	60 min	A
126	JON-55	5-23	1	+	Tavallinen	40 min	C
			2	+	Tavallinen	50 min	C
			3	+	Tavallinen	60 min	C
			4	+	Tavallinen	70 min	C
			5	+	Tavallinen	80 min	C
			6	+	Tavallinen	90 min	C
			7	+	Tavallinen	100 min	C
			8	-	Tavallinen	100 min	C
128	LINA-85	5-36	1	+	Tavallinen	45 min	B
			2	+	Tavallinen	60 min	B
			3	+	Tavallinen	80 min	B
			4	-	Tavallinen	80 min	B
			5	+	Tavallinen	45 min	B
			6	+	Tavallinen	60 min	B
			7	+	Tavallinen	80 min	B
			8	-	Tavallinen	80 min	B
129	POL-97	5-13	1	+	Tavallinen	40 min	B
			2	+	Tavallinen	60 min	B
			3	+	Tavallinen	80 min	B
			4	+	Tavallinen	40 min	B
			5	+	Tavallinen	60 min	B
			6	+	Tavallinen	80 min	B
			7	+	Tavallinen	110 min	B
			8	-	Tavallinen	110 min	B
			9	+	Tavallinen	120 min	B
			10	-	Tavallinen	120 min	B

Mansikan kryokokeet

130	JON-55	5-23	1	+	Tavallinen	45 min	O
			2	+	Super Cool	45 min	O
			3	+	Tavallinen	60 min	B
			4	+	Super Cool	60 min	B
			5	-	Super Cool	60 min	B
			6	+	Tavallinen	45 min	O
			7	+	Super Cool	45 min	O
			8	+	Tavallinen	60 min	B
			9	+	Super Cool	60 min	B
			10	-	Super Cool	60 min	B
131	KENT-1	5-38	1	+	Tavallinen	45 min	J
			2	+	Super Cool	45 min	J
			3	+	Tavallinen	45 min	K
			4	+	Super Cool	45 min	K
			5	-	Super Cool	45 min	J
			6	-	Super Cool	45 min	K
134	POL-97	5-13	1	+	Tavallinen	60 min	A
			2	+	Tavallinen	60 min	D
			3	+	Tavallinen	60 min	C
			4	+	Tavallinen	60 min	B
			5	+	Tavallinen	60 min	F
			6	-	Tavallinen	60 min	A
			7	-	Tavallinen	60 min	D
			8	-	Tavallinen	60 min	C
			9	-	Tavallinen	60 min	B
			10	-	Tavallinen	60 min	F
135	SS-89	5-2	1	+	Tavallinen	60 min	A
			2	+	Tavallinen	60 min	D
			3	+	Tavallinen	60 min	C
			4	+	Tavallinen	60 min	B
			5	+	Tavallinen	60 min	N
			6	-	Tavallinen	60 min	A
			7	-	Tavallinen	60 min	D
			8	-	Tavallinen	60 min	C
			9	-	Tavallinen	60 min	B
			10	-	Tavallinen	60 min	N
138	JON-88	5-24	1	+	Tavallinen	45 min	I
			2	+	Super Cool	45 min	I
			3	+	Tavallinen	60 min	I
			4	+	Super Cool	60 min	I
			5	-	Tavallinen	60 min	I
			6	-	Super Cool	60 min	I
139	LINA-85	5-36	1	+	Tavallinen	60 min	G
			2	+	Super Cool	60 min	G
			3	+	Tavallinen	60 min	H
			4	+	Super Cool	60 min	H
			5	-	Super Cool	60 min	G
			6	-	Super Cool	60 min	H

Mansikan kryokokeet

142	KO-80	5-16	1	+	Tavallinen	30 min	G
			2	+	Tavallinen	30 min	H
			3	+	Tavallinen	45 min	G
			4	+	Tavallinen	45 min	H
143	CAV-29	4-8	1	+	Tavallinen	45 min	L
			2	+	Tavallinen	45 min	M
			3	-	Tavallinen	45 min	L
			4	-	Tavallinen	45 min	M
			5	+	Tavallinen	45 min	B
			6		Käsittelemätön	45 min	P

Lite 2. Silmujen eloonjäämisprosentit

Koe	Tunnus	Kasvup.	Käsittely	LN	Silmuja	1 viikko		2 viikkoa		3 viikkoa		4 viikkoa	
						Elää	Eloonjäämis%	Elää	Eloonjäämis%	Elää	Eloonjäämis%	Elää	Eloonjäämis%
104	LINA-85	5-37	1	+	20	10	50,0 %	12	60,0 %	14	70,0 %	14	70,0 %
			2	-	20	13	65,0 %	19	95,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			3	+	20	1	5,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
			4	+	20	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
			5	+	20	6	30,0 %	15	75,0 %	16	80,0 %	17	85,0 %
			6	+	20	9	45,0 %	16	80,0 %	18	90,0 %	18	90,0 %
			7	-	20	18	90,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			8	+	20	2	10,0 %	6	30,0 %	7	35,0 %	11	55,0 %
			9	-	20	17	85,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
109	SS-5	3-89	1	+	20	9	45,0 %	14	70,0 %	19	95,0 %	19	95,0 %
			2	+	20	13	65,0 %	17	85,0 %	19	95,0 %	19	95,0 %
			3	+	20	13	65,0 %	17	85,0 %	19	95,0 %	19	95,0 %
			4	+	20	11	55,0 %	16	80,0 %	16	80,0 %	16	80,0 %
			5	-	20	16	80,0 %	19	95,0 %	19	95,0 %	19	95,0 %
112	POL-97	5-13	1	+	6	2	33,3 %	2	33,3 %	5	83,3 %	5	83,3 %
			2	+	5	2	40,0 %	4	80,0 %	5	100,0 %	5	100,0 %
			3	+	6	4	66,7 %	6	100,0 %	6	100,0 %	6	100,0 %
			4	+	10	1	10,0 %	6	60,0 %	6	60,0 %	6	60,0 %
			5	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			6	+	10	7	70,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %
			7	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	+	10	3	30,0 %	6	60,0 %	8	80,0 %	8	80,0 %
			9	-	10	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			10	+	10	0	0,0 %	4	40,0 %	5	50,0 %	8	80,0 %
			11	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			12	+	10	3	30,0 %	6	60,0 %	6	60,0 %	6	60,0 %
			13	+	10	5	50,0 %	7	70,0 %	7	70,0 %	8	80,0 %
			14	+	10	3	30,0 %	4	40,0 %	6	60,0 %	6	60,0 %
			15	+	10	4	40,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %

			16	+	6	3	50,0 %	5	83,3 %	6	100,0 %	6	100,0 %
			17	-	6	6	100,0 %	6	100,0 %	6	100,0 %	6	100,0 %
			18	+	6	3	50,0 %	5	83,3 %	5	83,3 %	5	83,3 %
			19	-	5	5	100,0 %	5	100,0 %	5	100,0 %	5	100,0 %
			20	+	6	4	66,7 %	6	100,0 %	6	100,0 %	6	100,0 %
			21	-	6	6	100,0 %	6	100,0 %	6	100,0 %	6	100,0 %
115	JON-55	5-23	1	+	20	16	80,0 %	17	85,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			2	-	20	18	90,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			3	+	20	13	65,0 %	17	85,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			4	-	20	19	95,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			5	+	20	8	40,0 %	16	80,0 %	18	90,0 %	18	90,0 %
			6	-	21	20	95,2 %	21	100,0 %	21	100,0 %	21	100,0 %
			7	+	20	14	70,0 %	17	85,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			8	-	19	19	100,0 %	19	100,0 %	19	100,0 %	19	100,0 %
120	SS-79	5-4	1	+	20	6	30,0 %	14	70,0 %	17	85,0 %	17	85,0 %
			2	+	20	12	60,0 %	19	95,0 %	19	95,0 %	20	100,0 %
			3	+	20	15	75,0 %	19	95,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			4	-	12	12	100,0 %	12	100,0 %	12	100,0 %	12	100,0 %
			5	+	21	2	9,5 %	9	42,9 %	15	71,4 %	17	81,0 %
			6	+	21	5	23,8 %	14	66,7 %	16	76,2 %	18	85,7 %
121	POL-97	5-9	1	+	10	2	20,0 %	3	30,0 %	6	60,0 %	7	70,0 %
			2	+	10	3	30,0 %	6	60,0 %	7	70,0 %	7	70,0 %
			3	+	10	2	20,0 %	4	40,0 %	5	50,0 %	6	60,0 %
			4	+	10	5	50,0 %	8	80,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			5	+	10	7	70,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			6	+	10	4	40,0 %	8	80,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			7	+	10	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %

Silmujen elonjäämisprosentit

125	KENT-1	5-38	1	+	10	1	10,0 %	5	50,0 %	6	60,0 %	7	70,0 %
			2	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			3	+	10	3	30,0 %	6	60,0 %	7	70,0 %	7	70,0 %
			4	-	10	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			5	+	10	1	10,0 %	3	30,0 %	6	60,0 %	7	70,0 %
			6	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			7	+	10	2	20,0 %	5	50,0 %	7	70,0 %	7	70,0 %
			8	-	10	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
126	JON-55	5-23	1	+	10	3	30,0 %	8	80,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %
			2	+	10	3	30,0 %	5	50,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %
			3	+	10	5	50,0 %	7	70,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			4	+	10	6	60,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			5	+	10	8	80,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			6	+	10	7	70,0 %	8	80,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			7	+	10	9	90,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	-	10	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
128	LINA-85	5-36	1	+	10	4	40,0 %	7	70,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			2	+	10	8	80,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			3	+	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			4	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			5	+	10	4	40,0 %	6	60,0 %	7	70,0 %	8	80,0 %
			6	+	10	7	70,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			7	+	10	8	80,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
129	POL-97	5-13	1	+	10	7	70,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			2	+	10	8	80,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			3	+	10	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			4	+	10	6	60,0 %	8	80,0 %	8	80,0 %	8	80,0 %
			5	+	10	6	60,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %

			6	+	10	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			7	+	10	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			9	+	10	6	60,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %
			10	-	10	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
130	JON-55	5-23	1	+	10	2	20,0 %	6	60,0 %	8	80,0 %	9	90,0 %
			2	+	10	1	10,0 %	7	70,0 %	7	70,0 %	8	80,0 %
			3	+	10	4	40,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			4	+	10	5	50,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			5	-	10	7	70,0 %	7	70,0 %	8	80,0 %	8	80,0 %
			6	+	10	5	50,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			7	+	10	4	40,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	+	10	8	80,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			9	+	10	3	30,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			10	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
131	KENT-1	5-38	1	+	20	1	5,0 %	6	30,0 %	8	40,0 %	12	60,0 %
			2	+	20	3	15,0 %	7	35,0 %	8	40,0 %	11	55,0 %
			3	+	20	2	10,0 %	6	30,0 %	6	30,0 %	9	45,0 %
			4	+	20	1	5,0 %	9	45,0 %	11	55,0 %	14	70,0 %
			5	-	10	9	90,0 %	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			6	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
134	POL-97	5-13	1	+	11	9	81,8 %	11	100,0 %	11	100,0 %	11	100,0 %
			2	+	11	6	54,5 %	7	63,6 %	10	90,9 %	10	90,9 %
			3	+	11	7	63,6 %	9	81,8 %	10	90,9 %	10	90,9 %
			4	+	11	8	72,7 %	9	81,8 %	9	81,8 %	10	90,9 %
			5	+	11	8	72,7 %	8	72,7 %	11	100,0 %	11	100,0 %
			6	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			7	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			9	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			10	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %

Silmuksen eloonjäämisprosentit

135	SS-89	5-2	1	+	10	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			2	+	10	6	60,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			3	+	10	4	40,0 %	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			4	+	10	6	60,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			5	+	10	6	60,0 %	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			6	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			7	-	10	9	90,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			8	-	10	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			9	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			10	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
138	JON-88	5-24	1	+	20	8	40,0 %	15	75,0 %	18	90,0 %	18	90,0 %
			2	+	20	13	65,0 %	14	70,0 %	19	95,0 %	19	95,0 %
			3	+	20	17	85,0 %	17	85,0 %	17	85,0 %	18	90,0 %
			4	+	20	12	60,0 %	19	95,0 %	20	100,0 %	20	100,0 %
			5	-	11	10	90,9 %	11	100,0 %	11	100,0 %	11	100,0 %
			6	-	11	11	100,0 %	11	100,0 %	11	100,0 %	11	100,0 %
139	LINA-85	5-36	1	+	10	3	30,0 %	3	30,0 %	3	30,0 %	3	30,0 %
			2	+	10	5	50,0 %	6	60,0 %	9	90,0 %	9	90,0 %
			3	+	10	7	70,0 %	8	80,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			4	+	10	6	60,0 %	6	60,0 %	8	80,0 %	5	50,0 %
			5	-	5	5	100,0 %	5	100,0 %	5	100,0 %	5	100,0 %
			6	-	5	5	100,0 %	5	100,0 %	5	100,0 %	4	80,0 %
142	KO-80	5-16	1	+	20	3	15,0 %	7	35,0 %	8	40,0 %	9	45,0 %
			2	+	20	2	10,0 %	4	20,0 %	5	25,0 %	5	25,0 %
			3	+	20	8	40,0 %	11	55,0 %	12	60,0 %	12	60,0 %
			4	+	20	6	30,0 %	8	40,0 %	8	40,0 %	8	40,0 %
143	CAV-29	4-8	1	+	19	5	26,3 %	10	52,6 %	13	68,4 %	13	68,4 %
			2	+	20	4	20,0 %	12	60,0 %	12	60,0 %	13	65,0 %
			3	-	10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %
			4	-	11	10	90,9 %	11	100,0 %	11	100,0 %	11	100,0 %
			5	+	10	2	20,0 %	5	50,0 %	6	60,0 %	9	90,0 %
			6		10	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %	10	100,0 %

Lite 3. Silmujen versoontuminen ja viljelmät

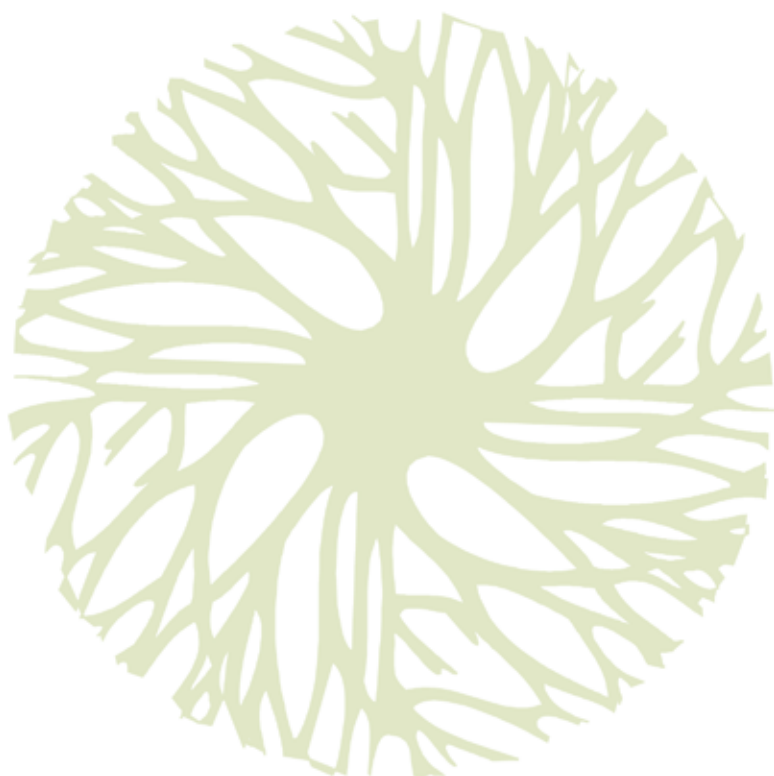
Koe	Tunnus	Kasvup.	Käs.	LN	Silmuja	Versoontuneita	Versoontumis%	Versoja ennen jakoa	Jakamalla saatu	Jakautumiskeskisarvo	Jakautumiskeskisarvo suhteessa kaikkiin silmuihin
104	LINA-85	5-37	1	+	20	5	25,0 %	4	59	14,8	3,0
			2	-	20	10	50,0 %				
			3	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			4	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			5	+	20	3	15,0 %	3	171	57,0	8,6
			6	+	20	4	20,0 %	2	38	19,0	1,9
			7	-	20	13	65,0 %				
			8	+	20	8	40,0 %	3	77	25,7	3,9
			9	-	20	17	85,0 %				
109	SS-5	3-89	1	+	20	3	15,0 %	1	143	143,0	7,2
			2	+	20	11	55,0 %	5	833	166,6	41,7
			3	+	20	5	25,0 %	0	0	0,0	0,0
			4	+	20	1	5,0 %	0	0	0,0	0,0
			5	-	20	3	15,0 %				
112	POL-97	5-13	1	+	6	2	33,3 %	2	414	207,0	69,0
			2	+	5	3	60,0 %	3	384	128,0	76,8
			3	+	6	2	33,3 %	2	352	176,0	58,7
			4	+	10	5	50,0 %	3	431	143,7	43,1
			5	-	10	6	60,0 %				
			6	+	10	9	90,0 %	2	214	107,0	21,4
			7	-	10	9	90,0 %				
			8	+	10	5	50,0 %	4	373	93,3	37,3
			9	-	10	7	70,0 %				
			10	+	10	7	70,0 %	7	557	79,6	55,7
			11	-	10	7	70,0 %				
			12	+	10	3	30,0 %	3	248	82,7	24,8
			13	+	10	6	60,0 %	6	372	62,0	37,2
			14	+	10	4	40,0 %	4	358	89,5	35,8
			15	+	10	2	20,0 %	2	163	81,5	16,3

			16	+	6	4	66,7 %	3	382	127,3	63,7
			17	-	6	3	50,0 %				
			18	+	6	1	16,7 %	1	375	375,0	62,5
			19	-	5	3	60,0 %				
			20	+	6	3	50,0 %	2	188	94,0	31,3
			21	-	6	3	50,0 %				
115	JON-55	5-23	1	+	20	15	75,0 %	10	1098	109,8	54,9
			2	-	20	6	30,0 %				
			3	+	20	15	75,0 %	6	1193	198,8	59,7
			4	-	20	12	60,0 %				
			5	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			6	-	21	2	9,5 %				
			7	+	20	2	10,0 %	0	0	0,0	0,0
			8	-	19	0	0,0 %				
120	SS-79	5-4	1	+	20	5	25,0 %	6	846	141,0	42,3
			2	+	20	6	30,0 %	6	751	125,2	37,6
			3	+	20	6	30,0 %	3	74	24,7	3,7
			4	-	12	7	58,3 %				
			5	+	21	9	42,9 %	5	435	87,0	20,7
			6	+	21	10	47,6 %	7	981	140,1	46,7
121	POL-97	5-9	1	+	10	8	80,0 %	2	198	99,0	19,8
			2	+	10	8	80,0 %	4	271	67,8	27,1
			3	+	10	10	100,0 %	5	451	90,2	45,1
			4	+	10	9	90,0 %	6	925	154,2	92,5
			5	+	10	12	120,0 %	7	734	104,9	73,4
			6	+	10	11	110,0 %	6	400	66,7	40,0
			7	+	10	2	20,0 %	9	264	29,3	26,4
			8	-	10	5	50,0 %				

125	KENT-1	5-38	1	+	10	1	10,0 %	0	0	0,0	0,0
			2	-	10	9	90,0 %				
			3	+	10	5	50,0 %	2	254	127,0	25,4
			4	-	10	7	70,0 %				
			5	+	10	3	30,0 %	3	260	86,7	26,0
			6	-	10	7	70,0 %				
			7	+	10	6	60,0 %	5	233	46,6	23,3
			8	-	10	10	100,0 %				
126	JON-55	5-23	1	+	10	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			2	+	10	2	20,0 %	2	141	70,5	14,1
			3	+	10	4	40,0 %	4	246	61,5	24,6
			4	+	10	3	30,0 %	3	306	102,0	30,6
			5	+	10	6	60,0 %	3	167	55,7	16,7
			6	+	10	7	70,0 %	5	265	53,0	26,5
			7	+	10	5	50,0 %	2	541	270,5	54,1
			8	-	10	8	80,0 %				
128	LINA-85	5-36	1	+	10	4	40,0 %	1	301	301,0	30,1
			2	+	10	2	20,0 %	1	132	132,0	13,2
			3	+	10	4	40,0 %	1	307	307,0	30,7
			4	-	10	4	40,0 %				
			5	+	10	6	60,0 %	3	686	228,7	68,6
			6	+	10	3	30,0 %	2	83	41,5	8,3
			7	+	10	6	60,0 %	1	105	105,0	10,5
			8	-	10	4	40,0 %				
129	POL-97	5-13	1	+	10	1	10,0 %	2	174	87,0	17,4
			2	+	10	3	30,0 %	0	0	0,0	0,0
			3	+	10	1	10,0 %	4	284	71,0	28,4
			4	+	10	2	20,0 %	1	146	146,0	14,6
			5	+	10	3	30,0 %	4	289	72,3	28,9

			6	+	10	2	20,0 %	1	106	106,0	10,6
			7	+	10	1	10,0 %	5	1026	205,2	102,6
			8	-	10	2	20,0 %				
			9	+	10	0	0,0 %	6	735	122,5	73,5
			10	-	10	3	30,0 %				
130	JON-55	5-23	1	+	10	3	30,0 %	kontamin.			
			2	+	10	2	20,0 %	kontamin.			
			3	+	10	1	10,0 %	0	0	0,0	0,0
			4	+	10	1	10,0 %	1	284	284,0	28,4
			5	-	10	0	0,0 %				
			6	+	10	6	60,0 %	kontamin.			
			7	+	10	5	50,0 %	3	276	92,0	27,6
			8	+	10	1	10,0 %	0	0	0,0	0,0
			9	+	10	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			10	-	10	3	30,0 %				
131	KENT-1	5-38	1	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			2	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			3	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			4	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			5	-	10	3	30,0 %				
			6	-	10	2	20,0 %				
134	POL-97	5-13	1	+	11	7	63,6 %	7	425	60,7	38,6
			2	+	11	3	27,3 %	2	98	49,0	8,9
			3	+	11	4	36,4 %	8	1086	135,8	98,7
			4	+	11	5	45,5 %	5	463	92,6	42,1
			5	+	11	7	63,6 %	0	0	0,0	0,0
			6	-	10	8	80,0 %				
			7	-	10	9	90,0 %				
			8	-	10	6	60,0 %				
			9	-	10	9	90,0 %				
			10	-	10	6	60,0 %				

135	SS-89	5-2	1	+	10	5	50,0 %	1	284	284,0	28,4
			2	+	10	5	50,0 %	2	214	107,0	21,4
			3	+	10	3	30,0 %	3	231	77,0	23,1
			4	+	10	4	40,0 %	2	489	244,5	48,9
			5	+	10	4	40,0 %	2	138	69,0	13,8
			6	-	10	8	80,0 %				
			7	-	10	5	50,0 %				
			8	-	10	8	80,0 %				
			9	-	10	5	50,0 %				
			10	-	10	9	90,0 %				
138	JON-88	5-24	1	+	20	10	50,0 %	9	1344	149,3	67,2
			2	+	20	9	45,0 %	8	1513	189,1	75,7
			3	+	20	6	30,0 %	6	651	108,5	32,6
			4	+	20	6	30,0 %	3	349	116,3	17,5
			5	-	11	7	63,6 %				
			6	-	11	3	27,3 %				
139	LINA-85	5-36	1	+	10	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			2	+	10	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			3	+	10	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			4	+	10	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			5	-	5	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			6	-	5	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
142	KO-80	5-16	1	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			2	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			3	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
			4	+	20	0	0,0 %	0	0	0,0	0,0
143	CAV-29	4-8	1	+	19	7	36,8 %	7	389	55,6	20,5
			2	+	20	3	15,0 %	3	102	34,0	5,1
			3	-	10	8	80,0 %				
			4	-	11	5	45,5 %				
			5	+	10	3	30,0 %	3	806	268,7	80,6
			6		10	10	100,0 %				



MTT:n selvityksiä 166