

*Maatalouden  
tutkimuskeskuksen  
julkaisuja*

S A R J A A

18

*Sirkka Immonen (toim.)*

**Solusta tuottavaan  
kasviin**

**Hyötykasvien solukko-  
viljelyseminaari**

**Esitelmät**

*Sirkka Immonen (toim.)*

---

# **Solusta tuottavaan kasviin**

**Hyötykasvien solukkoviljelyseminaari**

**Esitelmät**

**Jokioinen 10–11.12.1996  
MTT, Kasvinjalostuksen tutkimusala**

**From cells to productive plants**

**Tissue culture seminar of cultivated crops**

**Maatalouden tutkimuskeskus**

*Copyright*

Maatalouden tutkimuskeskus (MTT) 1997

*Toimitus*

Sirkka Immonen

*Käännös englanninkielestä*

Sirkka Immonen (s. 46–53, 122–133 ja 149–153)

*Ulkoasu ja kansi*

Punavuoren Hurtta/Jukka Urho

*Taitto*

Liisa Eerikäinen

ISBN 951-729-483-2

ISSN 1238-9935

*Julkaisija*

Maatalouden tutkimuskeskus (MTT), 31600 Jokioinen

*Jakelu ja myynti*

MTT, tietopalveluyksikkö, 31600 Jokioinen

Puh. (03) 41 881, telekopio (03) 418 8339

Sisäsivujen painopaperille on myönnetty pohjoismainen joutsenmerkki.  
Kansimateriaali on 75 prosenttisesti uusiokuitua

# Tiivistelmä

*Avainsanat: androgeneesi, embryogeneesi, geeninsiirto, in vitro, kallus, mikrolisäys, regeneraatio, somakloonit*

Hyötykasvien solukkoviljelyseminaari ”Solusta tuottavaan kasviin” järjestettiin Maatalouden tutkimuskeskuksessa Jokioisilla 10.-11.12.1996. Osanottajat edustivat mm. yliopistoja ja tutkimuslaitoksia. Esitelmissä käsiteltiin sekä metsäpuita, peltokasveja että puutarha- ja koristekasveja. Solukkoviljelyä tarkasteltiin sekä käytännön kannalta että kasvitieteellisen perustutkimuksen osana. Seminaarin aihepiirit olivat 1) mikrolisäys, 2) somaattinen ja gameettinen embryogeneesi ja 3) uuden geneettisen muuntelun tuottaminen. Puuvartisten kasvien mikrolisäyksellä voidaan ratkaista useita kasvulliseen ja siemenlisäykseen liittyviä ongelmia. Mikrolisäystä käytetään jo mm. terveen taimimateriaalin tuottamiseksi useista puutarha- ja koristekasvilajeista.

Embryogeneesiä käsiteltiin sekä perustutkimuksen että käytännön sovellutusten kannalta. Somaattinen embryogeneesi on usein valittu tapa regeneroida kasveja solukkoviljelmistä ja sitä sovelletaan mm. keinosiementekniikassa. Gameettista embryogeneesiä tutkitaan useilla viljakasveilla, ja Suomessa sitä sovelletaan jo ohran ja vehnän jalostuksessa. Kolmannessa aihepiirissä käsiteltiin kasvinjalostuksen näkökulmasta mm. somakloonista muuntelua, somaattisia hybridejä sekä geeninsiirtoa ja siinä tarpeellisia solukkoviljelymenetelmiä. Näitä tekniikoita voidaan käyttää kasvinjalostuksen apuna kasvien geneettisen pohjan laajentamiseksi ja haluttujen ominaisuuksien siirtämiseksi. Ne vaativat kuitenkin vielä kehittämistä vakiintuakseen laajaan käyttöön.

## Abstract

---

*Key words: androgenesis, embryogenesis, callus, gene transfer, in vitro, micropropagation, regeneration, somaclone*

---

A seminar for tissue culture of cultivated crops was held at the Agricultural Research Centre of Finland in Jokioinen on the 10.-11.12.1996. The participants represented mainly Finnish universities and research institutes. A wide range of crop species were discussed in the presentations: forest trees, field crops, ornamentals and horticultural crops. The papers presented covered various aspects of tissue culture from basic research to use in practical applications. The three principal topics were 1) micropropagation, 2) somatic and gametic embryogenesis and 3) novel variation in plant breeding. With woody plants micropropagation may solve several practical problems associated with vegetative and seed propagation. Micropropagation is already used commercially as an important tool in

production of healthy planting material with many horticultural and ornamental species. Both basic and applied aspects of embryogenesis were discussed. Somatic embryogenesis is a preferable pathway to regenerate plants from tissue cultures and it is applied in artificial seed technique. Gametic embryogenesis is under study with several cereal species and is currently used in barley and wheat breeding in Finland. Tissue culture techniques may also be used in gene transfer and for expansion of the genetic base of crops via somaclonal variation and somatic hybridisation. These techniques have considerable potential in plant breeding, although much work is still needed before they can be taken to wide application.

# Esipuhe

Hyötykasvien solukkoviljelyseminaari ”Solusta tuottavaan kasviin” järjestettiin Jokioisilla Maatalouden tutkimuskeskuksessa joulukuussa 1996. Seminaaria suunniteltaessa oli mielessä mm. Punkaharjulla 1995 järjestetty metsäpuiden bioteknologiaa käsittelevä kokous. Halusimme tällä kertaa rajata aiheen käsittelemään vain solukkoviljelyä - ja toisaalta laajentaa sitä koskemaan kaikkia, myös potentiaalisia hyötykasveja. Solukkoviljelyä käsiteltiin kattavasti alkionviljelystä ja mikrolisäyksestä aina geeninsiirrossa käytettäviin solvelluksiin asti. Seminaariin osallistui 40 tutkijaa yliopistoista (Helsingin, Kuopion ja Oulun yliopistot), tutkimuslaitoksilta (Metla, Metsänjalostussäätiö, VTT, MTT, Siemenperunakeskus), maa- ja metsätalousministeriöstä ja yksityissektorilta. Ulkomaisen yhteistyön puitteissa seminaariin osallistui myös muutama vieraileva tutkija. Osanottajien kokemus ja kiinnostus ulottui solutason peruskysymyksistä käytännön kasvinjalostukselliseen pohdintaan. Seminaarin yhteydessä järjestettiin myös laitenäyttely ja Databases in Science and Technology -tietokantaesitys.

Jo pelkästään kasvibioteknologia on niin laaja kokonaisuus, että kaiken kattavaa kansallista seminaaria ei Suomessa liene tarkoituksenmukaista järjestää. Sen sijaan solukkoviljelyn erityiskysymykset ja mm. tutkimusrahoitukseen liittyvät ongelmat ovat yhteisiä niin metsän kuin heinien tutkijallekin. Kasvilajista riippumatta puhumme samaa kieltä. Olemme törmänneet toisiimme maailmalla bioteknologian ja solukkoviljelyn kongresseissa, ja joskus ohimennen kotimaassakin. Yhteisiä kotimaisia foorumeita on toki olemassa, kuten edellä mainittu metsäalan kokoontuminen, Kasvitieteen päivät ja Biotieteiden päivät. Silti kokousten joukkoon mahtuu vielä solukkoviljelyyn keskittyvä, suhteellisen käytännönläheisesti suun-

tautuva tapaaminen, jossa voimme tiivistää kotimaista kanssakäymistä, ehkäistä tutkimushankkeiden päällekkäisyyttä, saada palautetta omista töistämme ja laajentaa tietämystämme toistemme tutkimuksista ja näkemyksistä.

Päädyimme julkaisemaan seminaariesitelmät isäntälaitoksen MTT:n uudessa suomenkielisessä julkaisusarjassa. Tieto leviää näin seminaariväen lisäksi mm. yliopistojen laitoksille, maatalousoppilaitoksiin, maatalousneuvontaan ja maataloustutkimuksen sidosryhmiin. Toimitamme kirjaa myös metsäalan organisaatioille. Koska kokouksemme oli luonteeltaan kuin johdanto teemaan, monet esitykset ovat pikemminkin aihetta yleisemmin esitteleviä katsauksia kuin yksityiskohtaisia tutkimusloistuksia. Kirja on täten sävyltään yleisivistävä ja sopii hyvin kansalliseen levikkiin myös tutkijapiirin ulkopuolelle. Toisaalta englanninkieliset abstraktit indeksoidaan AGRIS-tietokannassa, joten kokouksen kaiut leviävät myös ulos Suomesta.

Solukkoviljelyllä on epäilemättä tulevaisuutta, sillä eri menetelmät ovat jo osoittautuneet käyttökelpoisiksi niin tutkimuksessa, jalostuksessa kuin kaupallisissakin tarkoituksissa. Solukkoviljely on myös tärkeä osa yhä yleistyvää geeniteknikan tutkimusta. Solukkoviljelyseminaareille on tarvetta myös tulevaisuudessa. Olemme nyt esittäytyneet ja esitelleet aiheitamme. Ehkä jatkossa voimme keskittyä joihinkin aiheisiin ja muutoinkin muokata tapaamisten luonnetta tarpeen mukaan. Toivomme alan seminaarien jatkuvan.

Seminaarin järjestäjät MTT:n Kasvinjalostuksen tutkimusalalta kiittävät osanottajia ja kaikkia seminaarin onnistumiseen vaikuttaneita.

Jokioisilla helmikuussa 1997

Sirkka Immonen

# Kiitokset

Kiitämme seuraavia yrityksiä ja yhteisöjä, jotka tukivat "Solusta tuottavaan kasviin" -seminaarin järjestämistä:

Agricultural and Food Science in Finland

Arctest Ky

Boreal Suomen Kasvinjalostus

Oy G.W.Berg & Co Ab

Instrumentarium Oy Instrumed

Jokioisten kunta

Jokioisten Leipä Oy

Jokioisten Osuuspankki

Jokioisten Puutarha Ky

Labo Line Oy

MTT, tiedotus

Oy Plastic Trade Ab

YA-Kemia Oy

# Sisällys

Tiivistelmä .....	3
Abstract .....	4
Esipuhe .....	5
Kiitokset .....	6
<i>Uosukainen, M.</i> Kontaminaatiot solukkoviljelylaboratorioissa .....	9
<i>Keskitalo, M., Pohjo, A., Savela, M.-L., Valkonen, J. P. T., Simon, J. &amp; Pehu, E.</i> Bakteerien hallinta ja genotyypivaihtelut versonkasvussa antibiootein käsitellyissä pietaryrtin ( <i>Tanacetum vulgare</i> L.) solukkoviljelmissä .....	17
<i>Lepistö, M.</i> Hybridihaavan mikrolisäys - kloonien monistuvuus ja juurtumisalttius .....	19
<i>Salonen, M., Salonen, S. &amp; Vanhakoski, S.</i> Metsälehmuksen ja metsätammen mikrolisäys .....	27
<i>Niskanen, A.-M.</i> Vanhojen lehtikuusihybridien lisääminen solukkoviljelyn avulla .....	38
<i>Krajňáková, J.</i> Metsäpuiden mikrolisäys Slovakian Metsäntutkimuslaitoksella .....	46
<i>Karhu, S.</i> Mikrolisäyksen tehostamisen mahdollisuudet ja mekanismit - mallikasveina sinikuusama ja omena .....	54
<i>Kärkönen, A., &amp; Simola, L. K.</i> Japanilaisten puuvartisten kasvien mikrolisäys: selviytyminen Suomen talvessa. ....	61
<i>Pelkonen, V.-P.</i> Solukkoviljelymenetelmien hyödyntäminen liljojen kasvatuksessa ja jalostuksessa .....	67
<i>Abokas, H.</i> Hybridejä, osittaishybridejä ja monoploidisia jälkeläiskasveja vehnäsukuisten lajien risteytyksistä alkioviljelyä käyttämällä .....	73
<i>Sorvari, S.</i> Keinosiemenet puutarhakasvien lisäyksessä .....	75
<i>Simola, L. K.</i> Puiden somaattinen embryogeneesi biotekniikassa .....	83
<i>Kämäräinen, T.</i> Solukkoviljelyn hyödyntäminen POHERIKA - pohjoiset erikoiskasvit - projektissa. Kihokin, venäjänjuuren ja ranskalaisen rakuunan mikrolisäyksestä. ....	92
<i>Kiviharju, E.</i> Kauran kaksoishaploidien tuottomenetelmän kehittäminen .....	97
<i>Immonen, S.</i> Onko rukiista kaksoishaploidiksi? .....	103
<i>Puolimatka, M. Laine, S. &amp; Pauk, J.</i> Vehnän mikrosporiviljely: vahvuudet ja heikkoudet .....	113
<i>Jain, S. M.</i> Somaklooninen muuntelu ja mutageneesi kasvinjalostuksessa .....	122
<i>Rokka, V.-M., Pietilä, L. &amp; Pehu, E.</i> Perunan dihaploidituotanto ja protoplastifusio .....	134
<i>Seppänen, M. &amp; Pehu, E.</i> Uuden geneettisen muuntelun tuottaminen perunan pakkasenkestävyyden tutkimiseksi .....	142
<i>Pauk, J.</i> Transgeeniset kasvit ja niiden viljelyn riskien arviointi .....	149
<i>Ritala, A.</i> Siirtogeeninen ohra .....	154
<i>Nuutila, A. M.</i> Ohran epäkypsistä alkiosta indusoidun polyembryogeneesin hyödyntäminen geeninsiirrossa .....	159
<i>Hägglman, H.</i> Geeninsiirrot metsäpuihin .....	165





# Kontaminaatiot solukkoviljely-laboratorioissa

---

Marjatta Uosukainen

*MTT, Puutarhatuotannon tutkimuslaitos, Laukaan-tutkimus- ja valiotaimiasema, 41330 Vihtavuori  
e-mail: marjatta.uosukainen@mtt.fi*

Kasvaakseen kunnolla kasvisolukkoviljelmien on oltava mahdollisimman vapaita hyönteisistä, sienistä ja useimmista bakteeri-infektioista. Kontaminaatioiden aiheuttamat vahingot vältetään parhaiten, jos kontaminantit havaitaan ennenkuin viljelmät otetaan rutiininomaiseen lisäysviljelyyn. Hyvä laboratoriotekniikka on kontaminanttien ennaltaehkäisyn perusedellytys. Henkilöstön perusteellinen koulutus tehtäviinsä estää mikrobisaastunnat ihmisistä viljelmiin. Riittävä siirrostettavien kasvinosien esikäsitteily torjuu enimmäkseen viljelmiä uhkaavat tuholaisinfektiot, joita aiheuttavat esimerkiksi punkit, ripsiäiset sekä joskus myös ankeroiset. Pintasterilointi torjuu useimmat hiivat, saprofyttiset sienet ja useimmat kasvien pinnalla elävät bakteerit. Äkilliset ja vakavat, pian viljelmien perustamisen jälkeen ilmestyvät kontaminaatiot paljastavat pintakäsittelyjen riittämättömyyden. Jatkuva tarkkailu ja viljelmien testaus on välttämätöntä mikrobien aiheuttamien piilevien kontaminaatioiden varalta. Torjunnassa voidaan käyttää antibiootteja ja fungisideja. Kaikkien käsittelyjen jälkeen on kuitenkin valittava huolellisesti puhtaat solulinjat ja testattava ne toistuvasti viljelyn aikana. Tämä on erittäin tärkeää, sillä kemiallisten käsittelyjen jälkeenkin kontaminoiva organismi saattaa hetken taantumisen jälkeen ilmestyä uudelleen viljelmiin. Kasvien solukkoviljelmien puhtautta ei kukaan pysty varmuudella osoittamaan. Viljelmissä on oletettua useammin virus- tai viroidisaastuntoja. Samoin fytoplasmat, rikketsiat ja spiroplosmat saattavat olla viljelmissä piilevinä. Viljelmissä piilevinä pysyvät, mutta kasvin myöhemmän kehityksen aikana esiinpuhkeavat kontaminaatiot voivat aiheuttaa kasveja lisääville laboratorioille suuria taloudellisia tappioita.

*Avainsanat:* bakteerit, hiivat, hyönteiset, laboratoriotekniikka, punkit, sienet, mikrolisäys, sterilisaatio

# Abstract

## Contaminants in a tissue culture laboratory

Marjatta Uosukainen

*Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Horticulture, Laukaa Research and  
Healthy Plant Unit, FIN-41330 Vihtavuori  
e-mail: marjatta.uosukainen@mtt.fi*

To grow properly, plant tissue cultures must be as free as possible of insect, fungal and bacterial infections. Losses are best avoided if the contaminants are identified before cultures enter the propagation routine. Laboratory technique of a high standard is a prerequisite for preventing contamination. Thorough training of the laboratory staff prevents transfer of contaminants from humans to cultures. Sufficient pretreatment of the explants prevents infections caused by culture pests, for instance, trips, mites and sometimes nematodes. Surface sterilization destroys most yeasts, saprophytic fungi and most bacteria living on the plant surface. Sudden and serious contaminations occurring soon after the initiation of cultures reveals that surface treatments have been insufficient. Latent contaminations caused by microbes require continuous monitoring and testing of cultures. Antibiotics and fungicides can be used in combating the contaminants. Following all treatments it is, however, necessary to carry out careful selection of clean cell lines by repeated testing during cultivations. This is most important, because even after chemical treatments a contaminant organism may recover after a temporary die back and reappear in cultures. Plant tissue cultures can not be shown to be clean with certainty. Cultures contain virus and viroid infections more often than is assumed. Also phytoplasmas, rickettsia and spiroplasmas may be latent in cultures. Contaminants which are latent, but appear later during the development of the plant may cause propagation laboratories great economical losses.

*Key words:* bacteria, fungi, insects, laboratory technique, micropropagation, mites, sterilization

# Johdanto

Solukkoviljelylaboratorioiden kontaminantit voivat olosuhteista riippuen olla lähes mitä hyvänsä hiiren ja virusten väliltä. Kontaminantit ovat peräisin joko ulkoisista lähteistä, kasvien pinnoilta tai kasvien sisäosista.

Hyönteisten ja punkkien aiheuttamat haitat ovat solukkolaboratorioissa yleisiä. Isossa Britanniassa tehty tiedustelu paljasti, että 50 % laboratorioista on kärsinyt ripsiäisten tai punkkien aiheuttamista kontaminaatioista. Kolmanneksella laboratorioista oli esiintynyt vakavia ongelmia (Blake 1988). Ajoittain laboratorioissa saattaa esiintyä myös muita hyönteistuhoja. Maailmanlaajuisesti esiintyviä hyönteisiä ovat erilaiset muurahaiset, ja erityisesti torakat voivat muodostua ongelmaksi (George 1993).

Punkit ovat tuhoisimpia solukkoviljelmiä saastuttavista tuholaista. Ne ovat pieniä, alle 1 mm:n pituisia ja voivat kulkeutua laboratorioon pölyhiukkasten, hyönteisten ja muiden eläinten mukana. Myös ihmiset voivat kuljettaa punkkeja vaatteissa, iholla ja hiuksissa. Punkteista sinänsä on vain vähän haittaa kasvisoluille, mutta niiden mukana kulkeutuu bakteerien ja sienten itiöitä. Punkkisaastunnan ensimmäisiä oireita ovatkin satunnaiset sienikasvustot viljelmissä. Nopean lisääntymiskierron vuoksi punkkien määrä saattaa olla huomattava siinä vaiheessa, kun saastunta havaitaan. Punkit voivat helposti siirtyä ryömimällä viljelmästä toiseen (Blake 1988, George 1993). Munat saattavat säilyä elinkykyisinä pitkiäkin aikoja esimerkiksi seinien rakosissa. Kontaminaatio ei välttämättä ole vuodenaikaan sidottu, vaikka todennäköisin ajankohta on loppukesä. Viljelmistä on löytynyt seuraavia punkkilajeja: *Dermatophagoides pteronyssinus* (pölypunkki), *Tyrophagus putrescentiae*, *Siteroptes avenae* ja *Siteroptes* spp. (Blake 1988). Punkit saattavat tulla viljelmiin ilman bakteeri- tai sieni-itiöitäkin ja jäädä siten huomaamatta (George 1993). Punkkien tarkkailussa on siksi kiinnitettävä huomiota kondensoituneessa vesihöyryssä purkin reunamilla näkyviin punkkien ryömintäjälkiin (Uusitalo *et al.* 1993).

Ripsiäisten munat voivat siirtyä viljelmiin aloitusvaiheessa. On kuitenkin todettu, että ripsiäiset ilmestyvät viljelmiin yleensä ilmateitse. Niiden oireita saastuneissa viljelmissä ovat kiiltävän metallinhoitoiset lehdet (Reustle *et al.* 1988). Sukupolven kierto on tällä hyönteisellä vain noin 3 viikkoa. Tuhottaessa ripsiäissaastuntaa, päivittäinen tarkkailu on tärkeää. Klocke & Myers (1984) käyttivät menestyksellisesti myös kemiallista ripsiäisten torjuntaa lisäämällä autoklavoinnin kestäväää torjunta-ainetta (10 ja 100 mg/l Orthane™ Chevron Chemical Co) MS-alustaan (Murashige & Skoog 1962).

Solukkoviljelmissä yleisimmin kontaminaatioita aiheuttavat bakteerit, sienet ja hiivat (Boxus & Terzi 1987, 1988, Debergh & Vanderschaeghe 1988, Duhem *et al.* 1988, Hennerty *et al.* 1988, Leifert *et al.* 1990, 1991a, 1991b, Savela & Uosukainen 1994). Bakteerien, hiivojen ja sienten aiheuttamat kasvien solukkoviljelmien kontaminaatiot on luokiteltu kolmeen eri tyyppiin (Constantine 1986, Long *et al.* 1988): 1) äkillinen ja vakava kontaminaatio, joka ilmenee yleensä viljelmän aloitusvaiheessa ja lähes aina aiheutuu tehottomasta pintasteriloinnista, 2) kontaminaatio, joka ilmestyy aloitusvaiheen jälkeen, ja jonka aiheuttajia ovat aloituskasvin sisäiset eli endogeeniset mikro-organismit tai lisäsviljelyn aikana viljelmiin siirtyneet mikro-organismit, 3) kontaminaatio, joka on luonteeltaan pitkälinen (krooninen) ja piilevä ja ilmestyy koko viljelmäerään pitkän näennäisesti steriilin viljelyajanjakson jälkeen.

Ensimmäisen kontaminaatiotyyppin ongelmat havaitaan helposti, ja ne voidaan hoitaa tehokkaalla pintasteriloinnilla. Ne saattavat kuitenkin täysin estää viljelmän perustamisen (Constantine 1986). Kahden jälkimmäisen tyyppin kontaminaatioita aiheuttavien organismien havaitseminen ilman erikoistoimenpiteitä on huomattavan vaikeaa. Joskus infektiot tulevat näkyviin vain pitkäaikaisen varastoinnin jälkeen (James & Thurbon 1978, Hennerty *et al.* 1988). Piilevät mikrobisaastunnat ovat kaupallisten laboratorioiden suurimpia ongelmia, joista ollaan kuitenkin haluttomia keskustelemaan (Constantine 1986). Laajemmin ongelma tuli julkisuuteen, kun Boxus & Terzi (1987) ra-

portoivat suurista tappioista eräässä solukko-laboratoriossa. Heidän selvityksensä mukaan laboratorion kontaminaatio-ongelma paheni, kun laboratorioon valikoitui aikaisempaa korkeampia lämpötiloja sietävä bakteeri, joka lisäksi kesti instrumenttien liekityksen ja eli ainakin muutamia tunteja alkoholissa. Viljelmistä identifioidiin *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter* (*Erwinia*), *Flavobacterium*, *Pseudomonas* ja *Torulopsis glabrata*. Nämä kontaminantit pysyivät usein piilevinä sytokiniiniä sisältävillä lisäysalustoilla.

Vaikka kontaminantit eivät ilmene lisäysalustoilla, viljelmät kuitenkin oirehtivat niiden takia. Piilevät kontaminantit tappavat viljelmiä, heikentävät kasvua, aiheuttavat nekroosia (Long *et al.* 1988), muuttavat kasvien morfogeneettistä potentiaalia (de Fossard 1977) ja heikentävät kasvien juurtumista. Ongelmat tulevat laboratoriossa ja lisäyksessä yleensä sitä kiusallisemmiksi mitä kauemmin viljelmiä lisätään (George 1993). Bakterikontaminantit aiheuttavat laboratoriossa myös suuren leviämiskin, sillä niiden on todettu leviävän viljelmästä toiseen työvälaineiden välityksellä. Pääsyy leviämiseen on työvälaineiden puhdistamiseen käytetty etanoli ja liian nopea työvälaineiden liekitys (Boxus & Terzi 1987, Kunneman & Faaij-Groenen 1988). Kontaminaation leviäminen estyy tehokkaasti, kun työvälaineet kuumennetaan kunnolla. Kuumennusaika täytyy olla vähintään 5 sekuntia (Kunneman & Faaij-Groenen 1988).

Mitä aikaisemmin kontaminantit paljastuvat, sitä pienemmiksi muodostavat niiden aiheuttamat tappiot. Lisäysalustassa kontaminantit paljastuvat, kun alustaan lisätään jatkuvasti peptone- (Bacto Difco, 265 mg/l) ja hiivauutetta (Bacto Difco yeast extract, 88 mg/l). Näissä olosuhteissa alustan läpinäkyvyyteen tai agarin pinnalla olevan kondenssiveden sameuteen perustuva tarkastelu paljastaa kontaminanttien läsnäolon (Boxus & Terzi 1988). Piilevien saastuntojen paljastamiseen eivät tavalliset bakteerikasvatuksissa käytetyt alustat sovellu, sillä nämä bakteerit ovat hitaasti kasvavia. Parhaiten kontaminantit löytyivät, kun olosuhteet bakteerien kasvuksi olivat optimaaliset. (Kunneman & Faaij-Groenen 1988). Kontaminanttien paljastamiseen on ke-

hitetty useita eri alustoja (George 1993). Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla piilevien saastuntojen kartoitukseen käytetään nesteistä, auksiinipitoista alustaa vaihtelevilla pH-arvoilla (Uusitalo *et al.* 1993) (Liite 1).

Suurimmat tappiot piilevistä kontaminaatioista aiheutuvat silloin, kun kontaminantti paljastuu vasta versojen juurrutusvaiheessa. Jos juurrutusvaiheessa akuutteina ilmeneviä kontaminantteja ei löydetä ajoissa ja bakteereita sisältäviä viljelmiä lisätään laboratorioissa näennäisesti oireettomana, suuria tappioita on odotettavissa (Boxus & Terzi 1987). Kontaminantit, jotka ovat virulenteimpia juurrutusalustoilla, ovat todennäköisesti tappavia nuorille solukkolisätyille taimille (Boxus & Terzi 1988).

Bakteerien torjunnassa on tärkeää tunnistaa esiintyvät kontaminantit. Antibiootteja käytettäessä on myös määritettävä bakteerien antibiootteriherkkyys. Tietokoneen avustama rasvahappoprofilointiin perustuva tunnistusmenetelmä on kohtalaisen käyttökelpoinen nopea identifiointimenetelmä. Lajitasolla oli määrittämisestä 98 % oikein, alalajitasolla 72 % ja patovar-tasolla noin 50 % (Stead 1988). Uusina menetelminä syyskuussa 1996 Irlannissa pidetyssä kontaminaatioita käsittelevässä kokouksessa mainittiin 1) serologiset menetelmät, kuten ELISA, 2) rasvahappo- ja valkuaisaineprofiilit ja geneettiset menetelmät, kuten 3) PCR- (polymerase chain reaction) sekä AFLP- (amplification fragment length polymorphism) tai RFLP- (restricted fragment length polymorphism) menetelmät (Herman 1996).

Bakteereita on torjuttu solukkoviljelmistä antibiooteilla vaihtelevalla menestyksellä. Poulsen (1988) totesi, että kefotaksiimi ja kefalosporiini olivat tehokkaita omenapuissa esiintyvien bakteerien eliminoinnissa. Suomalaisessa tutkimuksessa niinkään kefotaksiimi sekä rifampisiini todettiin tehokkaiksi omenapuiden bakteeriongelmiin torjujiksi (Savela & Uosukainen 1994). George (1993) on teoksessaan koonnut kirjallisuudesta listan eri antibioottien tehosta ja fyto-toksisuudesta. Antibioottien käytöstä ei kuitenkaan ole saatu aina hyviä tuloksia (Duhem *et al.* 1988).

Oma ongelmansa solukkoviljelmien kontaminantteina ovat fytoplasmat, rikketsiat, spiroplasmat, virukset ja viroidit, joiden olemassaoloa ei aina edes osata epäillä, sillä meristeemiviljelyn ja lämpökäsittelyn tehosta kontaminanttien torjunnassa vallitsee yhä edelleen enimmäkseen liian positiivinen käsitys. Ongelman ratkaisussa on pullonkaulana riittävän herkkien testimenetelmien puute.

## Laukaan tutkimuslaboratorion kontaminaatiot vuoden 1981 jälkeen

MTT:hen perustettiin puutarhakasvien mikrolisäyslaboratorio vuonna 1980 Laukaaseen. Aluksi laboratorio sijaitsi alkeellisessa parakissa kasvihuoneiden välittömässä yhteydessä. Vuonna 1985 laboratorio muutti uusiin tiloihin. Laukaan tutkimus- ja valiotaimiaseman solukkolaboratoriota ja kasvihuonetuotantoa varten on laadittu taimiaineistolain ja pohjoismaisen tuotanto-ohjeen edellyttämä menettelyohje (Uusitalo *et al.* 1993). Laboratoriossa tuotetaan mikrolisäyksellä marjakasvien valiotaimia sekä muuta taimitarhojen tarvitsemaa emotaimiaineistoa sekä jatkokasvatustaimia yli 100 kasvilajin lähes 300 kloonista. Laboratoriossa on vuodesta 1981 lähtien seurattu erilaisten kontaminaatioiden esiintymistä. Tarkemmin laboratoriossa tutkittiin vuosina 1987-1993 omenapuun YP-perusrungossa esiintyviä piileviä bakteerisaastuntoja yhteistyössä Helsingin yliopiston silloisen Kasvipatologian laitoksen kanssa (Savela & Uosukainen 1994).

## Tapausten tarkastelu

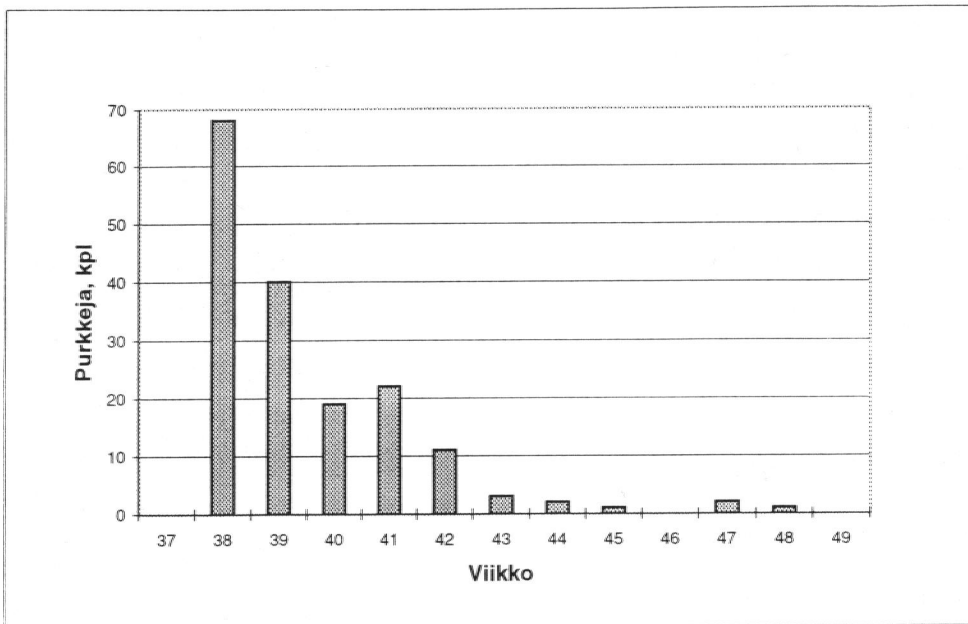
Yleisimmin kontaminaatioita esiintyy viljelmien aloitusvaiheessa erityisesti, kun käytetään avomaalla kasvavia, usein iäkkäitä emokasveja. Kontaminaatioiden esiintymiseen vaikuttaa myös vuodenaika, kasvuympäristön puhtaus sekä aloitusaineiston kuljetus ja mahdollinen

varastointi. Myös eri vuosina kontaminaatioiden määrä vaihtelee jopa samasta kasvivyksilöstä tutkittuna (Savela & Uosukainen 1994).

Bakteerikontaminaatioita on esiintynyt yleisimmin omenapuilla, syysleimulla, pihajasmikkeilla, hortensioilla ja joskus mansikalla. Bakteerikontaminaatioiden oireiksi lisäysviljelmissä on luokiteltu voimakas kalluksen muodostuminen sekä heti aloituksessa että myöhemmin lisäysvaiheessa, pilvimäinen tai pallomainen kontaminaatio siirrosteen tyven ympärillä agarin sisällä, agarin samentuminen, versojen ruskettuminen ja kuivuminen sekä joskus laikut lehdistä ja viljelmien heikko kasvu. Syysleimuilla todettiin viljelmissä versojen halkeilemista ja sen seurauksena voimakasta haavasolukon muodostumista halkeamaan. Juurtumisvaiheessa huono juurtuminen ja taimien mätäneminen on usein ollut bakteerisaastunnan oire.

Myös muut mikro-organismit oirehtivat mikrolisäyksen aikana. Mansikan viherkukkaisuustaudin (MLO) toteamisen yhteydessä ensimmäiset oireet taudin olemassaolosta saatiin viljelmien valkokirjavoitumisesta solukkoviljelyn aikana (Uusitalo & Uosukainen 1988). Saastuntaa ei saatu puhdistetuksi ja saastunut aineisto hävitettiin. Solukkoviljelmissä piilevät virusaastunnat voivat myös olla hyvinkin sitkeitä. Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla löydettiin 1980-luvun lopussa varmennettuun taimituotantoon puhdistetusta 'Senga Sengana' -mansikkalajikkeesta kahdesta kloonista piilevä viruskontaminaatio. Kloonit olivat käyneet meristeemiviljelyvaiheen läpi ainakin seitsemän kertaa.

Pahin kontaminaatio laboratoriossa on kuitenkin ollut punkkikontaminaatio syksyllä 1995. Ensimmäiset vakavat oireet kontaminaatiosta todettiin viikolla 38. Useita viikkoja kasvatushuoneessa olleisiin purkkeihin ilmestyi yhtäkkiä sienikontaminaatiota rajusti lisääntyvässä määrin. Kontaminaatio alkoi ensimmäisen kasvatushuoneen ovensuusta ja levisi nopeasti koko huoneeseen. Kontaminaation leviämistavan perusteella osattiin epäillä punkkia, joka sittemmin tunnistettiin Jokioisilla viljapunkiksi. Miten punkki pääsi laboratorioon on jäänyt arvailujen varaan. Syyksi epäillään toistuvien sähkökatkosten aiheuttamaa häiri-



**Kuva 1.** MTT:n Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla syksyllä 1995 ilmenneen punkkisaastun-  
nan esiintymisrunsaus saastuneiden viljelypurkkien määrinä epidemian kuluessa.

ötä ilmastoinnin säädöissä. Laboratorion il-  
mastoinnin todettiin olevan vajaateholla eikä  
laboratoriossa ollut menettelyohjeissa edelly-  
tettyä ylipainetta.

Punkkisaastunna toteamisen jälkeen kes-  
kiviikkona 20.9.1995 kasvatushuone julistet-  
tiin välittömästi karanteeniin ja huoneessa  
käynnistettiin saneeraus. Varotoimena kasva-  
tushuoneessa käytettiin eri työvaatteita kuin  
ulkopuolella. Lisäksi henkilöstö, joka osallistui  
huoneen saneeraustöihin, ei tehnyt muita teh-  
täviä laboratoriossa. Kontaminoituneet purkit  
poistettiin laboratorion välittömästi ja au-  
toklavoitiin. Loput viljelmäpurkit pyyhittiin ul-  
kopinnoilta 75 % etanoli-Neo-Amisept-liuok-  
sella sekä suljettiin huolellisesti talouskelmulla  
ja kuminauhoilla kontaminaation leviämisen  
estämiseksi. Huoneen kaikki mahdolliset pin-  
nat puhdistettiin huolellisesti Germa-Cert -  
desinfiomisaineella. Seinät sumutettiin 75 % eta-  
nolilla. Kasvatushuone tarkastettiin päivittäin  
ja kontaminaatiot poistettiin. Seuraavalla vii-  
kolla huoneen desinfiointi uusittiin ja purkit  
puhdistettiin uudelleen etanoli-Neo-Amisept-  
tilla, minkä lisäksi kelmut vaihdettiin parafil-  
miin. Hyllyille asennettiin kaksipuoliset teipit,  
joiden päälle levitettiin ristikköksi hyönteisten  
pyydystämiseen tarkoitettua siniliimapaperia ja  
purkit sijoiteltiin siten, että ne eivät kosket-

taneet toisiinsa. Myös huoneen kynnykset ja ovien  
ja ikkunoiden karmit päällystettiin yhte-  
näisellä siniliimapaperilla. Varmuustoimenpi-  
teenä myös muiden kasvatushuoneiden oville  
ja hyllyille asennettiin siniliimapaperit. Kaikista  
muistakin huoneista tärkeimpien kasvilajien  
viljelmät suojattiin parafilmikalvoilla. Myös yl-  
läpitoiviljelmien varastot siivottiin ja purkit var-  
mistettiin parafilmikalvoilla.

Pahin tuho viljelmissä ajoittui kahden en-  
simmäisen viikon ajalle, jonka jälkeen saas-  
tuneiden purkkien määrä väheni nopeasti  
(Kuva 1). Viimeinen kontaminoitunut purkki  
löytyi viikolla 48. Vuodenvaihteessa kontami-  
naatio-ongelma todettiin voitetuksi. Punkin ai-  
heuttaman vahingon markkamääräinen arvo  
oli 51 000 mk.

Punkit ovat vaarallisimpia solukkoviljelmää  
uhkaavia tuholaisia ja leviävät helposti viljel-  
mästä toiseen. Laukaassa syksyllä 1995 esiin-  
tynyt viljelpunkkikontaminaatio pääsi leviä-  
mään laboratorion ilmastointilaitteiden sää-  
tötekniikan häiriön vuoksi. Ongelma saatiin  
rajatuksi yhteen kasvatushuoneeseen, eikä se  
vuodenajasta johtuen aiheuttanut mainittavaa  
häiriötä laboratorion tuotantotoimintaan. Ke-  
vättälvella vastaava saastunta olisi todennäköi-  
sesti aiheuttanut satojentuhansien markkojen  
vahingot. Avaintekijä ongelman leviämisen es-

tämisessä oli laboratoriohenkilöstön valppaus ja huolellisuus.

Eniten työtä ja epäonnistumisia aiheuttavat piilevät bakteerikontaminaatiot, jotka saattavat häiritä kasvien lisääntymistä ja erityisesti juurtumista. Onkin tarpeen arvioida uudelleen syytä useiden vaikeasti juurrutettavien kasvien juurtumisongelmiin. Monilla kasveilla syyinä voi olla juurtumista haittaava bakteeri.

## Yhteenveto

Kontaminaatiot voidaan pitää kurissa, kun ne havaitaan ajoissa ja estetään niiden leviäminen (Künneinan & Faaij-Groenen 1988). Täysin puhdas kasvin solukko viljelmä on ilmeisesti epärealistinen tavoite, sillä käytännössä solukkolisätyt taimet eivät useinkaan ole vapaita taudeista. Uskomus, että meristeemiviljely automaattisesti poistaisi mikro-organismit kasvi-aineistoista on johtanut virus-, bakteeri- ja fytoplasmasaastuneiden kasvien levittämiseen laboratorioista tuottajille. Laboratorioiden on otettava kontaminantit huomioon, testattava viljelmät toistuvasti ja arvioitava löytyneiden

kontaminanttien merkitys. Kategoriseen kaikkien kontaminanttien torjuntaan ei ole aina tarvetta, sillä osa kontaminanteista saattaa olla jopa hyödyllisiä.

Jokaisessa kasvisolukkoja viljelevässä laboratoriossa piilee kontaminaatio. Jos se ei ole vielä tullut esille, jonain päivänä se sen tekee. Tämä on syytä ottaa huomioon laboratorioiden menettelyohjeita laadittaessa ja suunniteltaessa laboratoriokohtaista riskien hallintaa. Kuten Laukaassa saadut kokemukset osoittavat, hyvinkin tekninen varustus voi pettää ja seuraukset saattavat olla tuhoisat. Vahinko ei riipu laboratorion luonteesta. Tuho voi tapahtua yhtäläillä tutkimus- kuin tuotantolaboratorioissakin, ja paha punkkisaastunta voi romuttaa tieteellisen työn siinä missä tuotantolaboratorion taloudenkin.

Kontaminaatioiden torjunnassa on oleellista, että ne havaitaan ajoissa. Laboratorion toiminnassa on jatkuvasti huomioitava kontaminaation leviämisen mahdollisuus ja tarkkailtava viljelmiä ja ympäristöä säännöllisesti sen varalta. Vaikka tarkkailu enimmäkseen voi tuntua turhalta ja aikaavievältä, se on kuitenkin ongelmatilanteiden varalta hintansa arvoista.

## Kirjallisuus

**Blake, J.** 1988. Mites and thrips as bacterial and fungal vectors between plant tissue cultures. *Acta Horticulturae* 225: 163–166.

**Boxus, Ph. & Terzi, J. M.** 1987. Big losses due to bacterial contaminations can be avoided in mass propagation schemes. *Acta Horticulturae* 212: 91–93.

**Boxus, Ph. & Terzi, J. M.** 1988. Control of accidental contaminations during mass propagation. *Acta Horticulturae* 225: 189–193.

**Constantine, D. R.** 1986. Micropropagation in the commercial environment. In: Withers, L. A. & Alderson, P. G. (eds). *Plant tissue culture and its agricultural application*. London: Butterworths. p. 175–186. ISBN 0-407-00921-3

**Debergh, P. C. & Vanderschaeghe, A. M.** 1988. Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue cultures. *Acta Horticulturae* 225: 77–81.

**Duhem, K., Le Mercier, N. & Boxus, Ph.** 1988. Difficulties in establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. *Acta Horticulturae* 225: 67–75.

**Fossard, R. A. de,** 1977. Conclusion: tissue culture in horticulture - a perspective. *Acta Horticulturae* 78: 455–459.

**George, E. F.** 1993. *Plant propagation by tissue culture Part 1. The technology*. 2nd ed. Edington: Exegetics Ltd. 574 p. ISBN 0-9509325-4-X



- Hennerty, M. J. , Upton M. E., James, D. J., Harris, D. P. & Eaton, R. A.** 1988. Microbial contamination of *in vitro* cultures of apple rootstock M26 and M9. *Acta Horticulturae* 225: 129–137.
- Herman, E. B.** 1996. Special meeting issue: International symposium on bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. *Agricell Report* 27: 25–28.
- James, D. J. and Thurbon, I. J.** 1978. Culture *in vitro* of M9 apple. Reports of East Malling Research Station for 1977. p. 176–177.
- Klocke, J. A. & Myers, P.** 1984. Chemical control of thrips on cultured *Simmondsia chinensis* (jojoba) shoots. *HortScience* 19: 400.
- Kunneman, B. P. A. M. & Faaij-Groenen, G. P. M.** 1988. Elimination of bacterial contaminants: A matter of detection and transplanting procedures. *Acta Horticulturae* 225: 183–188.
- Leifert, C., Waites, W. M., Nicholas, J. R. & Keetley, J. W.** 1990. Yeast contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 471–476.
- Leifert, C., Ritchie, J. & Waites, W. M.** 1991a. Contaminants of plant tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7: 452–469.
- Leifert, C., Camotta, H., Wright, S. M., Waites, B., Cheyne, V. A. & Waites, W. M.** 1991b. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choysia* and *Delphinium* cultures using antibiotics. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 307–330.
- Long, R. D., Curtin, T. F. & Cassells, A. C.** 1988. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal cultures. *Acta Horticulturae* 225: 83–91.
- Murashige, T & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Poulsen, G. B.** 1988. Elimination of contaminating micro-organisms from meristem culture of apple rootstock M26. *Acta Horticulturae* 225: 193–197.
- Reustle, G., Mann, M. & Heintz, C.** 1988. Experience and problems with infections in tissue culture of grapevine. *Acta Horticulturae* 225: 119–128.
- Savela, M.-L. & Uosukainen, M.** 1994. Characterization of bacteria contaminating tissue cultures of apple rootstock 'YP'. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 368–376.
- Stead, D. E.** 1988. Identification of bacteria by computer-assisted fatty acid profiling. *Acta Horticulturae* 225: 39–46.
- Uusitalo, A. & Uosukainen, M.** 1988. Mansikan viherkukkaisuustauti. *Puutarha* 91: 106–108.
- Uusitalo, A., Uosukainen, M. & Savela, M.-L.** 1993. Menettelyohjeet. Maatalouden tutkimuskeskus, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema. Jokioinen: 19 p.

MTT:n Puutarhantuotannon tutkimuslaitoksen Laukaan tutkimus- ja valiotaimiaseman solukkolaboratoriossa käytetyt viljelmien bakteeritestausmenetelmät (Uusitalo *et al.* 1993).

**Menetelmä A.** Bakteeritestsauksissa käytetään koko lisäysvaiheen ajan bakteerien kasvua suosivia alustoja. Alustoihin lisätään Bacto peptone (0,27 g/l). Jatkuva seuranta. Tarvittaessa näytteenottoja.

**Menetelmä B.** Viljelmistä tehdään toistuvia maljaviljelytestejä seuraavilla kolmella viljelyalustalla:  
Nutrient agar (OXOID)  
Nutrient agar (OXOID) + 5 % sakkaroosia  
Peruna-agar (PDA 39 g/l)

**Menetelmä C.** Piilevien kontaminaatioiden jäljityksessä käytetään nestemäistä alustaa vaihtelevilla pH-arvoilla. Viljelmistä otettuja versonpaloja viljellään nestemäisellä viljelyalustalla jatkuvassa liikkeessä noin kahden kuukauden ajan. Viljelyn aikana samentuvista viljelmistä suoritetaan siirrostukset bakteerin kasvatusalustoille (kohta B) tarkempaa määrittystä varten.

---

Nestemäisen bakteeritestausalustan aineosat	Määrät
Nestemäinen juurrutuslusta ilman agaria	1 l
Bacto peptone	0,5 g/l
Hiiuvautetta (Bacto Yeast Extract)	4 g/l
Sakkaroosia	50 g/l
Auksiinia (IBA)	4 mg/l
pH	4,0 – 5,3 – 6,5

---



# Bakteerien hallinta ja genotyyppi- vaihtelut versonkasvussa antibiootein käsitellyissä pietaryrtin (*Tanacetum vulgare* L.) solukkoviljelmissä

---

Marjo Keskitalo<sup>1,2</sup>, Arja Pohto<sup>1</sup>, Mervi-Leena Savela<sup>1</sup>,  
Jari P. T. Valkonen<sup>1</sup>, James Simon<sup>2</sup> & Eija Pehu<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Kasvintuotantotieteen laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto  
e-mail: marjo.keskitalo@pp.kolumbus.fi  
<sup>2</sup> Purdue University, Center for New Crops and Plant Products,  
Department of Horticulture, U.S.A.

Kymmenen Gram-negatiivista bakteerikantaa eristettiin pietaryrtin (*Tanacetum vulgare* L.) *in vitro* versoviljelmistä kokeessa, jossa verrattiin eri genotyyppisiä. Viisi kantaa kuului Enterobacteriaceae-bakteereihin, kolme fluoresoiviin Pseudomonas-bakteereihin ja kaksi muuta olivat määrittämättömiä aerobisia bakteereita. Gentamysiini (50 mg<sup>-1</sup>) ja rifampisiini (25 mg<sup>-1</sup>) yhdessä käytettynä estivät kaikkien bakteerien kasvun, mutta mikään testatuista antibiooteista (ampisilliini, kefotaksiimi, rifampisiini, gentamysiini ja streptomysiini) ei yksin torjunut kaikkia bakteereita. Antibiootit erosivat toisistaan versoviljelmien haittaavien vaikutustensa suhteen. Kun antibioottipitoisuus oli alle 180 mg<sup>-1</sup>, kefotaksiimi oli vähiten haitallista, rifampisiini toiseksi haitallisinta ja gentamysiini haitallisinta. Pitoisuuden ollessa välillä 180-230 mg<sup>-1</sup>, kefotaksiimi ja rifampisiini vaikuttivat samalla lailla, ja pitoisuuden ylittäessä 230 mg<sup>-1</sup> kefotaksiimi oli fytotoksisempaa kuin rifampisiini. Antibioottipitoisuuden kasvaessa vaikutus viljelmien kasvunopeuteen, versojen määrään, pituuteen ja kasvuun oli lineaarista tai kvadraattista. Kasvatusalustaan lisätty kefotaksiimi tai rifampisiini lisäsi merkittävästi kasvien juurtumista yhdellä (Tv 5) testatuista kolmesta genotyypistä, verrattuna kasvatusalustaan, joka ei sisältänyt antibioottia (kontrollialusta). Gentamysiini ja rifampisiini yhdessä vähensivät viljelmien kasvua ja versojen pituutta kontrollialustaan verrattuna, mutta eivät yhtä paljon kuin gentamysiini yhdessä kefotaksiimin kanssa. Alustalla, johon oli lisätty gentamysiiniä, pietaryrtin genotyyppi vaikutti viljelmien kasvunopeuteen, versojen kasvuunlähtöön ja pituuteen sekä alustan pH:n vaihteluihin. Gentamysiinipitoisuuden noustessa kalluksen kasvu heikkeni lineaarisesti. Sen sijaan gentamysiini ja rifampisiini yhdessä lisäsivät kalluksen kasvua merkittävästi.

*Avainsanat:* gentamysiini, Gram-negatiiviset bakteerit, rifampisiini, versoviljely

# Abstract

## Control of bacteria and genotype dependent alterations of plant growth in tissue culture of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) treated with antibiotics

Marjo Keskkitalo<sup>1,2</sup>, Arja Pohto<sup>1</sup>, Mervi-Leena Savela<sup>1</sup>,  
Jari P. T. Valkonen<sup>1</sup>, James Simon<sup>2</sup> & Eija Pehu<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> University of Helsinki, Department of Plant Production, P.O. BOX 27,  
FIN-00014 University of Helsinki  
e-mail: marjo.keskkitalo@pp.kolumbus.fi  
<sup>2</sup> Purdue University, Center for New Crops and Plant Products,  
Department of Horticulture, U.S.A.

Ten strains of bacteria were isolated from the *in vitro* shoot cultures of different tansy genotypes (*Tanacetum vulgare* L.). All isolates were Gram-negative. Five isolates belonged to the Enterobacteriaceae, three to fluorescent *Pseudomonas*, and two to other aerobic bacteria. The combined treatment with gentamicin (50 mg l<sup>-1</sup>) and rifampicin (25 mg l<sup>-1</sup>) prevented the growth of all bacteria, whereas none of the tested antibiotics (ampicillin, cefotaxime, rifampicin, gentamicin or streptomycin) controlled all bacteria when used alone. The antibiotics ranged, based on their increasing adverse effects on shoot cultures, as follows: cefotaxime, rifampicin, and gentamicin when antibiotic concentration was below 180 mg l<sup>-1</sup>. Between 180 and 230 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime and rifampicin had similar effects, and above 230 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime was more phytotoxic than rifampicin. Increased concentrations of antibiotics caused usually linear or quadratic changes to growth rate, shoot number, shoot height, and the initiation of shoot growth. Compared with the growth in antibiotic-free media, one genotype (Tv5) of the three genotypes tested had significantly higher percentage of rooted plants when treated with cefotaxime or rifampicin. Compared with the antibiotic-free controls, the growth rate and length of shoots in the media containing gentamicin combined with rifampicin was reduced, but less than in media with the combination of gentamicin with cefotaxime. Growth rate, initiation of shoot growth, shoot height, and the changes in pH of the medium were genotype dependent during culture in a medium containing gentamicin. Increased concentration of gentamicin decreased the growth rate of callus linearly, whereas gentamicin used together with rifampicin increased callus growth significantly.

*Key words:* gentamicin, Gram-negative bacteria, rifampicin, shoot culture

# Hybridihaavan mikrolisäys - kloonien monistuvuus ja juurtumisalttius

---

Martti Lepistö

*Metsänjalostussäätiö, Viljatie 4 A 5; 00700 Helsinki*

Haavan (*Populus tremula*) mikrolisäystutkimuksia on tehty jo 1960-luvun lopulta lähtien, mutta menetelmä ei ole vielä toistaiseksi saavuttanut laajaa käyttöä. Metsänjalostussäätiö aloitti yhteistyössä metsäteollisuuden kanssa haavan mikrolisäyksen tutkimuksen 1995 tavoitteena koe- ja viljelyaineiston tuottaminen. Haapakokeista ja hybridihaapaviljelyksistä valittiin paperiteknisten analyysien jälkeen monistukseen noin 30 kloonina. Lisäyksessä käytettiin lähtökohtana tunnettuja ravintoalustoja ja niiden muunnoksia. Kloonien väliset erot varsinkin viljelmien monistumaan lähdössä ja monistumisessa, mutta myös juurtumisessa olivat suuret. Hyvin monistuva versoviljelelmä saatiin aikaan 2-4 kuukaudessa. Useissa tapauksissa aikaa kului lähes puoli vuotta (6-8 siirrostuskertaa). Parhaiten monistuva klooni tuotti neljässä kuukaudessa lähes 2400 versoja, kun heikoimmat olivat samassa ajassa tuottaneet vain joitakin kymmeniä versoja. Vaikeimmin lisäävä klooni ei ole lähtenyt monistumaan edes 13 siirrostuksen jälkeen. Lisäykseen otetuista 29 kloonista 27 monistui lokakuussa 1996 ja 13 oli juurtunut tai juurtumassa. Juurtumisprosentti oli 20-91. Vaikka monistumista ja juurtumista voidaan edelleen parantaa menetelmiä kehittämällä, johtavat kloonien geneettiset erot kuitenkin lopulta väistämättä hyvin vaihteleviin klooneittaisiin taimimääriin. Jatkossa onkin harkittava, kuinka hankalia klooneja kannattaa pitää monistuksessa, koska niiden taimimäärät suhteessa muihin jäävät kovin vähäisiksi.

*Avainsanat:* hankasilmut, kärkisilmut, *Populus tremula*, puuvartiset kasvit, solukkoviljely

# Abstract

## Micropropagation of hybrid aspen - multiplication and rooting ability of clones

Martti Lepistö

*Foundation for Forest Tree Breeding, Viljatie 4 A 5, FIN-00700 Helsinki*

Micropropagation studies of aspen (*Populus tremula*) were initiated at the end of 1960s, but the technique has not so far been applied widely. The Foundation for Forest Tree Breeding began studies on micropropagation in 1995 in co-operation with the forestry industry aiming at production of material for research use and cultivation. After phenotypic selection in hybrid aspen experiments and stands and followed by paper technological analyses, 30 clones were chosen for clonal micropropagation. Commonly used culture media and modified versions were used. Large differences between clones were observed particularly in the initiation and the rate of multiplication, but also in rooting. It took 2-4 months to establish abundantly multiplying shoot culture, but in many cases nearly half a year (6-8 subcultures) was needed to establish a culture. The best clone produced nearly 2400 shoots in four months while the poorer ones had over the same period produced as few as ten shoots. The most recalcitrant clone has not started to multiply after 13 subcultures. By October 1996 multiplication had been achieved with 27 of the 29 clones included and rooting had begun with 13 clones. Rooting ranged between 20-91 %. Although multiplication and rooting can be further improved, genetic differences between clones account for very different numbers of plantlets. It is therefore important to consider the limit for including very recalcitrant clones in multiplication, as the plantlet yields for these clones will be very small.

*Key words:* axillary buds, *Populus tremula*, terminal buds, tissue culture, woody plants

## Johdanto

Ensimmäisiä puuvartisias kasveja, joilla mikrolisäys onnistui, oli Amerikan mantereella kasvava meikäläisen haavan lähisukulainen *Populus tremuloides* L. (Winton 1968). Myös haavan (*P. tremula* L.) mikrolisäyksen perusteet selvitettiin pian tämän jälkeen (Winton 1971). Vaikka näistä perusselvityksistä on kulunut jo kohta kolme vuosikymmentä, haapasektioon kuuluvien lajien tai hybridien mikrolisäys ei ole toistaiseksi saavuttanut kovin laajoja mittasuhteita. Käytännön sovellusyritykset alkoivat Saksasta 1980-luvun alusta (Hessische Forstliche Versuchsanstalt 1985). Siellä pyrittiin monistamaan hybridihaapaa (*P. tremula* x *tremuloides*) nopeakasvuisena puulajina viljelykyttöön. Alkuvaiheessa oli vaikeuksia saada lisäysresepti toimimaan monilla kloonilla (Ahuja 1982). Viime vuosina kiinnostus haavan mikrolisäykseen on virinnyt uudelleen; mm. Yhdysvalloissa on pyritty kehittämään kaupallisessa mittakaavassa toimivaa mikrolisäysmenetelmää hybridille *Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx. (Son *et al.* 1991). Myös Kiinassa mikrolisäyksen soveltaminen *Populus*-suvun useiden lajien ja hybridien tuottamiseen on alkamassa. Vuosituotantomäärä Pekingin metsäntutkimuslaitoksessa on noin 80 000 mikrotainta (Lubrano 1992).

Suomessa on viljelty ristetyssiemenestä tuotettua hybridihaapaa *P. tremula* x *P. tremuloides* 1950-luvun alkupuolelta alkaen. Kun lehtipuiden viljelystä ei ollut aiempaa kokemusta eikä viljelyksiä varauduttu suojaamaan myyriltä, jäniksiltä ja hirviltä, osa viljelyksistä tuhoutui tai jäi vajaapuustoisiksi (Lepistö 1996, Mikola 1996). Nyt hybridihaavan viljely on uudelleen laajenemassa, koska haavalla on todettu olevan useita etuja paperin valmistuksessa, ja myös haapapuusta maksettava hinta on nousussa.

Hybridihaavan mikrolisäyksestä on myös Suomessa kiinnostuttu viime vuosina (Ryynänen 1991). Mikrolisäysmenetelmän edelleenkehittäminen ja koe- sekä viljelyaineiston tuottaminen on aloitettu Metsänjalostussäätiön ja Metsäliitto/Metsä-Serlan yhteistyönä v. 1995. Tavoite on hyvin käytännönläheinen, mutta

erityisselvitystä vaativana ongelmana ovat kloonittaiset erot monistuvuudessa ja juurtumismaltiltuudessa:

## Aineisto ja menetelmät

Aineistona käytettiin 1950-70-luvuilla perustetuista hybridihaavan jälkeläiskokeista ja alkuperiltään tunnetuista metsiköistä valittuja puuta. Pääosa kokeista oli Metsäntutkimuslaitoksen, osa Metsänjalostussäätiön suunnittelema. Valintaan sopivien metsiköiden seulonnassa käytettiin apuna Metsäntutkimuslaitoksen 1970-luvun alussa käynnistämää hybridihaapametsiköiden tutkimusta. Kokeista ja metsiköistä valittiin 300 hyväkasvuista, suoraa, ohutkoksista ja tervettä puuta. Alustavasti valituista puista 246 oli hybridihaapoja, 53 *P. tremula*-haapoja ja 1 *P. tremuloides*. Valintakohteet ja niistä valitut puumäärät on esitetty taulukossa 1.

Metsä-Serla Oy teetti alustavasti valituista puista paperiteknisiä ominaisuuksia koskevia puuaineanalyseja, joiden perusteella valittiin 29 kloonia lisäykseen sekä näiden lisäksi muutamia kloonieja vertailuaineistoksi.

Aloituspohjana olivat kärki- tai hankasilmut, jotka preparoitiin lepotilassa kerätyistä oksista steriloinnin jälkeen. Silmuista poistettiin silmusuomut ja uloimmat lehden aiheet, ja tyvelle jätettiin noin 1 mm:n kappale varren solukkoa (Christie 1978, Barocka *et al.* 1985, Ahuja 1986, Ryynänen 1991). Aloituksia varten testattiin kahdeksaa eri kloonia viidellä erityyppisellä alustalla. Alustoista kaksi oli Ahujan (1986) kehittämien alustojen versioita, kaksi WPM-pohjaisia (Lloyd & McCown 1980) ja yksi MS-alustan (Murashige & Skoog 1962) muunnelma. Kokeeseen preparoitiin 10 silmua/alusta, yhteensä 50 silmua/klooni. Viljelmät aloitettiin 2.-22.11.1995. Lepotilassa olevien silmujen lisäksi käytettiin viljelmien aloitukseen myös puhjenneista silmuista kehittyviä versoja.

Monistusvaiheessa käytettiin hankasilmujen piteneeseen perustuvaa menetelmää, jossa uudet versot kehittyvät lehtihankojen silmuista. Pieni osa versoista on saattanut muo-



**Taulukko 1.** Haavan mikrolisäyksen kehittämiseen ja viljelyaineiston tuottamiseen valittu perusaineisto.

Kohde	Paikkakunta	Maantieteellinen sijainti			Puita valittu
		leveys	pituus	korkeus, mpy	
Koe 36	Anjalankoski	60°46'	26°59'	46 m	16 kpl
Koe 41	Vihti	60°20'	24°26'	60 m	33 kpl
Koe 77	Vaajakoski	62°15'	25°56'	n. 85 m	33 kpl
Koe 112	Hollola	61°06'	25°24'	n. 85 m	18 kpl
Koe 153	Lapinjärvi	60°37'	26°10'	25 m	17 kpl
Koe 198	Lempäälä	61°20'	23°49'	n. 80 m	26 kpl
Koe 199	Pernaja	60°32'	25°57'	n. 20 m	24 kpl
Koe 203	Lapinjärvi	60°40'	26°11'	25 m	38 kpl
Koe 204	Lapinjärvi	60°37'	26°11'	25 m	14 kpl
Koe 700	Nurmijärvi	60°30'	24°42'	100 m	12 kpl
Koe 909	Nurmijärvi	60°30'	24°42'	100 m	8 kpl
Metsikkö	Loppi, Haapastens.	60°37'	24°26'	120 m	21 kpl
Metsikkö	Vihti	60°33'	24°31'	110 m	12 kpl
Metsikkö	Vihti, Oravala	60°22'	24°16'	n. 40 m	6 kpl
Metsikkö	Vihti, Selki	60°28'	24°28'	n. 45 m	10 kpl
Metsikkö	Hattula	61°02'	24°27'	n. 90 m	12 kpl
Yhteensä					300 kpl

dostua adventiivisilmuista varren tyveltä. Perusravintoliuoksina käytettiin aluksi MS- ja WPM-alustojen muunnoksia, jatkossa päädyttiin jälkimmäiseen. Siirryttäessä aloitusvaiheesta monistusvaiheeseen sytokiniinipitoisuutta ( $N^6$ -bentsyyliadeniini, BA) vähennettiin noin viidennekseen. Kloonien monistumiskykyä seurattiin ajan funktiona.

Versojen juurrutus voidaan koivun mikrolisäyksestä saadun kokemuksen perusteella tehdä joko *in vitro* agaralustalla laboratorioolosuhteissa tai *ex vitro* esim. vermikuliitissa ns. propagaattoreissa (Salonen 1994). Juurrutuskokeet aloitettiin jo helmikuussa 1996, mutta alkuvaiheessa päähuomio kiinnitettiin juurrutusmenetelmien vertailuun. Elokuussa 1996 järjestettiin juurrutuskoe, jossa vertailtiin seitsemää menetelmää ja kolmea kloonia. Menetelmistä kolme perustui juurrutukseen *in vitro*-oloissa (2 MS-pohjaista ja 1 WPM-pohjainen alusta). Neljä perustui juurrutukseen eisteriileissä olosuhteissa propagaattoreissa ver-

mikuliitti- tai turve-vermikuliittialustalla. Versoja juurrutettiin sekä ilman aukuksia että auksiinien kanssa ( $\alpha$ -naftaleenietikkahappo, NAA ja indoli-3-voihappo, IBA). Toistoja oli kokeessa neljä ja versoja 40 kpl/toisto ja menetelmä. Tulokset analysoitiin varianssianalyysillä. Kloonien juurtumiskykyä seurattiin myös koko lisäysprosessin ajan ja useiden kloonien juurtumisaltuus testattiin sekä *in vitro* että eisteriileissä olosuhteissa.

## Tulokset

### Aloitukset ja monistuminen

Kahdeksan kloonin aloitusaineistoa testattiin viidellä eri alustalla marras-joulukuussa 1995. Silmujen elävyys ja kontaminaatioiden osuus inventoitiin ensin noin kuukauden, ja lopullisesti kahden kuukauden kuluttua kokeen

**Taulukko 2.** Haapakloonien mikrolisäyksen aloitusaineistojen menestyminen eri ravintoalustoilla.

Klooni	Monistuvia silmuja/alusta, kpl					Monistunut yht. kpl/%	Kontam. %
	WPM-C	WPM-3	MS-H	ACM-V	ACM-2		
A	2	1	5	6	0	14/28	42
C	0	0	0	0	0	0/0	30
D	0	0	0	0	0	0/0	40
E	5	0	3	0	0	8/16	60
AA	0	0	0	0	0	0/0	38
AB <sup>1</sup>	6	5	4	7	4	26/52	46
F <sup>2</sup>	0	1	0	1	0	2/7	33
AC	0	0	0	0	0	0/0	44
Keskim.	1,6	0,9	1,5	1,8	0,5	6,3/12,6	41,6

<sup>1</sup> Klooni AB on *P. tremuloides*

<sup>2</sup> Aloitusilmujen määrä 27 kpl

käynnistämisestä, jolloin oli nähtävissä monistumaan lähtevien osuus. Tulokset jälkimmäisestä inventoinnista on esitetty taulukossa 2. Infektoituneiden osuus lisääntyi jälkimmäisen kuukauden aikana 19:sta 42 prosenttiin ja kuolleiden osuus vastaavasti 23:sta 46 prosenttiin. Monistumaan lähti 12,6 % silmuista. Lähtöaineiston heikohko kunto vaikutti osaltaan menetyksiin.

Lisäystyön yhteydessä kertyi tarkempaa tietoa klooniin monistumisen alkamiseen kuluva ajasta ja tarvittavista siirrostuskerroista. Siirrostusten välinen aika oli yleensä 3-4 viikkoa. Taulukossa 3 on esitetty lisäystyöhön otettujen klooniin versomäärien kehitys seitsemän kuukauden aikana. Eri klooniin versotuotannon erot ovat huomattavan suuret. Vertailua vaikeuttaa kuitenkin eri vuodenaikoina (marraskuun 1995 ja kesäkuun 1996 välillä) tehdyt aloitukset ja muutamissa tapauksissa aloitusten uusiminen. Nyt lisäyksessä olevista klooneista 4 on aloitettu marras-joulukuussa 1995, 10 tammi-helmikuussa ja 13 huhti-kesäkuussa 1996. Yhdellä klooniilla (B) aloitukset tehtiin juurivesojen silmuista.

Kaikkiaan monistuviksi voidaan katsoa lokakuussa 1996 tehdyn tilannekatsauksen mukaan 27 kloonia sillä hetkellä mukana olleista

29:stä. Parhaiten ovat monistuneet klooniin A, B, I, N, U, V, Z ja Å. Ehkä näitäkin paremmin monistui vertailuaineistona ollut *P. tremuloides* -klooni AB, mutta se ei kuulunut varsinaiseen lisäysohjelmaan. Klooniin R ja W aloitusaineisto kuoli kokonaan ja vaikeasti monistettavia olivat lisäksi klooniin C ja L (Taulukko 3).

## Juurutus

Elokuussa 1996 järjestetyssä juurutuskokeessa olivat mukana klooniin A, B ja I. Klooniin A versoista juurtui keskimäärin 77,1 %, klooniin B 89,6 % ja klooniin I 83,5 %. Klooniin A ja B välinen ero osoittautui tilastollisesti merkitseväksi ( $p < 0,001$ ). Klooniin B (84-94 %) ja I (75-90 %) versot juurtuivat hyvin kaikissa tutkituissa olosuhteissa. Klooni x juurutusmenetelmä interaktiota ei esiintynyt. Samassa kokeessa testattiin myös mainittujen klooniin mahdollisia eroja kasvuunlähdessä juurtumisen jälkeen. Tilastollisesti merkitseviä eroja ei esiintynyt.

Juurutumistietoa ei ole käytettävissä kaikista monistuksissa olleista klooneista, koska suuri

**Taulukko 3.** Lisäykseen valittujen kloonien versomäärien kehitys haapahankkeessa.

Klooni	Silmuja aloit.	Versomäärän kehitys, kpl (kumulatiivinen)						
		1 kk	2 kk	3 kk	4 kk	5 kk	6 kk	7 kk
A	50	14		180	370	680	2450	
B	32	110	190	800	2350	3895	4940	
C	67	13			15	20	20	
D	66	23			80	160	250	
E	50	8			5	50	120	170
AB	50	26		430	820	3500	- <sup>1</sup>	
F	27	2			20	60	100	250
G	21	4	20	40	100	150	150	200
H	40	17	40	60	80	180	480	700
I	43	27		95	320	1100	2200	2300
J	40	35	130	220	220	420	450	500
K	61	3		20	25	40	150	150
L	60	2		1	7	10	10	10
M	40			8	40	80	150	300
N	40			40	230	320	500	500
O	60			1	8	17	30	60
P	26	6	10	20	100	200	400	
Q	20	1				5	10	
R	5	5	7	-				
S	40	25	40	40	40	40		
T	20	30	20	20	20			
U	40	25	40	100	900			
V	30	60	60	100	400	900		
W	21		4	-				
X	20		10	10	20	30		
Y	49	7		10	10	30		
Z	40	26	200	350	700			
Å	32			40	70			
Ä	33	23		200	700			
Ö	20			30	50			

<sup>1</sup> *P. tremuloides*, lisäystä ei jatkettu

**Taulukko 4.** Hybridihaapakloonien juurtumistuloksia mikrolisäyksessä Haapastensyrjässä v.1996.

Klooni	Lähtöaineisto	Juurtunut			
		kpl	% <i>in vitro</i>	% <i>ex vitro</i>	keskim. %
A <sup>1</sup>	6203	3530	69,5	41,1	56,9
B <sup>1</sup>	6152	4954	85,6	79,5	80,5
D	328	64	19,5		19,5
E	285	108	37,9		37,9
F	510	233	45,7		45,7
H	381	346	90,8		90,8
I <sup>1</sup>	3776	3075	89,3	79,6	81,4
J	654	380	56,9	61,1	58,1
M	196	153	78,1		78,1
N	756	457	51,9	83,4	60,4
Yht./ ka.	19241	13300			69,1

<sup>1</sup> Juurtumistulokset ilman edellämainitun kokeen tuloksia

osa klooneista tuli lisäykseen vasta touko-kesäkuussa -96. *Ex vitro* -juurrutus olisi edullisempi vaihtoehto, koska sitä käytettäessä voidaan aloittaa mikrolisättyjen versojen totutus kasvihuoneolosuhteisiin. *Ex vitro* -juurrutus propagaattoreissa ei kuitenkaan sovi kaikille klooneille, vaan osa on pakko juurruttaa laboratoriossa *in vitro*. Käytännössä joudutaan testaamaan suuri osa klooneista kummallakin menetelmällä parhaan juurrutusvaihtoehdon löytämiseksi. Taulukossa 4 on tuloksia 10 kloonin juurruttamisesta, viidestä kloonista on tietoa molemmista menetelmistä.

Hyvin juurtuviksi osoittautuivat kloonit B, H ja I, joilla juurtuminen oli yli 80 %. Heikosti juurtuvien kloonien D, E ja F tulosta pitäisi voida parantaa menetelmäkehittelyin, koska 19-45 prosentin juurtumistulos on käytäntöön sovellettavaksi liian alhainen ja aiheuttaa suurta versoaineiston hävikkiä.

## Tulosten tarkastelu

Kloonien väliset erot niin aloitusten onnistumisessa, monistuksessa kuin juurtumisessakin olivat suuret, mikä oli odotettavissakin aiempi-

en tutkimusten perusteella. Ahuja (1982) raportoi 48 *P. tremula*, *P. tremuloides* tai niiden hybridien kloonista 26 kloonin mikrolisäyksen epäonnistuneen ja totesi kasvullisen lisääntymiskyvyn olevan hyvin voimakkaasti geneettisesti määrätty. Myöhemmässä tutkimuksessa 100 testatusta haapa- ja hybridihaapakloonista 50 % monistui ja niitä voitiin lisätä kasvullisesti (Ahuja 1987). Hessenin metsäntutkimuslaitoksessa (1985) monistettaessa 49 haapakloonista 35 000 mikrotainta todettiin yhdeksi päävaikeudeksi mikroversojen totuttaminen laboratorioolosuhteista ei-steriileihin oloihin. Omassa tutkimuksessamme vastaava siirto ei ollut kovin ongelmallinen, varsinkin jos juurrutus voitiin aloittaa propagaattoreissa laboratoriossa.

Ryynäsen 1991 raportoinnissa työssä Pun-kaharjulla 12 monistukseen otetusta kloonista yhdeksän onnistui. Oman tutkimuksemme 29 varsinaiseen lisästyöhön otetusta kloonista 27 on aloittanut versotuotannon, ja juurrutuksessa oli lokakuussa 18 kloonina. Juurrutus näyttää helpommalta vaiheelta kuin versomonistus, joten todennäköisesti valtaosasta klooneja saadaan taimia. Kehittämällä työn kaikkia vaiheita pystytään varmasti vielä parantamaan ja nostamaan lopullista saantoa.

Käytäntöön tähtäävässä lisäystoiminnassa ei kuitenkaan ole mahdollista käyttää kovin monia lisäysreseptejä, joten jouduttaneen jättämään joitakin heikosti monistuvia kloonveja pois ja/tai korvaamaan ne suunnilleen samanarvoisilla hyvin onnistuvilla kloonveilla. Heikosti onnistuvien kloonien taimimäärät jäävät

joka tapauksessa pieniksi ja niiden merkitys on vähäinen. Taimimäärien huomattava vaihtelu/klooni lienee haavalla tosiasia, joka on hyväksyttävä käytännön lisäystyössä. Tällä hetkellä ei virallisia säännöksiä haavan kasvullisesti lisätyn aineiston käytöstä Suomessa vielä ole.

## Kirjallisuus

**Ahuja, M. R.** 1982. Tissue culture technology in clonal propagation of aspen (*Populus*) genotypes. In: Proceedings of the IUFRO joint meeting of working parties on genetics about breeding strategies including multiclinal varieties. Sensenstein September 6–10, 1982. Published by Lower Saxony Forestry Research Institute, Department of Forest Tree Breeding.

**Ahuja, M. R.** 1986. **Aspen.** In: **Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. & Yamada, Y.** (eds). Handbook of plant cell culture. Techniques and applications. New York, N. Y.: Macmillan Publishing Company. Volume 4: 626–651. ISBN 0-07-019759-8

**Ahuja, M. R.** 1987. *In vitro* propagation of poplar and aspen. In: Bonga, J. M. & Durzan, D. J. (eds). Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martin Nijhoff Publishers. Volume 3: 207–223. ISBN 90-247-3432-0

**Barocka, K. H., Baus, M., Lontke, E. & Sievert, F.** 1985. Tissue culture as a tool for *in vitro*-mass-propagation of aspen. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung 94: 340–343.

**Christie, C. B.** 1978. Rapid propagation of aspens and silver poplars using tissue culture techniques. The International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings 28: 255–260.

**Hessische Forstliche Versuchsanstalt,** Jahresbericht 1985, 57 p.

**Lepistö, M.** 1996. Haavanjalostuksen tulokset käyttöön. Metsänjalostussäätiö 1995. p. 5–7 (ISSN 0355-1024).

**Lloyd, G. & McCown, B.** 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kal-*

*mia latifolia*, by use of shoot-tip culture. The International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings 30: 421–427.

**Lubrano, L.** 1992. Micropropagation of poplars (*Populus* spp.). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation II. Berlin: Springer-Verlag. Volume 18: 151–178. ISBN 3-540-53659-0

**Mikola, J.** 1996. Haavan uusi tuleminen. Metsänjalostussäätiö 1995. p. 2–4. (ISSN 0355-1024)

**Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497.

**Ryynänen, L.** 1991. Micropropagation of hybrid aspen. Metsänjalostussäätiön tiedonantoja 1: 61–68. (ISSN 0789-0044)

**Salonen, M.** 1994. Sytokiniiniruiskuksiin perustuva pistokaslisäys, havupuiden mikrolisäys ja lehtipuiden mikrolisäys. Osa metsäpuiden kasvullisten lisäysmenetelmien kehittämissuorituksen loppuraporttia. Metsänjalostussäätiön työraportteja 7. (Moniste)

**Son, S. H., Chun, Y. W. & Hall, R. B.** 1991. Cold storage of *in vitro* cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 161–168.

**Winton, L.** 1968. Plantlet formation from aspen tissue cultures. Science 160: 1234–1235.

**Winton, L.** 1971. Tissue culture propagation of European aspen. Forest Science 17: 348–350.

# Metsälehmuksen ja metsätammen mikrolisäys

---

Maija Salonen, Sinikka Salonen & Seija Vanhakoski

*Metsänjalostussäätiö, Haapastensyrjän metsänjalostuskeskus, Karkkilantie 247, 12600 Längelmäki*

Metsänjalostussäätiössä kehitellään lisäysmenetelmiä jaloille lehtipuille, joiden siementuotannossa Suomessa sekä siementen varastoinnissa on ongelmia. Keskeisenä tavoitteena on biologisen monimuotoisuuden säilyttäminen valitsemalla lisäykseen kestäviä genotyypppejä. Taimia on tuotettu sekä kenttäkokeisiin että myyntiin. Metsälehmuksia on mikrolisäyksessä 11 kloonina, joista osa on peräisin 6-vuotiaista siementaimista ja osa täysikasvuista puista. Viljelmät aloitettiin kasvavien oksien silmuista LS-alustalla, jossa sytokiniinina oli N<sup>6</sup>-bentsyyliadeniinia (BA 5 µM). Monistus-alustassa oli BA:n (2,2 µM) lisäksi indolyyli-3-voihappoa (IBA 0,5 µM). Parhaat monistuskertoimet olivat 5-10. Mikrolisätyjä lehmuksen versoja on juurrutettu kloonista riippuen joko WPM-alustalla (1/2x, IBA 1 µM, sakkaroosi 43,8 mM) tai LS-alustalla (IBA 5 µM, 7 vrk). Juurtumisprosentit olivat 40-100 %. Heikoimmin juurtuivat Keski-Suomesta olevan puun mikropistokkaat. Yleensä 70-90 % taimista on lähtenyt kasvuun. Ensimmäisen kasvukauden aikana siementaimialkuperää olevat mikrolehmukset kasvoivat nopeammin (pituus ka. 36,7 cm/283 kpl) kuin täysikasvuisten puiden jälkeläiset (pituus ka. 17,2 cm/844 kpl), vaikka kloonien monistumisessa ja juurtumisessa ei havaittu eroja *in vitro*. Vuoden kylmäsäilytysjakson (+6-8 °C) jälkeen lähes 100 % versoista oli elinkykyisiä. Vuosina 1994 ja 1995 tuotettiin myyntiin yhteensä n. 7000 metsälehmuksen tainta. Tammen mikrolisäyksessä on tuloksia seitsemästä siementaimialkuperästä (1-2 v). Lähtömateriaalina olivat puhjenneet ja pidentyneet silmut. Perusravintoliuoksena oli muunnettu GD-alusta, jossa kalsiumin (3 mM = 3x) ja sakkaroosin (87,6 mM = 1,5x) taso oli nostettu. Aloitusalustassa BA-pitoisuus oli 4,4 ja monistusvaiheessa 0,9 µM. Monistuskertoimet vaihtelivat 1,6:sta 3,4:ään. Juurrutuksessa tammen versoille käytettiin 7 vrk:n IBA-käsittelyä (5 µM) GD-alustalla, jossa makroravinteet oli puolitetty. Versoja on juurrutettu n. 500 kappaletta. Eri alkuperissä juurtumisprosentit olivat 45-90 %. Täysikasvuisten puiden silmuista ei ole saatu monistuvia viljelmiä, vaikka niitä on aloitettu vesaoksien fysiologisesta nuorista soluista.

*Avainsanat: in vitro, lehtipuut, monistusketronin, Quercus robur, solukkoviljely, Tilia cordata*

# Abstract

## Micropropagation of small-leaved linden and pedunculate oak

Maija Salonen, Sinikka Salonen & Seija Vanhakoski  
*Foundation for Forest Tree Breeding, Haapastensyrjä Tree Breeding Centre,  
Karkekilantie 247, FIN-12600 Läyliäinen*

Micropropagation of small-leaved linden (*Tilia cordata* Miller) and pedunculate oak (*Quercus robur* L.) is part of a project to develop vegetative propagation methods for rare broad-leaved trees which have difficulties to produce seed in Finland. The main objective is to conserve biodiversity by selecting hardy and qualified genotypes for micropropagation. Micropropagated plants have been produced for field trials and for sale. Eleven linden clones have been micropropagated. Bud cultures were initiated from actively growing shoots of 6-year-old seedlings (3) and adult trees (8) on LS medium. The initiation medium contained N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA 5 µM). In addition to BA (2.2 µM) the multiplication medium was supplemented with indole-3-butyric acid (IBA 0.5 µM). The best multiplication coefficients, the number of segments which were gained from one subcultured segment, were 5-10. Micropropagated linden shoots were rooted depending on the clone either on WPM (x 1/2, 1 µM IBA, 43.8 mM sucrose) or on LS medium (5 µM IBA for 7 days). The rooting percentages were 40-100 %. Microplants have differed in survival after transplanting, but in general 70-90 % of plants have started to grow. During the first growing season faster shoot growth was recorded for plants derived from 6-year-old seedlings (height: 36.7 cm /283 plants) compared with that of an adult donor tree (height: 17.2 cm /844 plants) even though no differences were found in multiplication and rooting of these clones *in vitro*. After one year's cold storage at 6-8 °C nearly 100 % of linden shoots survived. The number of lindens produced for sale during 1994 and 1995 was ca. 7000. Preliminary results are from micropropagation of seven seed origins of pedunculate oak (1-2 years). Nodal segments and shoot tips were used as explants. The basal medium was a modified GD medium containing increased levels of calcium (3 mM = 3-fold) and sucrose (87.6 mM = 1.5-fold). The concentration of BA was 4.4 µM and 0.9 µM during initiation and multiplication, respectively. Multiplication coefficients calculated from four seedling sources were 1.6-3.4. Oak shoots were rooted in the presence of IBA (5 µM for 7 days) on GD medium in which concentrations of macronutrients were halved. A total number of shoots rooted was 500. The rooting percentages varied between 45 and 90 % depending on the seed source. Multiplicating cultures were not obtained from adult trees though juvenile tissue from epicormic shoots were used as explants.

*Key words:* deciduous trees, *in vitro*, multiplication coefficient, *Quercus robur*, *Tilia cordata*, tissue culture

# Johdanto

Metsälehmus eli niinipuu (*Tilia cordata*) ja metsätammi (*Quercus robur*) kuuluvat vaahteran, kynä- ja vuorijalavan sekä saarnen ohella jaloihin lehtipuihin. Jalavat ovat Suomessa luonnonsuojelulain nojalla rauhoitettuja, mutta muutkin jalopuut ovat uhanalaisia levinneisyytensä pohjoisrajalla. Metsälehmus on ilmastollisesti kestävin ja esiintyy luonnonvaraisena vielä Iisalmen korkeudella. Tammi sen sijaan kasvaa luontaisesti vain Suomen lounaisosissa.

Metsälehmus tuottaa Suomessa heikosti siementä. Puu on hyönteispölytteinen ja kukkii myöhään heinä-elokuussa, minkä vuoksi alkio ja endospermi eivät mahdollisesti ehdi kehittyä kunnolla (Pigott 1981). Syyskuun maksimilämpötiloilla näyttäisi olevan ratkaiseva merkitys hedelmien kypsymiselle. Eteläisimmässä Suomessa lehmuksella voi saada siemeniä, jotka itävät kuitenkin yleensä huonosti (Raatikainen 1993). Metsälehmuksen oletetaan lisääntyvän luonnossa lähinnä kasvullisesti.

Lehmuksilla ei ole ollut metsätaloudellista arvoa, vaikka juuri niinipuuta voidaan pitää vanhimpana taloudellisesti merkittävänä käyttöpuuna Pohjois-Euroopassa (Olkanen 1977). Metsälehmusta voi lisätä kasvullisesti juuriveisoista, taivukkaista, pistokkaista ja varttamalla, mutta perinteiset lisäysmenetelmät eivät ole tehokkaita. Metsälehmuksen mikrolisäyksestä on kirjallisuustietoa vähän, vaikka eurooppalaisten solukkoviljelylaboratorioiden luettelossa vuodelta 1993 on mainittu 11 laitosta, joiden ohjelmassa oli myös *Tilia*-lajien mikrolisäys (Ó Ríordáin 1994; vrt. metsätammi - 15 laboratoriota). Metsälehmuksen taimia on tuotettu hankasilmulisäyksen avulla nuorista (2 kk - 1 v) kantataimista (Chalupa 1984) ja täysikasvuista puista (Marks *et al.* 1987, Kunneman & Albers 1991). Taimien regeneroiminen somaattisen embryogeneesin kautta on myös onnistunut, kun viljelmät on aloitettu kypsymättömistä tai kypsistä alkiosta (Chalupa 1990, Simola & Kärkönen 1994, 1996).

Suomessa tammesta saadaan runsaita terhosatoja vain keskimäärin 4-8 vuoden välein (Mattila *et al.* 1996). Siemenlisäyksen haittana on lisäksi terhojen heikko säilyvyys (Guthke

& Spethmann 1993, Konttinen 1995). Tammi on Keski-Euroopan tärkeimpiä puulajeja, ja sen kasvullista lisäystä, pistokaslisäystä ja mikrolisäystä, on selvitetty paljon. Tammen taimia on tuotettu *in vitro* hankasilmulisäyksessä erikikäisistä kantayksilöistä ja somaattisen embryogeneesin avulla kypsymättömistä alkiosta (Belarosa 1989, Chalupa 1995).

Kantayksilön ikä rajoittaa tammen, kuten muidenkin puuvartisten kasvien lisäystä (esim. Chalupa 1993). Tietyt puunosat kuitenkin vanhenevat hitaammin kuin toiset. Tällaista fysiologisesti nuorta solukkoa on juuri- ja kantovesoissa (root sucker, stump sprout) sekä vesaoksissa (epicormic shoot). Alustavia tuloksia on myös tavallisten oksien käytöstä tammen mikrolisäyksessä. Oksanpätkiin on saatu kehittymään kasvihuoneessa lehtiversoja, joista on voitu aloittaa *in vitro* -viljelmiä (Vieitez *et al.* 1994). Mutta valittiinpa aloitusmateriaali kuinka tahansa, useimmat havupuut ja jotkut lehtipuut kuten *Quercus*-lajit ovat vaikeasti mikrolisäytävissä (Bonga & von Aderkas 1992, s. 103).

Lehmus- ja tammimetsiköt ovat Suomessa hajallaan, ja lajien luontainen uudistuminen on vaikeutunut. Jos jalopuiden halutaan olevan varteenotettava vaihtoehto metsänviljelyssä, on varmistettava, että kestävää ja hyvälaatuista materiaalia istutuksiin on vuosittain saatavilla (Mattila *et al.* 1996). Lehmuksen ja tammen mikrolisäys Metsänjalostussäätiössä on osa hanketta, jossa kehitellään lisäysmenetelmiä jaloille lehupuille, joiden siementuotannossa on vaikeuksia. Tavoitteena on tuottaa mikrolisätyjä taimia sekä kenttäkokeisiin että myyntiin.

## Aineisto ja menetelmät

### Metsälehmus

Metsälehmusviljelmät aloitettiin joko luonnosta tai kasvihuoneesta kerättyjen kasvavien oksien silmuista. Aineistona oli sekä kuusivuotiaita siementaimia että täysikasvuista puita. Silmu ja pala vartta pintasteriloitiin alkoholissa ja Ca(OCl)<sub>2</sub>:ssa (Taulukko 1).



**Taulukko 1.** Lehmuksen ja tammen mikrolisäyksen vaiheet.

Vaihe	Metsälehmus	Metsätamm
Aineisto	kasvien oksien hankasilmut, aloituskappaleena silmu ja pala vartta	puhjenneet ja pidentyneet silmut (kärjet ja nivelväliä)
Sterilointi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- saippuainelos (Erisept, Orion-Farmos)n. 20 min</li> <li>- 94 % (v/v) etanoli 1 min</li> <li>- 1 x steriili tislattu H<sub>2</sub>O</li> <li>- 5 % (w/v) Ca (OC1)<sub>2</sub> + Tween 20 [n. 0.1 % (v/v)] 15-20 min</li> <li>- 3 x steriili tislattu H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- saippuainelos (Erisept, Orion-Farmos)n. 20 min</li> <li>- 5 % (w/v) Ca(OC1)<sub>2</sub> + Tween 20 [n. 0.1 % (v/v)] 15 min</li> <li>- 3 x steriili tislattu H<sub>2</sub>O</li> </ul>
Aloitus	LS-alusta + 5 µM BA	Muunnettu GD-alusta + 4,4 µM BA
Monistus	LS + 2,2 µM BA + 0,5 µM IBA - 0,14 mM Fe <sup>2+</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- rauta Na-Fe(III)-EDTA:na (0,1 mM)</li> <li>- 87,6 mM sakkaroosi</li> </ul>
Juurutus	1/2 x WPM (43,8 mM sakkaroosi, 0,1 mM Fe <sup>2+</sup> ) + 1 µM IBA 4-5 viikkoa - LS + 5 µM IBA 7 vrk → hormoniton alusta, jossa makro-ravinteet puolitettu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Muunnettu GD + 0,9 µM BA</li> <li>- 3 mM Ca<sup>2+</sup></li> <li>Muunnettu GD + 5 µM IBA 7 vrk → hormoniton alusta</li> <li>- makroravinteet puolitettu</li> <li>- 43,8 mM sakkaroosi</li> <li>- 3 mM Ca<sup>2+</sup></li> </ul>

Perusravintoliuoksena oli Linsmaierin ja Skoogin ravintoliuos (LS, Linsmaier & Skoog 1965). Aloitusalustassa oli sytokiniinina  $N^6$ -bentsyyliadeniinia (BA, 5  $\mu\text{M}$ ). Monistus- alustassa oli BA:n (2,2  $\mu\text{M}$ ) lisäksi indoli-3-voihappoa (IBA, 0,5  $\mu\text{M}$ ) (T. R. Marks, henkilökohtainen tiedonanto). LS-alustan kalsiumpitoisuus oli 3 mM. Koska viljelmissä esiintyi lehtien kellastumista ja rusketumista, monistusta kokeiltiin kahdella muunnetulla alustalla, joissa kalsiumin konsentraatio nostettiin kaksin- tai kolminkertaiseksi. Alustan kalsiumtason nostaminen on kirjallisuustietojen perusteella parantanut lehmuksen *in vitro*-viljelmien laatua (Kunneman & Albers 1991). Parhaiten viljelmät kuitenkin saatiin pysymään vihreinä korottamalla alustan rautapitoisuus 0,1 mM:sta 0,14 mM:iin.

Mikrolisätyt versot (2-3 cm) juurrutettiin joko WPM-alustalla (Lloyd & McCown 1980) tai LS-alustalla (Taulukko 1). Koulittuja mikrotaimia pidettiin totutusvaiheessa aluksi olosuhteissa, joissa suhteellinen kosteus oli 80-90 %. Muutaman viikon kuluttua taimet siirrettiin normaaliin kasvihuonekosteuteen (n. 60 %).

## Metsätammi

Tammiviljelmät aloitettiin nuorista siementaimista käyttämällä versojen kärkiä ja nivelväläjä. Versot pintasteriloitiin  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ :ssa (Taulukko 1). Kasvatusalustana oli muunnettu Gresshoffin ja Doyn ravintoliuos (GD) (Mehra-Palta *et al.* 1978), johon rauta lisättiin Na-Fe(II)-EDTA:na (0,11 mM), ja jossa sakkaroosipitoisuus oli 1,5-kertainen (87,6 mM) (Ballester & Meier-Dinkel 1992). BA-konsentraatio oli aloitusvaiheessa 4,4  $\mu\text{M}$  ja monistusvaiheessa 0,9  $\mu\text{M}$ . Versojen kärjet rusketuivat aluksi monistus- alustalla. Perunan versoviljelmissä on versonkärkien tuhoutumisen todettu liittyvän kalsiumin puutteeseen (Sha *et al.* 1985). Rusketumisesta päästiin tammellakin nostamalla GD-alustan kalsiumpitoisuus kolminkertaiseksi (3 mM). Juurrutus- alustassa makroravinteet ja sakkaroosi puolitettiin ja auksiinina oli IBA:ta (5  $\mu\text{M}$ ). Induktio- vaiheen (7 vrk) jälkeen versot (vähintään 1 cm) siirrettiin hormonittomalle alustalle.

## Kasvatusolosuhteet *in vitro*

Viljelmiä kasvatettiin 18 tunnin valo- jaksossa. Valon voimakkuus oli 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Airam, soft white 3000, 3XC). Lämpötila oli päivällä 23-25 °C ja yöllä n. 20 °C. Kasvatus- huoneen suhteellinen kosteus oli n. 50 %. Versoviljelmien kylmävarastointia selvitettiin +6-8 °C:ssa vähässä valossa. Viljelmien siirrostusväli oli 4-6 viikkoa.

## Tulokset

### Metsälehmus

Viljelmiä on aloitettu yhteensä 23 metsälehmuskloonista vuosina 1992-96 (Taulukko 2). Näistä vajaa puolet eli 11 on saatu lisäykseen. Metsälehmusviljelmistä kahdeksan oli peräisin täysikasvuista puista ja kolme kuusivuotiaista siementaimista. Pääosa genotyypeistä oli Etelä-Suomesta, mutta mukana oli myös neljä puuta lehmuksen levinneisyysalueen pohjois- rajalta, Iisalmesta. Täysikasvuisten puiden silmut on pyritty keräämään vesaoksista, jotka vanhenevat muita puunosia hitaammin. Viljelmien infektoitumisprosentti oli keskimäärin 46 %. Parhaiten viljelmät pysyivät puhtaina, kun ne aloitettiin kasvihuoneessa kasvavien siementaimien silmuista (Taulukko 2). Kesällä 1995 Virroilta ja Iisalmesta peräisin olevista metsälehmuksista saatiin puhtaita viljelmiä vähän, sillä silmut infektoituivat 70-90-prosenttisesti. N. 10 % silmuista on alkanut monistua (Taulukko 2). Monistuvan viljelmän aikaansaamiseen kuluu kuukausia. Esimerkiksi Virtain kloonin 7 ja Iisalmen kloonin 4 viljelmät ovat vasta yli vuoden kuluttua aloituksesta alkaneet tuottaa versoja.

Monistuminen on perustunut hankasilmu- jen pitenemiseen. Lisäyskertoimia on esitetty kahdesta loppilaisesta metsälehmuskloonista (Taulukko 3). Aloituskappaleena oleva nivelväli on pidentynyt 2-9 nivelväliä yhden lisäys- kierron aikana. Viljelmien varastointi kylmässä (3-4 kk, +6-8 °C) paransi merkittävästi ver- sojen monistumista (Taulukko 3). Metsälehm-

**Taulukko 2.** Metsälehmuksen silmuviiljelmien onnistuminen: infektoituneiden ja monistuvien viljelmien määrä.

Paikkakunta	Klooni	Silmuja kpl	Infekt. %	Monistuvia silmuja	
				kpl	%
Siementaimi 6 v.	<b>1</b>	77	15,6	<b>11</b>	<b>14,3</b>
<b>Etelä-Suomi</b>	<b>2</b>	23	4,3	0	0,0
(4 kloonia)	<b>3</b>	38	7,9	<b>31</b>	<b>81,6</b>
	<b>4</b>	21	0,0	<b>2</b>	<b>9,5</b>
<b>Loppi</b>	<b>1</b>	94	9,6	<b>22</b>	<b>23,4</b>
(2 kloonia)	<b>2</b>	67	19,4	<b>20</b>	<b>29,9</b>
<b>Padasjoki</b>	<b>1</b> (varte)	76	39,5	<b>3</b>	<b>3,9</b>
<b>Punkaharju</b>	<b>1</b>	26	69,2	<b>2</b>	<b>7,7</b>
(2 kloonia)	<b>2</b>	26	73,0	0	0,0
<b>Virrat</b>	<b>1</b>	23	73,9	0	0,0
(9 kloonia)	<b>2</b>	20	90,0	0	0,0
	<b>3</b>	18	38,9	<b>4</b>	<b>22,2</b>
	<b>4</b>	14	92,9	0	0,0
	<b>5</b>	21	85,7	0	0,0
	<b>6</b>	21	38,1	1	4,8
	<b>7</b>	27	85,2	1	3,7
	<b>8</b>	26	80,8	0	0,0
	<b>9</b>	19	68,4	0	0,0
<b>Ähtäri</b>	<b>1<sup>1</sup></b>	22	95,5	0	0,0
<b>Iisalmi</b>	<b>1<sup>1</sup></b>	57	77,2	0	0,0
(4 kloonia)	<b>2<sup>1</sup></b>	29	86,2	0	0,0
	<b>3<sup>1</sup></b>	24	87,5	0	0,0
	<b>4</b>	83	69,9	<b>1</b>	<b>1,2</b>
Yhteensä/ ka.	<b>23</b>	852	45,9	98	11,5
Mikrolisätyjä klooneja	<b>11</b>				

<sup>1</sup> Silmut latvaoksista

muksen versoviljelmät (8 kloonia) olivat hengissä 84-100-prosenttisesti (ka. 95 %) vielä vuoden kylmäsäilytyksen jälkeen.

Mikrolisätyt versot ovat juurtuneet 40-100-prosenttisesti. Iisalmen metsälehmus (klooni

4) monistui heikosti: kevään ja kesän 1996 aikana 57 versosta juurtui 42 % (24 kpl). Toisaalta Virtain klooni 3 on monistunut erittäin hyvin, vaikka 860 versosta juurtui vain 43 % (366 kpl).

**Taulukko 3.** Kylmäsäilytyksen, +6-8 °C, vaikutus Lopen metsälehmusviljelmien monistumiseen. Pääverson nivelvälien ja haarojen määrät ± SE laskettu kauden kasvatusjakson jälkeen. Ennen kylmäsäilytystä lehmuksia viljelty *in vitro* yhden vuoden ajan. Monistuskertoimien erot vastaavista kontrolleista laskettu Studentin t-testillä ja merkitty riskitasoilla 0,05 (\*), 0,01 (\*\*) ja 0,001 (\*\*\*)

Kllooni silmu	Alustan Ca <sup>2+</sup> -mM	Nivelvällejä (niv.) ja hankahaaroja ± SE / alkuperäinen nivelväli <sup>1</sup>					
		Kontrolli		2 kk +6-8 °C		3-4 kk +6-8 °C	
		nivelvällejä	haaroja	nivelvällejä	haaroja	nivelvällejä	haaroja
<b>Loppi 1</b>	3	5,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	9,0 ± 0,5***	1,7 ± 0,3*
	silmu 1	5,5 ± 0,5	0,8 ± 0,2			4,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1
	silmu 2	5,1 ± 0,4	1,0 ± 0,2	4,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1	9,8 ± 0,2***	2,1 ± 0,2***
<b>Loppi 2</b>	6	4,4 ± 0,4	1,2 ± 0,2			7,1 ± 0,5***	1,2 ± 0,2
	3	4,0 ± 0,3	0,7 ± 0,1	4,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1		
	silmu 1	3,2 ± 0,3	0,8 ± 0,2	3,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	4,5 ± 0,2*	0,9 ± 0,1
	silmu 2	4,2 ± 0,3	0,8 ± 0,2	3,3 ± 0,3	0,6 ± 0,1		

<sup>1</sup> 12-42 kpl

**Taulukko 4.** Mikroisätytjen lehmusten selviytyminen laboratoriorista kasvihuoneolosuhteisiin. *In vitro* juurrutetut versot koulitti toukokuussa 1995. Kolmen metsälehmuskloonin lisäksi mukana keisarinlehmus *Tilia x vulgaris* "Pallida" (Hämeenlinna). Studentin t-testissä kontrollina metsälehmusvarteen (Padasjoki) pituuskasvu. Merkitsevyydet 0,05 (\*), 0,01 (\*\*) ja 0,001 (\*\*\*)

Kllooni	Versoja kpl	juurt.-% / juurtuneet	Koulintavaihe koul.-% / juurtuneet	2 kk:n kasvukauden kuluttua		
				kasvussa %/ koulitut	elossa kpl	pituus cm ± SE
Siemenet, 1 (6 v), Etelä-Suomi	371	80,9	99,0	72,7	283	36,7 ± 1,0***
Siemenet, 3 (6 v), Etelä-Suomi	530	70,0	97,8	78,0	323	24,5 ± 0,6***
Varte, Padasjoki	1102	89,7	99,9	85,1	844	17,2 ± 0,3
<i>T. x vulgaris</i> "Pallida"	187	94,7	98,9	94,9	171	30,9 ± 0,9***

Mikrolisäyksen eri vaiheista - aloitus, monistus, juurrutus ja totutus (akklimatisaatio) - mikä tahansa voi rajoittaa lisäystä. Taulukossa 4 on tuloksia mikrolisätyjen lehmusten selviytymisestä laboratorion kasvihuoneolosuhteisiin. Kolmen metsälehmuskloonin lisäksi on mukana yksi erikoismuoto (puistolehmus: *T. x vulgaris* = *T. cordata* x *platyphyllos*). Tilannetta on seurattu koulintavaiheessa ja kahden kuukauden kasvukauden jälkeen. Metsälehmusten juurtumisprosentit olivat 70-90 %. Taimet kouluttiin lähes 100-prosenttisesti. Näistä taimista 73-85 % oli lähtenyt kasvuun juurrutusvaiheen aikana, mikä näyttäisi olevan edellytys taimien jatkokasvulle. Koulintavaiheesta selviytyi 86-95 % taimista. Siementaimien jälkeläiset kasvoivat merkitsevästi nopeammin kuin padasjokelaisesta vartteesta saadut mikrotaimet. Sama päti myös puistolehmukseen.

## Metsätammi

Viljelmiä on aloitettu seitsemästä 1-2-vuotiaasta tammen siementaimesta. Neljän siementaimialkuperän monistumisesta on tuloksia neljän lisäyskierron ajalta (Taulukko 5). Viljelmien aloitukset onnistuivat hyvin ja 30-47 % nivelväleistä alkoi monistua. Monistuserroin oli parhaimmillaan n. 3. Osa syntyneistä versoista oli adventiivisia. Versot juurtuivat 60-80-prosenttisesti, mutta juurtumisprosentti saattoi nousta yli 90 %:iin. (Taulukko 6).

Versoviljelmien kylmäsäilytyskokeet ovat käynnissä. Puolen vuoden varastoinnin jälkeen versoista oli elossa n. 60 %, eli tammiviljelmät säilyivät lehmuksia heikommin kylmässä. Ensimmäisen kasvukauden aikana mikrotammet ovat kasvaneet kasvihuoneessa n. 10 cm:n mittaisiksi.

Fysiologisesti nuorta solukkoa ei aina ole saatavilla mikrolisäyksen materiaaliksi. Vanhoihin, 2-3 cm:n paksuisiin oksanpätkiin on saatu kasvihuoneessa kehittymään versoja, joista osa on hankasilmuperäisiä ja osa mahdollisesti adventiivisia (Vieitez *et al.* 1994). Versojen käyttöä mikrolisäyksessä haittasi viljelmien infektoituminen. Versot eivät osoittautuneet käyttökelpoisiksi pistokaslisäyksessä-

kään, sillä 900 pistokkaasta (13 kloonina) juurtui vain yksi verso.

## Tulosten tarkastelu

Lehmuksen ja tammen mikrolisäyksestä Metsänjalostussäätiössä saadut tulokset ovat sopuisuudessa aikaisempien kirjallisuustietojen kanssa. Puiden viljelyyn on käytetty yleisiä solukkoviljelyalustoja (LS, WPM, GD). Monista lehtipuulajeista poiketen lehmuksen ja tammen silmuviljely on yleensä aloitettu kasvavien oksien silmuista (Kunnehan & Albers 1991, Ballester & Meier-Dinkel 1992).

Aloitusvaiheessa viljelmien onnistumiseen vaikutti silmujen infektoituminen (Taulukko 2), johon Bellarosan (1989) mukaan törmätään varsinkin silloin, kun materiaali otetaan täysikasvuista puista. Tammen versojen tyveltä ravintoalusta jonkin verran ruskettui, mutta se ei haitannut solukkoviljelyä. Ruskettumisen syynä pidetään hapettuneita fenolihdisteitä, ja se on yleinen ongelma tammen mikrolisäyksessä (esim. Hohtola 1995).

Tutkituista metsälehmuksista n. 48 % (11 kpl) saatiin *in vitro*-viljelyyn. Näiden lehmusten viljely on kestänyt vähintään 1,5 vuotta. Onnistumisprosentti on varsin kohtuullinen. Vertailun vuoksi esimerkiksi 55:stä metsätammikloonista oli 42 % hengissä kuuden siirrostuskerran jälkeen (Ballester & Meier-Dinkel 1992). Hyvin pieni osa metsälehmuksen silmuista kuitenkin alkoi monistua tässä tutkimuksessa: lisäykseen saaduissa kloonissa vajaa viidennes (18 %) (Taulukko 2). Sen sijaan 30-50 % tammiaineiston viljelmistä kehittyi monistuviksi versoviljelmiksi (Taulukko 5), mikä todennäköisesti johtui aloitusmateriaalin nuoresta iästä. Laajassa tammitutkimuksessa (Volkaert *et al.* 1990), jossa lähtömateriaali kerättiin 600 siementaimesta, 800 aloituskappaleesta 75 % kasvoi versoksi.

Tammen versojen monistuminen ja juurtuminen vaihteli eri siementaimialkuperissä (Taulukot 5 ja 6). Juncker & Favre (1989) havaitsivat tilastollisesti merkitseviä kloonikohtaisia eroja nuorista, 3 kk:n ikäisistä siementaimista (16 kloonina) aloitetuissa viljelmis-

**Taulukko 5.** Yksivuotiaista tammen siementaimista aloitettujen versoviljelmien monistuminen. Monistuskerroin = monistettavien nivelvälien lisääntyminen lisäyskierron aikana. Viljelmien siirrostusväli n. 1 kk.

Alkuperä	Aloitusvaihe nivelvälejä			Monistusvaihe monistuskerroin/siirrostuskerrat 3– 6			
	yhteensä kpl	monistuvia kpl	monistuvia %	3.	4.	5.	6.
Helsinki	20	6	30,0	1,1	1,6	1,5	1,2
Vantaa 1	16	7	43,8	1,8	1,9	2,9	2,5
Vantaa 2	16	5	31,3	1,9	3,4	3,3	1,6
Vantaa 3	19	9	47,4	1,8	2,2	3,3	1,8

**Taulukko 6.** Tammen versojen juurtuminen. Viljelmät aloitettu yksivuotiaista siementaimista (vrt. Taulukko 5).

Alkuperä	Versoja kpl	Juurtumisprosentti/siirrostuskerrat 4–6			
		4.	5.	6.	ka
Helsinki	17	75,0	66,7	– <sup>1</sup>	70,6
Vantaa 1	136	44,4	91,4	71,1	72,8
Vantaa 2	193	82,6	78,9	81,8	81,3
Vantaa 3	226	48,5	87,5	52,9	63,3

<sup>1</sup>Ei juurrutettu

sä. Monistuminen riippuu genotyypistä. Koska kloonien väliset erot ovat suuria, menetelmät eivät ole toistettavia (Juncker & Favre 1989). Chalupan (1993) tutkimuksissa monistuskerroimet olivat korkeampia kuin tässä tutkimuksessa: 3-8 kloonista riippuen (taimien ikä 3-6 kk).

Vuoden ikäisistä siementaimista aloitettujen tammiviljelmien on havaittu juurtuvan hyvin, 70-90-prosenttisesti (Vieitez *et al.* 1985, Chalupa 1993). Tässä työssä siirrostuskertojen lukumäärällä ei ollut vaikutusta tammen versojen juurtumisprosenttiin, joka keskimäärin oli 60-80 % (Taulukko 6). Vastaavia tuloksia Metsänjalostussäätiössä on saatu myös metsälehmuksesta. Kirjallisuudesta löytyy sen sijaan esimerkkejä, joissa versojen juurtumisky-

ky on parantunut siirrostuskertojen lisääntyessä. Kriminlehmuksen (*T. euchlora*) versot juurtuivat kolmen siirrostuksen jälkeen vain 15-prosenttisesti, mutta 10 siirrostuksen jälkeen juurtumisprosentti oli kohonnut yli kuuksinkertaiseksi (Kunneman & Albers 1991). Parantunut juurtumiskyky on ollut seurausta mikrolisäystekniikasta, joka on saanut aikaan ainakin osittaista nuorentumista aineistossa. Ballesterin & Meier-Dinkelin (1992) mukaan genotyyppi näyttäisi kuitenkin olevan määräävin tekijä tammikloonien juurtumisessa.

Metsälehmusten juurtumisprosentit olivat yleensä 70-80 % (Taulukko 4). Seuraavia juurtumistuloksia on esitetty kirjallisuudessa: täysikasvuisten puiden mikropistokkailla yli 70 % (Marks *et al.* 1987) ja nuorten siementaimien

mikropistokkailta 80-100 % (Chalupa 1984). Nopea kasvuunlähtö heti juurtumisen jälkeen näytti olevan edellytys mikrolisätyjen metsälehmusten jatkokasvulle omassa tutkimuksemme. Samoin Chalupan (1993) mukaan elinvoimaisia tammen taimia kehittyi pistokkaista, jotka juurtuivat nopeasti ja lähtivät kasvuun heti juurtumisen jälkeen.

Kantataimen iän vaikutus näkyy selvästi pistokaslisäyksessä. Chalupa (1993) havaitsi tammipistokkaiden juurtuvan 80-90-prosenttisesti, kun ne oli leikattu 1- ja 3-vuotiaista kantapuista, mutta 7-vuotiaista puista peräisin olevien pistokkaiden juurtumisprosentti oli pudonnut 52:teen. Näissä tutkimuksissa ei metsälehmüksien monistumisessa ja juurtumisessa ollut kantapuiden ikään (6-vuotias - täysikasvuinen) liittyviä eroja. Evers *et al.* (1993) pääsivät yhtä suuriin monistuskertoimiin myös tammiviljelmässä, jotka oli aloitettu alkioista tai 8-vuotiaista taimista. Maastossa alkioista peräisin olevat taimet kasvoivat sen sijaan nopeammin.

Mikrolisätyt metsälehmukset kasvoivat pituutta ensimmäisen kasvukauden aikana kasvihuoneessa 15-30 cm (Taulukko 4). Luon-

nossa metsälehmus on ensimmäisinä vuosina hyvin hidaskasvuinen, sillä vuosikasvaimen pituus on tavallisesti vain 2-3 cm (Söyrinki 1985). Mikrotammien kasvusta laboratoriovaiheen jälkeen on tässä työssä tehty vain vähän havaintoja. Tsekinmaassa on mikrolisätyjä taimia ollut kenttäkokeissa jo n. 10 vuoden ajan. Mikro- ja siementaimien kasvussa ei ole näytännyt olevan eroja (Chalupa 1993).

*In vitro* -viljelmien kylmäsäilytys on välttämätöntä kaupallisten laboratoriodien ympärivuotiselle toiminnalle, jolloin tuotantoa voidaan ohjelmoida varastoinnin ansiosta. Lehmusviljelmät kestivät hyvin kylmävarastointia +6-8 °C:ssa (Taulukko 3). Alustavista tuloksista päätellen tammi kestää varastointia huomomin, sillä vain 60 % versoista oli elossa puolen vuoden säilytyksen jälkeen. Tammen versoviljelmistä on julkaistu erittäin hyviäkin tuloksia, sillä viljelmiä on voitu säilyttää jopa neljä vuotta +4 °C:ssa siirrostamatta ja lisäämättä ravintoliuosta. Vastaavaa aineistoa testattiin myös kenttäkokeissa (Meier-Dinkel *et al.* 1993). Kylmävarastoinnin onnistuminen lisäisi nuorista kantataimista saatujen mikrotaimien merkitystä tammiaineiston tuotannossa.

## Kirjallisuus

Ballester, A. & Meier-Dinkel, A. 1992. Micropropagation of *Quercus* species. In: O Ríordáin, F. (ed.). Micropropagation of *Betula* and *Quercus*. Initial reports of the woody plant working group. COST 87. Commission of the European Communities. p. 39-75. ISBN 0948321-69-5

Bellarosa, R. 1989. Oak (*Quercus* spp.). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Trees II. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. Volume 5: 387-410. ISBN 3-540-19158-5

Bonga, J. M. & Aderkas, P. von 1992. *In vitro* culture of trees. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 236 p. ISBN 0-7923-1540-5

Chalupa, V. 1984. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biologia Plantarum* 26: 374-377.

Chalupa, V. 1990. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata*

Mill.). *Plant Cell Reports* 9: 398-401.

Chalupa, V. 1993. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Annales des Sciences Forestières* 50 (Supplement 1): 295-307.

Chalupa, V. 1995. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). In: Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J. (eds). Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Volume 2: 67-87. ISBN 0-7923-3070-6

Evers, P., Vermeer, E. & Eeden, S. van 1993. Rejuvenation of *Quercus robur*. *Annales des Sciences Forestières* 50 (Supplement 1): 330-335.

Guthke, J. & Spethmann, W. 1993. Physiological and pathological aspects of long-term storage of acorns. *Annales des Sciences Forestières* 50 (Supplement 1): 384-387.

- Hohtola, A.** 1995. Ruskettuminen tammen meristeemilisyksen ongelmana. In: Oksa, E. (ed.). Metsäntutkimus uusissa puissa: monistusta ja molekyylijä. Puuvartisten kasvien bioteknologia -kokous Punkaharjulla 1995. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574: 7–14. ISBN 951-40-1475-8.
- Juncker, B. & Favre, J. M.** 1989. Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 267–276.
- Konttinen, K.** 1995. Jalojen lehtipuiden siementen käsittely. Kirjallisuustarkastelu. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 573. 49 p. ISBN 951-40-1474-X.
- Kunneman, B. P. A. M. & Albers, M. R. J.** 1991. Linden trees (*Tilia* spp.). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Trees III. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. Volume 16: 152–163. ISBN 3-540-52576-9
- Linsmaier, E. M. & Skoog, F.** 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100–127.
- Lloyd, G. & McCown, B.** 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. The International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings 30: 421–427.
- Marks, T. R., Simpson, S. E., Beckham, C. F. & Dobeson, H. E.** 1987. Micropropagation of hardy ornamentals. Programme 2/86. Clonal selection, propagation and micropropagation of hardy ornamentals. Annual Report of the East Malling Research Station for 1986. p. 31–34.
- Mattila, A., Vakkari, P., Pulkkinen, P. & Raisio, J.** 1996. Tammella on kysyntää - mistä viljelymateriaali? In: Napola, J. (ed.). Metsänjalostussäätiö 1995. Vantaa: Mestarioffset Oy. p. 22–29 (English summary p. 37–38). (ISSN-0355-1024)
- Mehra-Palta, A., Smeltzer, R. H. & Mott, R. L.** 1978. Hormonal control of induced organogenesis. Experiments with excised plant parts of loblolly pine. *TAPPI journal* 61: 37–40.
- Meier-Dinkel, A., Becker, B. & Duckstein, D.** 1993. Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* L. *Annales des Sciences Forestières* 50 (Supplement 1): 319–322.
- Oikanen, P.** 1977. Niinipuun (*Tilia cordata*) esiintymisen ja taloudellisen käytön historiaa Suomessa. *Dendrologian Seuran Tiedotuksia* 8: 14–22.
- Ó Riordáin, F. (ed.)** 1994. Directory of European plant tissue culture laboratories 1993. Cost 87. Commission of the European Communities. 172 p. ISBN 2-87263-113-5
- Pigott, C. D.** 1981. Nature of seed sterility and natural regeneration of *Tilia cordata* near its northern limit in Finland. *Annales Botanici Fennici* 18: 255–263.
- Raatikainen, M.** 1993. Lehmuksset pihapuina. *Sorbifolia* 24: 181–184.
- Sha, L., McCown, B. H. & Peterson, L. A.** 1985. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110: 631–634.
- Simola, L. K. & Kärkönen, A.** 1994. Cell organelles in somatic and zygotic embryos of *Tilia cordata*. Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, Italy, June 12–17, 1994. Firenze: International Association for Plant Tissue Culture. p. 161: S8–9.
- Simola, L. K. & Kärkönen, A.** 1996. Ultrastructure and immunohistochemical localization of cytokinins in somatic embryos of *Tilia cordata*. In: From single cell to plant - progress towards understanding zygotic, androgenic and somatic embryogenesis. Plant Embryogenesis Workshop, Hamburg, Germany, September 12–14, 1996. Hampurg: Centre for Applied Plant Molecular Biology, University of Hamburg. p. 43: S11–14.
- Söyrinki, N.** 1985. Niinipuun (*Tilia cordata*) siemenellisestä uudistumisesta Ruovedellä (62°10'N). *Sorbifolia* 16: 29–38.
- Vieitez, A. M., San-Jose, M. C. & Vieitez, E.** 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. *Journal of Horticultural Science* 60: 99–106.
- Vieitez, A. M., Sánchez, M. C., Amo-Marco, J. B. & Ballester, A.** 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 287–295.
- Volkaert, H., Schoofs, J., Pieters, A. & De Langhe, E.** 1990. Influence of explant source on *in vitro* axillary shoot formation in oak seedlings. *Tree Physiology* 6: 87–93.



# **Vanhojen lehtikuusihybridien lisääminen solukkoviljelyn avulla**

---

Anna-Maija Niskanen

*Kasvibiologian laitos, Metsänjalostus, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto*

*e-mail: aniskane@ladybird.belsinki.fi*

Lajien väliset lehtikuusihybridit ovat mielenkiintoisia sekä metsänjalostuksen että viljelyn kannalta. Solukkoviljelyä käyttämällä voitaisiin ratkaista hybridien lisääkseen liittyviä ongelmia. Solukkoviljelyn avulla voitaisiin myös käyttää hyödyksi vanhoja lehtikuusia, jotka on arvioitu kentällä, mutta joiden lisäys pistokkaiden kautta on vaikeaa. Mikrolisäystudkimus aloitettiin 1988-89 vartteista aloitetuista viljelmistä. Siementaimet oli istutettu Metsäntutkimuslaitoksen Ruotsinkylän koeasemalle 1943 ja vartettu Punkaharjun tutkimusaseman kloonikokoelmaan 1957. Kasvatusalustoina oli neljä eri perusalustaa, MS, LM, QL ja B, joissa oli erilainen kasvunsädekoostumus. Kukin jatkokasvatusalusta oli muuten samanlainen kuin aloitusalusta, mutta ilman kasvunsääteitä. Juurrutusalustoilla makromineraalikonsentraatiota pienennettiin huomattavasti. Aloituksia tehtiin sekä vegetatiivisista silmuista että emikukan varresta. Paras kasvatusalusta oli MS. Versoja ei saatu pitenemään eikä juurtumaan testatuilla alustoilla. Keväällä 1996 aloitettiin uudet viljelmät. Uutena kasvatusalustana kokeiltiin WPM-alustaa. Neljän siirtokerran jälkeen versonmuodostus kalluksen kautta on runsasta lähes kaikilla genotyypeillä.

*Avainsanat:* kallus, kasvunsääteet, *Larix* sp., mikrolisäys

# Abstract

## Propagation of mature larch hybrids via tissue culture

Anna-Maija Niskanen

*Department of Plant Biology, Forest Breeding, P. O. BOX 27, FIN-00014 University of Helsinki  
e-mail: aniskane@ladybird.helsinki.fi*

Interspecific larch (*Larix* sp.) hybrids are interesting both for forest breeding and for cultivation. Tissue culture could be applied to solve problems related to propagation of larch hybrids. Tissue culture would also enable utilization of old larches, which have been evaluated in the field, but which are difficult to propagate from cuttings. The cultures for studying micropropagation of larch were initiated 1988-89 from scions. The seedlings had been planted at the Ruotsinkylä Experiment Station of The Finnish Forest Research Institute in 1943 and grafted in the Punkaharju Research Station's clone collection in 1957. Four basal media, MS, LM, QL and B, with different growth regulator composition, were used for induction. The same media, free of growth regulators, were used for subcultures. For rooting, the macro mineral concentration was considerably reduced. Both vegetative buds and the stems of female flowers were used as explants. MS was the best culture medium. Shoot elongation and rooting were not successful with the media tested. New cultures were initiated in spring 1996 and WPM-medium was included. After four subcultures we are observing ample shoot proliferation from callus with nearly all genotypes.

*Key words:* callus, growth regulators, *Larix* sp., micropropagation

## Johdanto

Lehtikuusen (*Larix* sp.) lajihybridejä on Suomessa ollut kenttäkokeissa jo yli 50 vuotta. Osa lehtikuusiristeyksistä on osoittautunut kotimaisia havupuita paremmiksi kasvultaan ja puuaineksen laadultaan (Lähde *et al.* 1984). Lehtikuuset ovat myös ekologisesti hyvin sopeutuneita. Ne kestävät muita havupuita paremmin ilmansaasteita, kuivuutta ja metsäpaloja. Lehtikuusen lajien väliset hybridit ovat metsänjalostuksen kannalta mielenkiintoisia ja soveltuvat metsänviljelyyn. Valitettavasti hybridisiemenen tuottaminen Suomessa on osoittautunut hankalaksi, sillä eri lajit kukkivat perustettujen kahden lajin tai kahden kloonin siemenviljelyksillä eri aikaan ja myös kukinnan aikaiset hallatuhot ovat aiheuttaneet ongelmia.

Kasvihuoneessa kasvatettujen hybridilehtikuusten, *L. decidua* x *leptolepis* (*L. eurolepis*) siementaimien (John 1979) ja nuorten, 3-10 vuotiaitten *L. laricina* -yksilöiden monistaminen pistokaslisäyksellä onnistuu melko hyvin (Farmer *et al.* 1986). Se on kuitenkin hankalampaa kuin kuusen pistokaslisäys. Parhaiten juurtuvat 3-6 vuotiaista puista otetut pistokasoksat. Vanhemmassa aineistossa kloonien välillä on suuria eroja juurtumisessa (Carter 1984).

Lehtikuusen hybridien lisäämiseen liittyviä ongelmia on pyritty ratkaisemaan solukkoviljelyn avulla. Puiden lopullinen paremmuus voidaan lopullisesti arvioida vasta täysikasvuisista yksilöistä. Siksi vanhojen lehtikuusten lisäämistä solukkoviljelyn avulla voitaisiin hyödyntää lehtikuusen risteytysjalostuksessa. Se tarjoaisi myös mahdollisuuden parhaiden genotyyppien lisäämiseen suoraan metsänviljelyä varten.

Vanhojen lehtikuusien mikrolisäyksessä on aloitusmateriaalina käytetty emikukinnon varsisolukkoa (Bonga 1982), nuorta emikukintoa (Bonga 1984) sekä vegetatiivisia (Bonga & Pond 1991) ja generatiivisia silmuja (Bonga & von Aderkas 1988, Laliberté & Lalonde 1988, Kretschmar & Ewald 1994) ja varren solukkoa (Chesick *et al.* 1990). Vegetatiiviset silmut ja myös varsisolukko (Diner 1990) tuot-

tivat adventiivisilmuja, jotka pitenivät versoiksi ja saatiin juurtumaan.

Lehtikuusen mikrolisäystä tutkittiin vuosina 1988-89 Metsäntutkimuslaitoksen Punkaharjun tutkimusasemalla vartteista aloitetuista viljelmistä. Tutkimusta jatkettiin Helsingin yliopiston kasvibiologian laitoksella vuonna 1996.

## Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksessa olivat mukana seuraavat *Larix*-risteytykset: *decidua* x *gmelinii* var. *japonica*, *sibirica* x *kaempferi*, *sibirica* x *decidua*, *kaempferi* x *sibirica*, *laricina* x *decidua* ja *kaempferi* x *decidua*, jotka S. Saarnijoki oli tehnyt vuonna 1939 Mustilan arboretumissa, Elimäellä. Lisäksi mukana oli kaksi vapaapölytyssiemenestä kasvatettua puuta, *L. sibirica* -hybridi, jonka siemen oli vuodelta 1939 ja *L. kaempferi* -hybridi, jonka siemen oli vuodelta 1940 (Taulukko 1). Siementaimet oli istutettu Metsäntutkimuslaitoksen Ruotsinkylän koeasemalle Tuusulaan vuonna 1943, josta ne oli vartettu Metsäntutkimuslaitoksen Punkaharjun tutkimusaseman kloonikokoelmaan vuonna 1957. Kaikki kokeen hybridit oli valittu kantapuiksi, puu E1501 vuonna 1956 ja muut vuonna 1957.

### Koe vuosilta 1988-89

Solukkoviljelyä varten oksat kerättiin 25.-29.4.1988 ja 29.9.1988. Keväällä kerättyjä oksia säilytettiin vesiastiassa kylmävarastossa (+5 °C) ja hyödettiin kasvihuoneella 2-10 vrk ennen viljelyn aloittamista. Syksyllä kerättyistä oksista (20 kpl/genotyyppi) puolet siirrettiin heti kasvihuoneelle hyödetettäväksi ja puolet kylmävarastoon, josta ne siirrettiin jäämurskassa ensin -5 °C lämpötilaan ja sieltä -20 °C lämpötilaan. Kevättalvella ne siirrettiin takaisin ensin -5 °C lämpötilaan ja sieltä +20 °C lämpötilaan. Kylmävarastointiaika vaihteli 4 - 5,5 kk välillä. Kaikki oksat hyödettiin kasvihuoneella ennen preparoimista kunnes silmut olivat aukeamisvaiheessa.

**Taulukko 1.** Lehtikuusten risteytykset ja niiden kantapuurekisterinumero.

Emi/hede	<i>L. decidua</i>	<i>L. sibirica</i>	<i>L. kaempferi</i>	<i>L. gmelinii</i> var. <i>japonica</i>	Vapaa.pölytys
<i>L. decidua</i>				<b>E697 E840</b> <b>E847</b>	
<i>L. sibirica</i>	<b>E837</b>		<b>E833</b>		<b>E836</b>
<i>L. kaempferi</i>	<b>E838</b>	<b>E845</b> <b>E846</b>			<b>E1501</b>
<i>L. laricina</i>	<b>E849</b>				

**Taulukko 2.** Vuosina 1988-89 käytetyt aloitusalustat.

Alusta	Konsentraatio	Kasvunsäätet
LM-1A	½	BA 2,0 mg/l
LM-1B	½	Thidiazuron 0,1 µM
LM-1C	½	BA 0,5 mg/l + IAA 0,5 mg/l
LM-1D	½	Thidiazuron 0,1 µM
QL-1	½	BA 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l
QL-2	1/1	Thidiazuron 0,1 µM + NAA 0,1 mg/l
B	1/1	BA 0,1 mg/l + NAA 0,1 mg/l

Hyödetyt oksat pintasteriloitiin 3 % natriumhypokloriitilla (Klorite) ja huuhdottiin steriloidulla vedellä kolmeen kertaan. Aloituksiin preparoitiin sekä vegetatiivisia silmuja että emikukan silmuja. Vegetatiivista silmuista poistettiin silmusuomut ja irroitettiin meristeemi, neulasten aiheet ja n. 0,5 mm alla olevaa varren solukkoa aloitusalustalle. Emikukista poistettiin suojussuomut, ja kukkavarret leikattiin poikittain neljään osaan. Yhteensä aloituskappaleita preparoitiin 1266 kpl, 870 kpl emikukan varren poikkileikkausta ja 396 vegetatiivista silmua.

Kasvatusalustoina oli neljä eri perusalustaa: MS (Murashige & Skoog 1962), LM (Litvay *et al.* 1985), QL (Quoirin & Lepoivre 1977) ja B (Boylay 1979). Aloitusalustalla oli kasvunsäätteinä N<sup>6</sup>-bentsyyliadeniini (BA), thidiazuron, indoli-3-etikkahappo (IAA) ja α-naftaleenietikkahappo (NAA) (Taulukko 2).

Jatkokasvatusalustat olivat muuten samanlaisia kuin aloitusalustat, mutta ilman kasvunsäätettä. Juurrutukseen kokeiltiin kahta alustaa: MS ja B, joiden makromineraalipitoisuus oli 1/5 ja joihin oli lisätty IAA:ta 1,0 mg/l.

Aloituksissa käytettiin 20 ml:n koeputkia ja jatkokasvatuksissa 200 ml:n lasipurkkeja. Kasvatushuoneen lämpötila oli 22 °C päivällä/20 °C yöllä. Valaistukseen käytettiin 40 W valkoisia putkilamppuja ja 18 h vuorokautista valojaksoa.

## Koe vuodelta 1996

Vuonna 1996 aloitettiin uudet viljelmät jäljellä olevista kokeen puista (10 kloonina, E697 oli kaadettu). Oksat kerättiin 18.4.1996 ja niitä säilytettiin kylmävarastossa + 4 °C:ssa enintään 4 viikkoa ennen viljelmien aloittamista

**Taulukko 3.** Versojen muodostuminen eri aloituskappaleista vuosien 1988-89 kokeissa.

Mistä aloitettu	Aloitukset, kpl	Versoja, kpl
Vegetatiivinen silmu	870	70
Emikukan varsi	396	40
Yhteensä	1266	110

**Taulukko 4.** Versojen monistuminen eri alustoilla vuosien 1988-89 kokeessa.

Alusta	Aloitukset, kpl		Versot, kpl	Monistuskerroin
	Yhteensä	Versovat		
LM-1A	226	3	4	1,33
LM-1B	240	5	5	1,00
MS-1C	238	8	60	7,50
MS-1D	211	5	25	5,00
QL-1	65	4	5	1,25
QL-2	67	1	1	1,00
B	95	5	10	2,00
Yhteensä	1142	31	110	

ilman oksien hyötämistä. Uutena alustana otettiin mukaan WPM (Lloyd & McCown 1981). Aloitusalusat sisälsivät BA:ta 2,0 mg/l ja sakkaroosia 3 %. pH oli 5,6. Viljelmät siirrettiin 4-5 viikon kuluttua samalle alustalle ilman kasvunsääteitä. Kasvatusolosuhteet olivat kuten vuosina 1988-89.

## Tulokset

Vuosien 1988-89 kokeissa versoja muodostui yhteensä 110 kpl (Taulukko 3). Emikukan varsikappaleista muodostui suhteellisesti jonkin verran enemmän versoja kuin vegetatiivisista silmuista.

Aloituksista monistui parhaiten kevään 1989 aloitukset, jotka oli otettu kylmäsäilytyksestä hyödettäväksi keväällä 1989. Monistumiskertoimet olivat: 2,4 keväällä 1988, 2,2 syksyllä 1988 ja 3,2 keväällä 1989.

Monistuminen oli tehokkainta MS-1C alustalla, jolla monistumiskerroin oli 7,5 (Taulukko 4) ja versojen määrä vaihteli vegetatiivisista silmuista tehdyissä aloituksissa välillä 1-18 ja emikukan varsisolukoista tehdyissä välillä 1-22. Paras kasvatusalusta oli MS, LM ja QL olivat heikoimpia.

Keväällä 1988 genotyypin E849 emikukan varresta lähteneisiin aloituksiin alkoi muodostua löyhää vaaleata kallusta. Kalluksen muodostus oli runsainta MS-alustalla. Yhtään versoja ei kuitenkaan erilaistunut ennenkuin kallukset tummuivat viidennen siirtokerran jälkeen ja kuolivat. Syksyllä 1988 saman genotyypin emikukan varresta aloitettuun viljelmään muodostui alustalla LM ensin löyhää kallusta, johon juuri ennen sen tummumista erilaistui kaksi versoja. Versot erotettiin kalluksesta ja siirrettiin tuoreelle LM-alustalle. Versot eivät kuitenkaan pidentyneet, niiden alosaan muodostui tummuvaa kallusta ja ne kuolivat neljännellä siirtokerralla. Kun keväällä 1989 tehtiin aloituksia kylmäsäilytetystä ma-

Taulukko 5. Monistuserroin 1996.

Alusta	Aloitukset, kpl		Versot, kpl	Monistuserroin
	Yhteensä	Versovat		
WPM	114	30	75	2,5
QL	134	30	30	1,0
B	132	35	193	5,5
MS	133	24	113	4,7
LM	136	-	-	-
Yhteensä	649	118	564	4,8

terialaista, saman genotyypin E849 vegetatiivisista silmuista aloitettuihin viljelmiin muodostui jälleen löyhää kallusta MS-alustalla. Kalluksesta erilaistui runsaasti versoja, yhteensä 30 kpl. Kun versot olivat n. 0,5-1 cm:n mittaisia niiden juurella oleva kallus alkoi jälleen tummua nopeasti. Versot kuolivat ennenkuin niitä saatiin pidentymään ja juurtumaan.

Vuoden 1996 lopulla todettiin runsasta kalluksen kasvua genotyypeillä E838, E840, E845, E847, E849 ja E1501. Kallus oli vaaleaa ja löyhää ja siitä erilaistui runsaasti versoja. Eri kasvatusalustojen väliset erot olivat huomattavia. Monistuserroin oli suurin alustalla MS, ja alustalla LM versoja ei monistunut lainkaan (Taulukko 5).

Kalluksen tuotannossa ja versojen erilais-tumisessa oli suuria kloonien välisiä eroja (Taulukko 6). Klooneihin E833, E336 ja E837 ei muodostunut lainkaan havaittavaa kallusta. Kaikissa muissa klooneissa kallusta esiintyi vaihtelevassa määrin, eniten klooneissa E840, E847 ja E1501, joihin myös erilaistui eniten versoja.

## Tulosten tarkastelu

### Kasvatusalustat

Vanhojen lehtikuusten (*L. decidua*) mikroli-säyskokeissa Bonga & von Aderkas (1988) totesivat auksiinin olevan haitallista viljelmille

niiden kaikissa kehitysvaiheissa. Parhaiten vil-jelmät menestyivät, kun niitä pidettiin 2-6 viik-koa sytokiniiniä sisältävällä alustalla ja siirret-tiin sen jälkeen hormonittomalle kasvatusalus-talle. Vuosien 1988-89 kokeen aloitusalustoissa oli suurempi monistuserroin alustoilla, joista puutui thidiazuron (Taulukko 4). Vuon-na 1996 alustoissa käytettiin vain sytokiniiniä BA 2 mg/l. Parhaiten versoja monistui alus-toilla B ja MS (Taulukko 5). Viljelmissä oli runsaammin kallusta kuin vuosina 1988-89, ne olivat parempikuntoisia ja niiden monistuser-roin oli korkea erällä genotyypeillä (Tau-lukko 6).

### Genotyypin vaikutus

Genotyyppien välillä oli suuria eroja versojen määrässä sekä vuosien 1988-89 kokeessa, että vuoden 1996 kokeessa. Vuonna 1996 havait-tiin selviä eroja kalluksen kasvussa eri genotyyp-peillä. Klooneihin E833, E336 ja E837 (Tau-lukko 1) ei kasvanut käytetyillä alustoilla kal-lusta havaittavasti. Klooneille oli yhteistä se, että kaikissa kolmessa risteytyksessä on ollut emikasvina *L. sibirica*. Muissa klooneissa kal-lusta esiintyi vaihtelevassa määrin, eniten klooneissa E840, E847 ja E1501 (Taulukko 1). Niihin myös erilaistui eniten versoja. Kaksi ensimmäistä kloonina, E840 ja E847, edustavat risteytystä *L. decidua* x *gmelinii* var. *japonica*. Kol-maskin *L. kaempferi* -vapaapölytysristeymä on merkitty kantapuurekisteriin *L. decidua* x *kaempferi* -hybridinä (hedepuuna mahdollisesti *L.*

**Taulukko 6.** Monistuserroin/genotyyppi 1996.

Genotyyppi	kpl	Alustat			
		WPM	QL	B	MS
E833	50	1	–	–	–
E836	75	1	1	1	2
E837	60	–	–	–	–
E838	75	3,5	1,5	7,0	1
E840	74	9,5	–	7,0	9,0
E845	75	1,5	1	1,2	1,7
E846	65	2	–	1	–
E847	68	6,7	3,7	41	2,4
E849	62	1	–	5,0	–
E1501	75	3,4	1,3	2,7	2,8

*decidua* tai *L. sibirica*; Saarnijoki, Kärki & Pirttilä, henkilökohtainen tiedonanto Metsäntutkimuslaitokselle 1968). Kalluksen tuotannossa tämä risteymä muistuttaa enemmän *L. decidua*-hybridejä kuin *L. kaempferi*-hybridit E838, E845 ja E846. Tässä kokeessa käytetyillä kasvatusalustoilla *L. sibirica* ja *L. decidua* edustivat kahta ääripäätä kalluksen tuotannon ja siten myös monistumisen suhteen. *L. decidua* on laji, jonka mikrolisäys on vanhasta materiaalista onnistunut parhaiten (Laliberté & Lalonde 1988, Bonga & Pond 1991, Kretzschmar & Ewald 1994, Diner 1995).

## Versojen muodostuminen

Versojen muodostuminen vuosien 1988-89 kokeessa tapahtui kolmella eri tavalla: 1) suora organogeneesi emikukan varren leikkauspinnalla, 2) löyhän kalluksen kautta tapahtuva verson erilaistuminen ja 3) vegetatiivisen silmun avautuminen ja kehittyminen normaalin lyhytversion kaltaiseksi versoksi, jonka alaosaan toisinaan kehittyi jonkin verran kallusta ja adventiiviverso tai muutamia versoja. Tehokkainta monistuminen oli niissä viljelmissä, jotka tuottivat eniten löyhää kallusta. Bonga (1996) kuvailee neljää erilaista kallustyyppiä

36-vuotiaiden *L. decidua*-lajin ja *L. decidua* x *L. leptolepis*-hybridin solukkoviljelmissä. Ne olivat: 1) pehmeä sienimäinen solumassa, joka on muodostunut pienistä ja pitkistä soluista, 2) tasainen, voimakkaan vihreä, pehmeä solukko, 3) hyvin pehmeä oliivinvihreä solukko ja 4) jyvämäinen, paljon kovempi solukko. Niistä ensimmäinen ja kolmas tyyppi muodostivat solukon sisään vihreitä epämääräisen muotoisia kohoumia, joista kehittyi alkion kaltaisia rakenteita ja lopulta versoja.

Vuosien 1988-89 kokeissa muodostuneita kalluksia ei tutkittu tarkemmin, mutta niissä esiintyi kahta eri kallustyyppiä: 1) löyhää vaaleaa kallusta, josta erilaistui versoja ja 2) kovaa vihreää kallusta. Vuoden 1996 kokeessa esiintyi Bongan (1996) kuvailemista tyypeistä kolme ensimmäistä kallustyyppiä, jotka lopulta kaikki tummuivat vanhetessaan. Asetokarmiinilla värjättyinä kallussolut olivat tasakokoisia ja melko pyöreitä nuorena, vielä vaaleassa, joko kellertävässä tai vihreässä kalluksessa. Vanhemmassa kalluksessa solukoko pieneni paikoitellen ja osa soluista oli pitkänomaisia. Solut organisoituivat kalluksen sisällä viuhkamaiseen muodostelmaan. Stereomikroskooppilla kalluksen pinnassa oli nähtävissä vihreitä kohoumia, joista myöhemmin erilaistui versoja.

## Tutkimuksen jatko

Seuraavan koesarjan aikana otetaan mikrolisäykseen risteytyksissä käytettyjen emi- ja hedepuiden puhtaat lajit. Alkuperäisiä risteytysvanhempia ei ole tiedossa, joten viljelyyn otetaan 50- ja 60- luvulla vartetut puut Metsäntutkimuslaitoksen Ruotsinkylän koealueelta. Tar-

koituksena on verrata puhtaiden lajien ja risteytysten menestymistä.

Kallusta tutkimalla pyritään seuraamaan versojen kehittymistä ja kehittämään menetelmää jatkuvaksi kalluksen tuottamiseksi. Itse mikrolisäystekniikan kehittämisessä seuraavassa vaiheessa keskitytään versojen pidentämiin ja niiden juurruttamiseen ja lopulta siirtoon kasvihuoneelle.

## Kirjallisuus

**Bonga, J. M.** 1982. Shoot formation in callus from the stalks of young female strobili of *Larix decidua*. Canadian Journal of Botany 60: 1357–1359.

**Bonga, J. M.** 1984. Adventitious shoot formation in cultures of immature female strobili of *Larix decidua*. Physiologia Plantarum 62: 416–421.

**Bonga, J. M.** 1996. Frozen storage stimulates the formation of embryo-like structures and elongating shoots in explants from mature *Larix decidua* and *L. x eurolepis* trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 91–101.

**Bonga, J. M. & Aderkas, P. von** 1988. Attempts to micropropagate mature *Larix decidua* Mill. In: Ahuja, M. R. (ed.). Somatic cell genetics of woody plants. Proceedings of the IUFRO working party S2. 04-07, Germany 1987. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 155–168. ISBN 90-247-3728-1

**Bonga, J. M. & Pond, S. E.** 1991. Adventitious shoot formation in cultures of 30-year-old *Larix decidua*, *L. leptolepis*, *L. eurolepis* and *L. laricina* trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26: 45–51.

**Boylay, M.** 1979. Propagation *in vitro* du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) par micropropagation de gemination aseptique et culture de bourgeons dormants. Micropropagation d'Arbres Forestieres. Etudes et Recherches 12: 67–75.

**Carter, K. K.** 1984. Rooting of tamarack cuttings. Forestry Science 30: 392–394.

**Chesick, E. E., Bilderback, D. E. & Blake, G. M.** 1990. *In vitro* multiple bud formation by 20-year-old western larch buds and stems. HortScience 25: 114–116.

**Diner, A. M.** 1990. Clonal micropropagation of mature *Larix*. New Forests 4: 63–66.

**Farmer, R. E., Foster, H. A., Bakowsky, O., MacDonald, B., O'Reilly, G., & Reinholt, R.** 1986. A vegetative propagation system for tamarack. Northern Journal of Applied Forestry 3: 91–93.

**John, A.** 1979. Propagation of hybrid larch by summer and winter cuttings. Silvae Genetica 28: 228–225

**Kretzschmar, U. & Ewald, D.** 1994. Vegetative propagation of 140-year-old *Larix decidua* trees by different *in-vitro*-techniques. Journal of Plant Physiology 144: 627–630.

**Laliberté, S. & Lalonde, M.** 1988. Sustained caulogenesis in callus cultures of *Larix x eurolepis* initiated from short shoot buds of a 12-year-old tree. American Journal of Botany 75: 767–777.

**Litvay, J. D., Verma, D. C. & Johnson, M. A.** 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Reports 4: 325–328.

**Lloyd, G. & McCown, B.** 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. The International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings 30: 421–427.

**Lähde, E., Warren, M., Etholen, K. & Silander, V.** 1984. Ulkomaisten havupuulajien varttuneista viljelmistä Suomessa. Summary: Older forest trials of exotic conifers in Finland. Communicationes Instituti Forestalis Fenniae 125. 87 p.

**Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497.

**Quoirin, M. & Lepoivre P.** 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Horticulturae 78: 437–442.



# Metsäpuiden mikrolisäys Slo- vakian Metsäntutkimuslaitoksella

---

Jana Krajnáková

*Department of Forest Genetics and Tree Breeding, Forest Research Institute*

*T. G. Masaryka 22, SK-960 92 Zvolen, Slovakia*

*e-mail: jana@uv.tuzvo.s*

Mikrolisäystudkimus on Slovakian Metsäntutkimuslaitoksella (Forest Research Institute, Zvolen) keskittynyt ensisijaisesti hollantilaista jalavatautia (Dutch Elm Disease) kestävien jalavakloonien lisäykseen. Olemme onnistuneet regeneroimaan *in vitro* -viljelmistä kasveja kaikista testaamistamme *Ulmus pinato-ramosa* ja *U. minor* -lajien genotyypeistä sekä seitsemästä hollantilaisesta kloonista. Genotyypin vaikutusta kaikkiin mikrolisäyksen vaiheisiin arvioitiin. Tulokset osoittivat, että oli tarpeellista kehittää erityinen mikropropagaatiomenetelmä jokaiselle hybridikloonille erikseen. Käytimme isoentsyymimerkkejä määrittääksemme regeneranttien geneettisen identiteetin. Lajilla *U. glabra* tutkittiin myös ponsiviljelyä tavoitteena saada aikaan organogeneesiä tai androgeeneettistä embryogeneesiä. Kuusihybrideillä on tutkittu organogeneesiä käyttämällä lähtöaineistona uinuvia silmuja. Havaitimme silmujen pitkittäistä kasvua ja versojen muodostusta, mutta emme onnistuneet monistuksessa. Onnistuimme myös indusoimaan *Abies cephalonica* -lajin epäkypsistä alkioista somaattista embryogeneesiä, ja tutkimme somaattisten alkioiden edelleen kehittymistä.

*Avainsanat:* *Abies* sp., androgeeneesi, embryogeneesi, jalava, organogeneesi, pihta, ponsiviljely, puuvartiset kasvit, regeneraatio, *Ulmus* sp.

# Abstract

## Micropropagation of forest trees at the Forest Research Institute in Slovakia

Jana Krajnáková

*Department of Forest Genetics and Tree Breeding, Forest Research Institute*

*T. G. Masaryka 22, SK-960 92 Zvolen, Slovakia*

*e-mail: jana@iwt.tuzvo.sk*

Activities have been focused on micropropagation of Dutch elm clones resistant to Dutch Elm Disease. We succeeded in regenerating all *in vitro* cultivated genotypes of *Ulmus pinato-ramosa*, *U. minor* and seven resistant Dutch clones. The effect of genotype at all particular stages of micropropagation was evaluated in detail. Results obtained indicated the necessity to establish an individual micropropagation technique for each of the hybrid clones. We attempted to certify identity of regenerants by means of isozyme gene markers. Anther cultures of *U. glabra* were studied methodically as well, and the experiments were aimed at induction of organogenesis or androgenetic embryogenesis. Experiments with organogenesis of fir hybrids using dormant buds as primary explants have been carried out. We observed longitudinal growth of buds and the establishment of sprouts, but did not succeed in multiplication. In other experiments we induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies cephalonica* and experiments with maturation are continuing.

*Key words:* *Abies* sp., androgenesis, anther culture, elm, embryogenesis, fir, organogenesis, regeneration, *Ulmus* sp., woody plants

## Johdanto

Metsäpuiden mikrolisäystutkimus Slovakian Metsäntutkimuslaitoksella Zvolenissa on perinteiltään melko uutta. Ensimmäiset kokeet liittyivät kahden puusuvun, *Ulmus* sp. ja *Abies* sp, lajien jalostusohjelmaan. Nämä jalostusohjelmat käynnistettiin Zvolenissa 60-luvun alussa. Ohjelmien tärkeimpänä päämääränä on tuottaa elinvoimaisia ja satoisia vaihtoehtoja korvaamaan vähenemässä olevia kotoperäisiä jalavalajeja ja saksanpihtaa (*Abies alba* MILL.).

Jalavatutkimus on toistaiseksi käsittänyt kukintafenologian tutkimusta, plus-puiden valintaa ja kenttäkokeita. Kenttäkokeissa on ollut mukana kotoperäisten ristipölytteisten jalavajälkeläistöjen (vuorijalava, *U. glabra* HUDS.; lehtojalava, *U. minor* MILL.; kynäjalava, *U. laevis* PALL.) lisäksi kaksi siperialaista jalavaprovenienssia (*U. pinnato-ramosa* DIECK.) ja 23 resistenttiä hollantilaista kloonina. Tri. H. Heybroek Metsän- ja luonnon tutkimuslaitoksesta, DeDorschkampista, Alankomaista luovutti ystävällisesti hollantilaiset hybridikloonit käyttööme.

Lehtojalavan ja vuorijalavan suuri alttius hollantilaiselle jalavataudille (Dutch elm disease) on todettu 25 vuoden testausten aikana. Yllättävää kyllä myös siperialainen jalava Keski-Aasiasta (Tashkent-provenienssi) on osoittanut selviä alttiuden merkkejä, kun taas kotoperäisessä kynäjalavassa ei ole havaittu mitään kyseiseen tautiin viittaavia oireita. Tämä laji kestää lisäksi maaperän suolaisuutta ja on siten erityisen lupaava alankojen metsätaloudessa alueilla, joilla pohjaveden taso vaihtelee huomattavasti tai jopa alenee. Viidentoista vuoden iässä hollantilaisten hybridien ylivertainen kasvuvoima (vartettuina vuorijalavan perusrunkoihin) osoitti niiden adaptoituneisuuden paikallisiin ilmasto- ja maaperäoloihin.

Pitkällä tähtäyksellä pyritään interspesifisellä hybridisaatiolla *Abies*-lajien välillä tuotamaan elinvoimaisia vaihtoehtoja vähitellen harvinaistuvalla kotoperäiselle saksanpihtakuuselle. Suunnilleen vuodesta 1968, noin 10 000 kuusihybrididiä 13 lajin välisistä 65 interspesifisestä hybridikombinaatiosta on tuotettu, ja istutettu tutkimuslohkoille erilaisille kasvul-

lisuusvyöhykkeille. Useissa hybridiperheissä on havaittu heteroosia. Sukupuu on varmistettu isoentsyymitutkimuksin 670 hybridistä, jotka kuuluvat 93 hybridiperheeseen.

Molemmissa jalostusohjelmissa vaikeutena on ollut kehittää menetelmä tarkastetun kloonimateriaalin tehokkaaksi tuottamiseksi. Näin erityisesti kuusihybrideillä, joilla pistokkaiden käyttö on vaikeaa ja sitä hankaloittaa useille kuusilajeille tyypillinen plagiotrooppinen kasvu. *In vitro* -menetelmän oletettiin tarjoavan ratkaisu ja samalla laajentavan käytettävissä olevien jalostusmenetelmien valikoimaa. Olemme sen takia pyrkineet kehittämään *in vitro* -tekniikkaa oleelliseksi osaksi jalostusohjelmiamme.

## *In vitro* -menetelmät jalavan jalostus- ohjelmassa

Tutkimus on keskittynyt resistenttien jalavagenotyyppien mikrolisäykseen ja ponsiviljelyyn sekä lisättyjen genotyyppien tunnistamiseen isoentsyymejä käyttäen.

### Resistenttien jalavagenotyyppien mikrolisäys

Olemme tutkineet mikrolisäyksen eri vaiheita: lähtöaineiston sterilointi, viljelmien aloitus, monistus, juurrutus ja taimien siirto *in vivo* -olosuhteisiin. Emokasvin genotyyppillä on huomattava vaikutus mikrolisäyksen eri vaiheisiin (Glock & Gregorius 1986, Read 1992). Se on usein merkittävämpi tekijä kuin esim. kasvatusalustan koostumus ja kasvunsaäteiden pitoisuus. Tavoitteenamme oli kehittää yksilöllinen lisäysmenetelmä erityisesti hollantilaisille hybridiklooneille.

Kuusi hollantilaista hybridikloonina (no. 274, 296, 454, 494, 496, 568), *Ulmus pinnato-ramosa* -kloonit (Tashkent 160 ja Beijing 161 provenienssit) ja lehtojalava otettiin kokeisiin. Krajnáková & Greguss (1992) ovat selostaneet tutkimuksen tarkemmin.

Seuraavia kasvatusalustoja käytettiin viljelmissä: MS (Murashige & Skoog 1962), WPM (Woody Plant Medium; Loyd & McCown 1980), GD (Gresshoff & Doy 1972) ja omat kasvatusalustamme DX ja DM. Viimeksimainitussa eri komponenttien pitoisuuksiksi määritettiin muissa yleisesti metsäpuiden mikroliisäykseen käytetyissä kasvatusalustoissa olevien vastaavien komponenttien suhteellisten pitoisuuksien keskiarvot (Krajnáková 1993).

Kokeissa havainnointiin saastumisprosentti, moniversoisten viljelmien määrä (multiple shoot cultures, MSC %), keskimääräinen versojen lukumäärä emokasvia kohden ja juurtumisprosentti. Tulokset analysoitiin käyttäen varianssianalyysiä (PROC ANOVA, SAS Institute). DMRT-testiä (Duncan's Multiple Range Test) ja t-testejä käytettiin keskiarvojen välisten merkitsevien erojen tunnistamiseksi. Prosenttilukuihin sovellettiin *arcsin*-transformaatiota.

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

### Lähtöaineiston sterilointi

Silmujen kehitysaste ja morfologia vaikuttivat eniten silmumateriaalin steriloinnin onnistumiseen. Hieman avautuneiden silmujen sterilointi oli tehokkaampaa. Pienemmille silmuille voitiin käyttää lyhyempää sterilointiaikaa ja alhaisempaa sterilointiainepitoisuutta.

### Viljelmien aloitus

Aloituksen onnistumisen tehostamiseksi tutkittiin eri kasvatusalustoja ja kasvatettavien silmujen kehitysvaiheen ja emokasvin sijainnin vaikutusta. Klooneilla 454, 494, 496, 568 ja *U. minor*-lajilla kasvun alkaminen ei riippunut käytetystä kasvatusalustasta. WPM-alusta ei sopinut hollantilaiskloonille 296 eikä kummallekaan *U. pinnatoramosa*-provenienssille. Alkuperäisen sijainnin ja silmun kehitysvaiheen vaikutusta testattiin käyt-

tämällä kahdelta eri kasvullisuusvyöhykkeissä sijaitsevalta tutkimuslohkolta peräisin olevaa lähtöaineistoa. Silmumateriaali, joka oli peräisin Palarikovon tutkimuslohkolta Tonavan alangolta Etelä-Slovakiasta osoitti parempaa tulosta *in vitro*, kuin kasvimateriaali Horná Zdánan tutkimuslohkolta Keski-Slovakiasta. Edellämäinittujen selvästi parempi fysiologinen status johtui erityisesti lauhemmasta ilmastosta ja muuten otollisemmista paikallisolosuhteista (pitempi kasvukausi, korkeammat keskilämpötilat, maaperän kivennäisravinteisuus ym.).

### Monistus

Kokeissa pyrittiin optimoimaan sytokiniinin pitoisuutta, tutkimaan auksiinien ja sytokiniinien yhdysvaikutusta, varmentamaan DX- ja DM-alustojen käyttökelpoisuus ja selvittämään kasvimateriaalin alkuperän mahdollinen vaikutus viljelyyn. Monistustehoa pitkällä aikavälillä pyrittiin myös arvioimaan.

Krajnáková (1994) julkaisi sytokiniinin optimipitoisuutta selvittävien kokeiden tulokset. Auksiini ( $\alpha$ -naftaleenietikkahappo, NAA) tasolla 0,1 mg/l käytettynä yhdessä sytokiniinin,  $N^6$ -bentsyyliadeniinin (BA), kanssa (0,5 tai 1,0 mg/l) vaikutti epäedullisesti jalavalajeihin ja -hybrideihin. Kasvu oli merkitsevästi parempaa, kun kasvatusalustaan oli lisätty ainoastaan sytokiniiniä. Auksiineilla ei ollut edistävää vaikutusta monistuvuuteen. Koostumukseltaan uudenlaisia alustoja, DX ja DM, testattiin hollantilaiskloonin 296. DX-alustaa kokeiltiin myös klooneilla 296, 494, 496, ja *U. minor*-lajilla, puu no. 1. Kahta WPM-alustaa, joihin oli lisätty joko 0,5 tai 1,0 mg/l BA:ta, käytettiin kontrollialustoina. Sekä DX- että DM-alustat vaikuttivat edullisesti versojen keskipituuteen. Toisaalta niiden vaikutus versoutumisprosenttiin oli vain vähäinen.

Kasvimateriaalin alkuperän vaikutusta monistuvuuteen tutkittiin hollantilaiskloonilla 949 'Dodoens'. Alkuperien välillä ei havaittu eroja versoutumisprosentissa eikä keskimääräisessä versoluvussa lähtösilmua kohti. Pitkän aikavälin tulokset monistumisesta ovat välttämättömiä, jotta voitaisiin kehittää käytäntöön so-

tömiä, jotta voitaisiin kehittää käytäntöön soveltuvia lisäysmenetelmiä. Useita versoja tuotavien viljelmien syntyminen saavutti huippunsa 4. ja 5. siirrostuksen aikana, eli 4-5 kuukautta viljelyn aloittamisesta.

## Juurtuminen

Kokeiden päämääränä oli optimoida GD- ja WPM-alustojen koostumusta määrittämällä soveltuva auksiinipitoisuus (0,3; 1,0 tai 5,0 mg/l). Huolimatta yksittäisistä poikkeavista tuloksista korkein keskimääräinen juurtuminen saatiin GD ja WPM -alustoilla, joihin oli lisätty 0,3 - 1,0 mg/l auksiinia (indoli-3-voihappoa, IBA). Sitä suurempi auksiinipitoisuus (5,0 mg/l) lisäsi kalluksen tuottoa. GD-alusta, johon oli lisätty 1 mg/l IBA:ta osoittautui parhaaksi kaikille muille genotyypeille paitsi hollantilaiskloonille 296.

## Adaptoituminen *in vivo* -olosuhteisiin

Juurtumisen jälkeen regenerantit siirrettiin turve-perliittiseokseen. Ilmankosteus oli pidettävä korkeana vähintään kaksi viikkoa siirron jälkeen. Adaptoitumisen alhaiseen kosteuteen, runsaaseen valoon ja vaihteleviin lämpötiloihin on tapahduttava vaiheittain, joista jokaisen on kestettävä useita vuorokausia.

Kolme vuotta kestäneiden *in vitro* -kokeiden aikana onnistuttiin regeneroimaan kasveja kaikista muista testatuista kloonista paitsi hollantilaisklooneista 274 'Comelin' ja 568 'Clusius'. *In vitro* -viljelyn aikana havaittiin suuria kloonikohtaisia eroja sekä hollantilaisten kloonien että yksittäisten jalavalajien välillä (Krajňáková 1993). Saatujen tulosten pohjalta on mahdollista kehittää mikrolisäysohjeistot käytännön sovellutuksia varten. Tarkoituksemme on tarkistaa menetelmien toimivuus ja perustaa lähivuosina kenttäkokeita regeneroitujen puiden adaptoituneisuuden testaamiseksi.

## Vuorijalavan ponsiviljely

Ponsiviljelyn avulla on mahdollista laajentaa jalavien resistenssijalostuksessa käytettävien menetelmien valikoimaa. Onnistuessaan *in vitro* -ponsiviljely mahdollistaisi geenitekniikan soveltamisen organogeneesin tai embryogeneesin kautta regeneroiduilla kasveilla. Menetelmää testattiin kolmella vuorijalavan genotyypillä. Mikrosporien kehitysvaihe määritettiin mikroskooppipreparaateista. Puilla no. 1 ja 2 mikrosporit olivat viljelmien alussa yksitumavaiheessa, kun taas puulla no. 3 kaksitumavaiheessa. Peruskasvatusalustana aloituksissa käytettiin MS-alustaa, johon oli lisätty 20 g/l sakkaroosia. Testattavat MS-pohjaiset kasvatusalustat poikkesivat kasvunsäätien suhteen seuraavasti: H1: 0,5 mg/l 2,4-D (2,4-dikloorifenoksetikkahappo) + 0,1 mg/l kinetiini, H2: 1,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l kinetiini, H3: 1,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l kinetiini; kontrollialusta K oli MS ilman kasvunsäiteitä. Saatua kallus siirrettiin uudelle kasvatusalustalle joka 4. viikko. Emäpuiden vaikutusta ja aloitusalojen välisiä eroja selvitettiin vertaamalla kallusten läpimittaa. Tuloksia tarkasteltiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA). Genotyypit ja kasvatusalustat olivat luokamuuttujia, ja kasvatusalustan vaikutusta tarkasteltiin erikseen yksisuuntaisen varianssianalyysin avulla.

Alaviljelmillä pyrittiin indusoimaan organogeneesiä käyttämällä kolmea MS-alustan muunnosta: B1: 0,5 mg/l BA, B2: 1,0 mg/l BA ja B3: 1,0 mg/l BA + 0,01 mg/l NAA. Ajoittaisella kallusten punnitsemisellä seurattiin kalluksen kehitystä. Tulokset analysoitiin varianssianalyysillä. Lisäksi havainnointiin kalluksen väriä (valkea, vihreä) ja adventiivisilmujen muodostumista.

Ponsiviljelyn havaittiin riippuvan genotyypistä. Kallusten keskikoko ( $\text{mm}^3$ ) parhaalla genotyypillä, puu no. 1, oli  $43,39 \text{ mm}^2$  ensimmäisen viljelyjakson jälkeen ja keskipaino  $1,809 \text{ g}$  ensimmäisen alaviljelyn jälkeen. Tämä

genotyyppi tuotti myös eniten adventiivisilmuja tuottavaa kallusta. Kasvatusalustat H2, H3 (aloitusviljely) ja B3 (alaviljely) osoittautuivat parhaiksi ponsiviljelmille.

## Emokasvien ja *in vitro* -regeneranttien tunnistus käyttäen isoentsyymejä

Isoentsyymianalyysiä sovellettiin hollantilaisklooneihin 274, 296, 454, 494, 496, 568, kahteen *U. pinnato-ramosa* -klooniiin ja yhteen lehtojalavan klooniiin. Toisistaan poikkeavia isoentsyymifenotyyppisiä identifioitiin kaikista testatuista klooneista. Fenotyyppien erottaminen oli mahdollista lokuksissa Aap, Aco-A, Per-A, -B, Mdh-B, Got-A, -B, -C ja Pgi-A. Toisaalta muuntelua ei löytynyt lokuksista Aco-B, 6Pgd-A, -B, Mdh-A, -C, -D ja Idh. Hollantilaisten kloonien interspesifinen hybridialkuperä helpottaa niiden indentifioimista.

*In vitro* -regeneranttien identiteetin varmistamiseksi isoentsyymianalyysi tehtiin nuoresta lehtisolukosta 200:lle 15 viikon ikäiselle hollantilaisklooneista 294 ja 496 saadulle regenerantille. Toistettavat zymogrammit saatiin lokuksissa Aco-B, Mdh-B, Mdh-C, Mnr, Per-A, Per-B ja Idh. Kun lokuksissa Aco-B, Idh ja Mnr ei havaittu muuntelua, neljä muuta polymorfista lokusta ei riittänyt suoraan tunnistamiseen. Menetelmällä paljastettiin kuitenkin kaksi väärin merkittyä lehtojalavayksilöä (puu no. 1).

Toistettavia zymogrammeja tuottavien lokusten lukumäärä osoittautui rajoittavaksi tekijäksi identifiointissa, jossa lehtisolukkoa analysoitiin. Lehtisolukkoa käytettiin, jotta ei tuotettaisi suurta vahinkoa nuorille regeneranteille. Muiden kasvinosien, esim. juurenkärkien käyttö olisi vahingoittanut kasveja enemmän.

Somakloonista muuntelua ei havaittu. Toisaalta analysoitujen regeneranttien ja tutkittujen lokusten määrä oli liian alhainen, jotta yleisiä päätelmiä voitaisiin tehdä.

## *In vitro* -menetelmien soveltaminen *Abies*-lajien jalostukseen

### Tulokset kasvullisesta lisäyksestä

Slovakian Metsäntutkimuslaitoksella suoritettiin koesarja 1988-90 tarkoituksena selvittää interspesifisien kuusihybridien kasvulliseen lisäykseen vaikuttavien tekijöiden luonnetta. Genotyyppiin, juurrutusseoksen ja lisäystekniikan vaikutuksia arvioitiin. Juurrutusprosentti vaihteli huomattavasti kasviyksilöstä toiseen (33,3-91,6 %). Juurrutusseoksen lämmittäminen lisäsi juurtuneiden kasvien määrää metkitsevästi. Seos, joka koostui hiekasta, perliitistä ja turpeesta suhteissa 1:1:1, osoittautui sopivimmaksi juurrutukseen. IBA:illa ei ollut vaikutusta. Kasvien koulinta ei aiheuttanut hävikkiä. Kuitenkin juurrutetuilla kasveilla oli plagiotrooppista kasvua vielä 4-5 vuotta taimitarhaan istutuksen jälkeen.

### *In vitro* -lisäys

Saksanpihta on yksi vaikeimmista metsäpuulaeista sovellettaessa *in vitro* -menetelmiä. Adventiivisilmujen induktio lajilla ei ole onnistunut käyttämällä lepotilassa olevia silmuja lähtöaineistona. Havaitsimme interspesifisten hybridien välisiä yksilöllisiä eroja viljelyvas-teessa viljellessämme levossa olevia silmuja. Jotkut *Abies*-hybridit (esim. *cephalonica* x *alba*, *ciliacea* x *alba* ja *alba* x *pinsapo*) olivat elossa vielä 6-8 viikon viljelyn jälkeen, mutta useimpien muiden hybridien lähtöaineisto nekrotisoitui täydellisesti samalla kasvatusalustalla samassa ajassa. Voidaan päätellä, että *in vitro* -viljelykel-poisuus on geneettisesti määräytyvää.

Esimerkit muilla lajeilla osoittavat, että emokasvien esikäsittely - esim. kasvunsäätien ruiskuttaminen oksiin, joista primäärinen lähtöaineisto kerätään - saattaa edistää adventiivisilmujen muodostusta.

Somaattinen embryogeneesi on yleisesti onnistunut kypsistä ja epäkypsistä alkiosta ja protoplastiviljelmistä *Abies*-suvulla (Schuller *et al.* 1989, Hartmann *et al.* 1992, jne). Tämä avaa uusia mahdollisuuksia lisätä kuusia *in vitro*. Me onnistuimme indusoimaan somaattista embryogeneesiä ristipölytyksen tuloksena saaduista alkiosta *Abies numidica* -lajilla käyttäen Schenkin ja Hildebrantin (1972) kasvatusalustaa, johon oli lisätty 0,5 mg/l BA:ta, 0,5 mg/l kinetiiniä ja 1 mg/l 2,4-D:tä. Kallus vaihteli muodoltaan ja rakenteeltaan. Vaaleat ja osittain läpinäkyvät kallukset luokiteltiin embryogeenisiksi. Niiden kasvu oli suhteellisen nopeaa. Emme ole onnistuneet erilaistamaan kalluksesta somaattisia alkiota. Ei-embryogeeninen kallus oli väriltään vihreää ja nekrotisoitui aikaisemmin kuin embryogeeninen kallus.

Somaattisen embryogeneesin induktion avulla saatettaisiin kiertää useita kuusien *in vitro*-regeneraatiolle tyypillisiä ongelmia. On kuitenkin tärkeää käyttää nuorta kasvisolukkoa embryogeenisen kalluksen tuottamiseen. Tällä menetelmällä ei siis voi lisätä lupaavia hybridejä, joiden arviointi on vienyt useita vuosia kenttäkokeissa. Niiden kasvullinen monistaminen tuntuu olevan mahdollista ainoastaan

perinteisen autovegetatiivisen lisäyksen avulla - mikäli plagiotrooppista kasvua voidaan ehkäistä esim. kiihdyttämällä keinotekoisesti kasvua useasta kasvupisteestä.

## Muiden lajien mikrolisäys

Olemme käyttäneet *in vitro* -menetelmiä Douglas-kuusien eri provenienseista ja paikallisista siemenlähteistä peräisin olevien alkioiden kasvun vertaamiseksi. Eristettyjen alkioiden viljelyvastetta arvioitiin havainnoimalla kallusprosenttia, organogeneesiä ja adventiivisilmujen muodostumista. Alkiota kasvatettiin MS-alustalla, johon lisättiin eri määriä BA:ta (0,5; 1,0 ja 1,5 mg/l). Emme havainneet merkitseviä eroja paikallisen siemenprovenienssin (Dobrá Niva) ja Washingtonista peräisin olevan ostetun siemenen välillä (Krajnáková & Kovalčík 1997). Mikrolisäysmenetelmistä adventiivisilmujen indusointi vaikuttaa soveltavalta tavalta lisätä kaupallisesti arvokasta siementä, joka on paikallista alkuperää.

Tällä hetkellä keskitymme imeläkirsikan (*Prunus avium*) ja metsähaavan (*Populus tremula*) eliitipuiden mikrolisäykseen.

# Kirjallisuus

---

- Glock, H. & Gregorius, R.** 1986. Genotype environment interaction in tissue cultures of birch. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 477–482.
- Gresshoff, P. M. & Doy, C. H.** 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107: 161–170.
- Hartmann, S., Lang, H. & Reuther, G.** 1992. Differentiation of somatic embryos from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Abies alba*. *Plant Cell Reports* 11: 554–557.
- Krajňáková, J. & Greguss, L.** 1992. Micropropagation of resistant elm cultivars using the organ cultures. *Acta Instituti Forestalis Zvolensis* 8: 9–20.
- Krajňáková, J.** 1993. Utilization of tissue cultures in the tree breeding programs of forest trees on example *Ulmus* sp. The Comenius University, Bratislava, Slovakia. 128 p. (PhD thesis)
- Krajňáková, J.** 1994. Micropropagation of resistant elm cultivars - optimization of cytokinin concentration. In: Pardos, J. A., Ahuja, M. R. & Rossello, R. E. (eds). *Biotechnology of trees. Proceedings of the IUFRO Working Party S2.04-07. Somatic cell genetics. Valsain, Spain, October 18–22, 1993.* p. 57–58. (ISSN 1131-7965)
- Krajňáková, J. & Longauer, R.** 1996. Culture initiation, multiplication and identification of *in vitro* regenerants of resistant hybrid elms. *Lesnáctvá - Forestry* 42: 261–270.
- Krajňáková, J. & Kovalčík, M.** 1997. Hodnotenie reakcie embryokultúr duglasky odvodených z roznych semenných partii. *Lesnícky Nasopis*, 42. (in press)
- Lloyd, G. & McCown, B. H.** 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latiflora*, by use of shoot-tip culture. *The International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings* 30: 421–427.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Read, P. E.** 1992. Environmental and hormonal effects in micropropagation. In: Kurata, K. & Kozai, T. (eds). *Transplant production systems.* Dodrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 231–246. ISBN 0-7923-1797-1
- Schenk, R. U. & Hildebrandt, A. L.** 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 99–204.
- Schuller, A., Reuther, G. & Geier, T.** 1989. Somatic embryogenesis from seed explants of *Abies alba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17: 53–58.



# Mikrolisäyksen tehostamisen mahdollisuudet ja mekanismit - mallikasveina sinikuusama ja omena

Saila Karhu

MTT, Puutarhatuotannon tutkimuslaitos, Toivonlinnantie 518, 21500 Piikkiö  
e-mail: saila.karhu@mtt.fi

Tutkimuksessa etsittiin keinoja ja selitysmalleja puuvartisten puutarhakasvien mikrolisäyksen tehostamiseksi. Koemateriaalina käytettiin sinikuusaman (*Lonicera caerulea* L.) *caerulea*- ja *edulis*-muotoja sekä neljää omenan (*Malus domestica* Borkh.) genotyyppiä. Sinikuusaman lehtihankaversojen kehittymistä voidaan huomattavasti edistää seuraavin keinoin: 1) lajille sopivan sytokiniinikasvunsaateen, N<sup>6</sup>-bentsyyliadeniinin pitoisuutta ravintoalustassa nostamalla, 2) vähentämällä alustan mineraalipitoisuutta Murashigen ja Skoogin MS-alustan pitoisuudesta ja 3) kohottamalla versoviljelmien kasvatuslämpötilaa. Sinikuusaman mikropistokkaiden juuriston kokonaispituutta voitiin lisätä, kun pistokkaiden juurrutukseen käytetyn ravintoalustan mineraalipitoisuutta vähennettiin. Mineraalipitoisuus ei vaikuttanut juurtuneiden versojen eikä versoista lähtevien juurten määrään, mutta se vaikutti juurten pituuskasvuun ja haarautumiseen. Lehtihankaversojen muodostuminen lisääntyi kahdessa neljästä testatusta omenalajikkeesta, kun versoviljelmien ravintoalusta sisälsi sakkaroosin sijasta sorbitolia. Sakkaroosipitoinen juurrutuslusta edisti juurtumista ja mikrolisättyjen taimien jatkokasvua enemmän kuin sorbitolialusta. Kemialliset analyysit osoittivat, että omenan mikrolisätyt versot eivät käytä sorbitolia yhtä tehokkaasti kuin sakkaroosia. Lisäksi kyseiset hiilihydraatit vaikuttavat siihen, kuinka paljon versot sisältävät mineraaliravinteita, erityisesti booria ja sinkkiä.

*Avainsanat:* hankasilmut, hiilihydraatit, *in vitro*, *Lonicera caerulea*, lämpötila, *Malus domestica*, mikroversot, puuvartiset kasvit, ravinteet, versoviljelmät

# Abstract

## Possibilities and mechanisms to enhance micropropagation - blue honeysuckle and apple as model species

Saila Karhu

*Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Horticulture,*

*Toivonlinnantie 518, FIN-21500 Piikkiö*

*e-mail: saila.karhu@mtt.fi*

Means and models for improving micropropagation of woody plants were researched. Study material included the *caerulea* and *edulis* forms of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) and four apple (*Malus domestica* Borkh.) genotypes. The study showed that the development of the axillary buds of blue honeysuckle is considerably enhanced by reducing the mineral content of Murashige and Skoog medium and by increasing the incubation temperature of the shoot cultures, in addition to increasing the concentration of the cytokinin growth regulator, N<sup>6</sup>-benzyladenine in the medium. The total length of roots of honeysuckle microcuttings was increased by decreasing the mineral content of the root induction medium. The mineral content had no effect on rooting or the number of roots per shoot, but it influenced the growth and branching of those roots. We were able to increase formation of axillary buds with two of the four tested apple varieties by replacing sucrose in the medium with sorbitol. In the rooting medium sucrose enhanced rooting frequency and further development of the micropropagated plantlets more than sorbitol. Chemical analysis showed that micropropagated apple shoots do not metabolize sorbitol as effectively as sucrose and that these carbohydrates influence the content in shoots of certain mineral nutrients, such as boron and zinc.

*Key words:* axillary buds, carbohydrates, *in vitro*, *Lonicera caerulea*, *Malus domestica*, micro shoots, nutrients, shoot culture, temperature, woody plants

## Johdanto

Kasveja voidaan kloonata - lisätä muuttamatta perintötekijöistä riippuvia ominaisuuksia - usealla eri tavalla. Mikrolisäys, kasvien monistaminen pienistä kasvinosista tai solukoista keinotekoisella ravintoalustalla aseptisissä oloissa, perustuu puutarhakasveilla useimmiten lehtihangoissa olevien kasvupisteiden aktivoimiseen kasvunsäätin. Kasvatusastioissa, kiinteytetyllä ravintoalustalla kasvaneet lehtihankaversot irrotetaan alkuperäisestä versopalasta, juurutetaan ja siirretään pieninä mikrotaimina kasvihuoneoloihin.

Mikrolisäys on kasvibioteekniikan laajimmin kaupallisesti hyödynnetty osa-alue. Arvioidaan, että nykyisin mikrolisäyksellä tuotetaan noin puoli miljardia tainta vuosittain (Debergh 1994). Mikrolisäystä hyödynnetään myös muun muassa terveen ydinkasviaineiston, uusien lajikkeiden ja vaikeasti muulla tavoin lisättävien kasvien tuotannossa sekä kansainvälisessä taimivaihdossa. Sitä käytetään myös muiden bioteknisten sovellusten yhteydessä sekä geenipankeissa kasvigenotyyppien viileä- ja pakkassäilytyksessä.

Puuvartisten kasvien mikrolisäyksen lehtihankaversojen kehittymisen avulla on joissakin harvoissa tapauksissa havaittu olevan erittäin tehokasta. Kinolangervon (*Spiraea × vanhouttei*) yhdestä versopalasta saadaan 4-6 viikon viljelykierron aikana kehittymään 50-200 uutta versoa (Yang & Read 1993). Yleensä lisääntyminen on huomattavasti hitaampaa. Esimerkiksi hedelmäpuiden tyyppilliseksi lisääntymiskertoimeksi viljelykierron aikana on arvioitu 1,8-3,5 (Martinelli 1991).

Mikrolisäysviljelmien tuottavuuteen vaikuttavat lisättävän kasvin ominaisuuksien lisäksi useat viljelyympäristön ominaisuudet. Viljelmän mineraaliravinteiden ja kasvunsäätin tarpeen määrittäminen muodostaa perustan ravintoalustan optimointityössä (de Foscard 1995). Myös muiden kemiallisten sekä fyysikkallisten ympäristötekijöiden säätö voi oleellisesti lisätä mikrolisäyksen tehokkuutta (Kozai *et al.* 1995).

Suomessa aidon, kestäväksi testatun puutarhakasvien taimistomateriaalin tarve on suu-

ri, ja kuusamat (*Lonicera*) ovat yksi tärkeimmistä viherrakentamisessa käytetyistä kasvisuvuista (Juhanoja 1992). MTT:n Puutarhatuotannon tutkimuslaitoksessa on selvitetty lisäysoolosuhteiden optimointia kuusamien mikrolisäyksessä. Työn toisessa osuudessa tutkittiin yhden mikrolisäysympäristössä vaikuttavan tekijän, hiilihydraattilähteen, mahdollisuuksia ja vaikutusmekanismeja tuotannon tehostamisessa. Mallikasvina tässä työssä käytettiin omenaa.

## Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksessa käytettiin kahta sinikuusaman (*Lonicera caerulea* L.) genotyyppiä, jotka edustivat *caerulea*- ja *edulis*-muotoja, sekä neljää omenan (*Malus domestica* Borkh.) lajiketta. Hankaversokasvustot perustettiin ja viljeltiin MS-ravintoalustasta (Murashige & Skoog 1962) muokatuilla alustoilla (Karhu 1995, 1996, 1997a). Omenan mikropistokkaat juurutettiin Lepoivre-ravintoalustasta (Quoirin *et al.* 1977) muokatulla alustalla (Karhu & Ulvinen 1995).

Sinikuusaman *caerulea*-muodon lehtihankaversojen monistumisen lisäämiseksi verrattiin sytokiniinien, kinetiini ja  $N^6$ -bentsyyliadeniini (BA), vaikutusta  $2 \text{ mg l}^{-1}$  pitoisuuksina, testattiin BA:n vaikutusta  $0,25\text{-}4 \text{ mg l}^{-1}$  pitoisuuksina sekä tutkittiin arvoihin pH 5,4; 5,7; 6,0 tai 6,3 kasvatuksen alussa säädetyn ravintoalustan happamuuden vaikutusta. Kasvattamalla *edulis*-muodon versoja ravintoalustalla, jonka mineraalipitoisuus oli 50, 75 tai 100 % MS-alustan pitoisuuksista, tutkittiin miten mineraaliravinteet vaikuttavat lehtihankaversojen kehittymiseen. Lämpötilojen 24/20 °C (päivän ylin/yön alin keskilämpötila kasvatushuoneessa), 26/20 °C ja 28/21 °C vaikutusta tutkittiin molempien sinikuusamamuotojen versojen kehittymiseen. Lisäksi tutkittiin, voidaanko mikropistokkaiden juurtumiseen vaikuttaa säättämällä ravintoalustan mineraalipitoisuus *caerulea*-muodolla tasolle 50 tai 100 % MS ja *edulis*-muodolla tasolle 25 tai 50 % MS. Tarkemmat yksityiskohdat tutkimusolosuhteista on kuvattu aiemmissa julkaisuissa (Karhu 1996, 1997a, 1997b).



**Kuva 1.** Kasvatustilapötilan vaikutus sinikuusaman *edulis*-muodon versojen kehittymiseen. Vasemmalla lämpötilassa 28/21 °C (päivän ylin/yön alin keskilämpötila), keskellä lämpötilassa 26/20 °C ja oikealla lämpötilassa 24/20 °C kasvaneita versoja kaksi kuukautta kestäneen viljelykierron jälkeen.

rioituminen oli yleistä. Ei ole selvitetty, millä mekanismilla korkeampi lämpötila edistää lehtihankaversojen muodostumista. Sinikuusamalla havaittu pienentynyt lehtikoko korkeimmissa lämpötiloissa viittaa mahdollisesti lisääntyneeseen sytokiniinien vaikutukseen (Medford *et al.* 1989).

Juurutusvaiheessa ravintoalustan mineraalipitoisuus ei vaikuttanut kummankaan sinikuusamamuodon juurtuneiden versojen määrään eikä versoihin kehittyvien juurten määrään. Alemmissa mineraalipitoisuuksissa juuret kuitenkin kasvoivat pitemmiksi ja haarautuivat enemmän, minkä johdosta juuristojen kokonaispituudet olivat juurutusvaiheen jälkeen keskimäärin kaksinkertaiset verrattuna korkeammassa mineraalipitoisuudessa kehittyneiden juuristojen pituuteen.

### **Hiilihydraattien vaikutus omenan mikrolisäyksessä**

Omenalajikkeiden sakkaroosi- ja glukoosialustoilla tuottamien versojen massoissa ei ollut suuria eroja. Sen sijaan sorbitolialustalla versot jäivät lyhyemmiksi ja tuorepaino oli alhaisin. Neljästä testatusta lajikkeesta kahden lehtihankaversojen määrä oli kuitenkin sorbitolialustalla suurin: McIntosh-lajikkeen lisääntymiskerroin kuuden viikon viljelykierron aikana nousi 2,6:sta 4,8:aan ja Jaspi-lajikkeen kerroin 0,4:stä 1,7:ään, kun versot siirrettiin lisääntymään sakkaroosialustalta sorbitolialustalle.

McIntosh-lajikkeen versojen hiilihydraattien käytön analysointi osoitti, että sorbitoli ei edistänyt hiilihydraattien ottoa ravintoalustasta eikä niiden kulutusta aineenvaihduntaan.

Hiilihydraattilähteiden, sakkaroosin (28 g  $\Gamma^{-1}$ ), glukooosin (30 g  $\Gamma^{-1}$ ) ja sorbitolin (30 g  $\Gamma^{-1}$ ), vaikutusta tutkittiin omenalajikkeiden Gala, Jaspi, McIntosh ja Make mikroversojen muodostumiseen. Erillisessä kokeessa tutkittiin, miten McIntosh-lajikkeen versoviljelmät käyttivät hiilihydraatteja kasvaessaan sorbitolia tai sakkaroosia (30 g  $\Gamma^{-1}$ ) sisältävällä ravintoalustalla. Koeolosuhteet on kuvattu aiemmissa julkaisuissa (Karhu 1995, 1996).

Lisäksi selvitettiin, miten sakkaroosi ja sorbitoli vaikuttivat McIntosh- ja Gala-lajikkeiden versojen mineraalipitoisuuksiin. Mineraalimäärittäjä varten versoja viljeltiin toistuvasti 30 g  $\Gamma^{-1}$  sakkaroosia sisältävällä ravintoalustalla, tai ne siirrettiin 30 g  $\Gamma^{-1}$  sorbitolia sisältävälle alustalle yhden tai kahden viljelykierron ajaksi. Seuraavien mineraalien pitoisuudet versojen lehti- ja varsiosista määritettiin ICP-emissiospektroskoopilla: Ca, K, P, Mg, S, Cu, Zn, Mn, Fe, B ja Na.

Sakkaroosipitoisella ravintoalustalla kasva-neista McIntosh- ja Make-omenalajikkeiden versoviljelmistä irrotettuja mikropistokkaita juurutettiin sakkaroosi-, fruktoosi-, glukooosi-, sorbitoli- tai ksylitolipitoisilla (30 g  $\Gamma^{-1}$ ) juuritus-alustoilla (Karhu & Ulvinen 1995). Juurimäärien havainnoinnin jälkeen juurtuneet versot siirrettiin koeputkista turvealustalle taimikasvatusoloihin, ja versojen kasvua seurattiin neljän viikon ajan.

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

### Sinikuusaman mikrolisäyksen tehostaminen

Testatuista sytokiniineistä BA lisäsi sinikuusaman lehtihankaversojen muodostumista huomattavasti enemmän kuin kinetiini. Ero näkyi erityisesti toisen asteen lehtihankaversojen (haarojen) kehittämisessä: kinetiini-alustalla niitä muodostui keskimäärin vain yksi jokaiseen ravintoalustalle siirrettyyn versopalaan, BA-alustalla yhdeksän. Ravintoalustan BA-pitoisuuden li-

sääntyessä myös muodostuvien ensimmäisen, toisen ja kolmannen asteen lehtihankaversojen määrä kasvoi lineaarisessa suhteessa: versojen yhteismäärä oli alimmalla pitoisuudella (0,25 mg  $\Gamma^{-1}$ ) kolme ja korkeimmalla pitoisuudella (4 mg  $\Gamma^{-1}$ ) kolmetoista. Myös muodostuneiden versojen yhteispituus ja massa sekä alkuperäisen siirrosteverson tyvelle muodostuneen kalluslukulon määrä kasvoivat lineaarisessa suhteessa BA-pitoisuuteen.

Sytokiniinien kulkeutuminen ja vaikuttavassa muodossa pysyminen vaihtelevat eri kasvilajien solukoissa (Biondi *et al.* 1984, Nordström & Eliasson 1986). Kokeissamme BA kulkeutui tehokkaasti sinikuusaman versoissa ja vaikutti hajoamatta kauan viljelykierron aikana. Lineaarinen versomäärän lisäys osoitti myös, että BA:ta sitovien reseptorien (Palme 1993) määrä on riittävä käytetyille sytokiniinipitoisuuksille.

Ravintoalustan pH:n säätö viljelyn alussa ei vaikuttanut sinikuusaman lehtihankaversojen määrään, mutta happamimmalla alustalla (pH 5,4) versojen pituuskasvu hidastui. Tulos osoitti, että ravintoalustojen happamuuden säätöön kannattaa kiinnittää huomiota, sillä esimerkiksi MS-alustan pH saattaa laskea kyseiseen arvoon autoklavoinnin aikana.

Sinikuusaman *edulis*-muodon lehtihankaversojen kehittymistä voitiin tehostaa käyttämällä ravintoalustan mineraalipitoisuutena 75 % MS-ravinteista. Versojen muodostui 170 % määrästään, joka kehittyi normaalilla MS-alustalla. Korkean mineraalipitoisuuden ja erityisesti typpimäärän on osoitettu vähentävän myös eräiden muiden puuvartisten lajien mikrolisäysethokkuutta (Piagnani & Eccher 1988). Myös 50 % MS-mineraaliravinnemäärä edisti sinikuusaman versojen muodostumista, mutta tällöin kehittyi runsaasti kärjestään kuolleita versoja.

Kasvatuslämpötila vaikutti sinikuusaman versojen muodostumiseen (Kuva 1). *Caerulea*-muodon versojen lisääntymiskerroin nousi viidestä kahdeksaan ja *edulis*-muodon lisääntymiskerroin kuudesta yhdeksääntoista, kun kasvatuslämpötila nousi tasolta 24/20 °C tasolle 26/20 °C. Lämpötilan nosto tasolle 28/21 °C lisäsi kerrointa edelleen, mutta versojen laatu huononi: ne olivat hentoja ja ja kärkien vau-

Versonmuodostuksen lisääntyminen ei siis johtunut sorbitolin tehokkaammasta käytöstä vaan jostakin muusta vaikutusmekanismista. Liukoisten hiilihydraattien määrä oli suurin sorbitolialustalla kasvaneissa versoissa. On esitetty, että korkea hiilihydraattipitoisuus versoissa voi aiheuttaa muutoksia versojen erilaistumisessa (Kinet 1995). Hiilihydraattitaso on myös osoitettu vaikuttavan omenan lehtisolukoiden mineraaliravinneaineenvaihduntaan (Lee & Titus 1993), mikä voi vaikuttaa solukoiden erilaistumiseen.

Ravintoalustan sakkaroosin korvaaminen sorbitolilla vaikutti vain joidenkin mineraalien pitoisuuksiin Gala- ja McIntosh-lajikkeiden versoissa. Kummankin lajikkeen versojen boori- ja sinkkipitoisuudet lisääntyivät merkittävästi. McIntosh-lajikkeen lehtisolukoiden sinkkipitoisuus lisääntyi kahden viljelykierron aikana sorbitolialustalla 240 %:iin ja booripitoisuus 260 %:iin alkuperäisistä, sakkaroosialustalla mitatuista pitoisuuksista.

Sekä sinkin että boorin tiedetään vaikuttavan kasvunsäätöiden aineenvaihduntaan kasvisolukoissa (Marschner 1986, p. 306, 327). Omat tuloksemme osoittivat, että hiilihydraatit voivat vaikuttaa omenan lehtihankaversojen kehittymiseen, ja siten mikrolisäystekokkuuteen mineraaliaineenvaihdunnan kautta.

Omenan mikrolisätyjen versojen juurrutuskoe osoitti versojen juurtumisen sekä taimien jatkokasvun ja sopeutumisen heikomaksi, jos versot juurrutettiin sakkaroosin sijasta sorbitolia sisältävällä ravintoalustalla. Sekä sorbitolin sakkaroosia vähäisempi käyttö aineenvaihduntaan, että sen vaikutuksesta kohonnut sinkkipitoisuus versoissa saattavat selittää heikomman juurrutustuloksen sorbitolialustalla. Sinkinhän tiedetään estävän juurten kehittymistä (Godbold *et al.* 1983). Vastaava juurtumiserot samoja hiilihydraatteja käytettäessä on havaittu myös muilla omenalajikkeilla (Moncousin 1991).

## Kirjallisuus

**Biondi, S., Canciani, L. & Bagni, N.** 1984. Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured *in vitro*. Canadian Journal of Botany 62: 2385–2390.

**Fossard, R. A. de** 1995. Where now the broad spectrum experiment? Plant Tissue Culture and Biotechnology 1: 122–125.

**Debergh, P.** 1994. *In vitro* culture of ornamentals. In: Vasil, I. K. & Thorpe, T. A. (eds). Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 561–573. ISBN 0-7923-2493-5

**Godbold, D. L., Horst, W. J., Marschner, H., Collins, J. C. & Thurman, D. A.** 1983. Root growth and Zn uptake by two ecotypes of *Deschampsia caespitosa* as affected by high Zn concentrations. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 112: 315–324.

**Juhanoja, S. K.** 1992. Selection of hardy, attractive and correctly named woody ornamental clones from existing plantations in Finland. Acta Horticulturae 320: 241–243.

**Karhu, S. T.** 1995. The quality of applied carbohydrates affects the axillary branching of

apple microshoots. Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux 30: 21–27.

**Karhu, S.** 1996. Enhancement of micropropagation of *Lonicera* and *Malus* by exogenous factors. Turun yliopiston julkaisuja - Annales Universitatis Turkuensis, A II 88. 118 p. (Academic dissertation). ISBN 951-29-0808-5

**Karhu, S. T.** 1997a. Axillary shoot proliferation of blue honeysuckle. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (in press)

**Karhu, S. T.** 1997b. Rooting of blue honeysuckle. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (in press)

**Karhu, S. T. & Ulvinen, S. K.** 1995. The effect of different carbohydrates on the rooting of micropropagated apple shoots and their adaptation after transplantation. Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux 30: 87–101.

**Kinet, J. M.** 1995. Recent developments in understanding flowering control. Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent 60: 1589–1596.

- Kozai, T., Kitaya, Y., Fujiwara, K. & Adelberg, J.** 1995. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. In: Terzi, M., Cella, R. & Falavigna, A. (eds). Current issues in plant molecular and cellular biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 659–667. ISBN 0-7923-3322-5
- Lee, H. J. & Titus, J. S.** 1993. Relationship between nitrate reductase activity and level of soluble carbohydrates under prolonged darkness in MM.106 apple leaves. *Journal of Horticultural Science* 68: 589–596.
- Marschner, H.** 1986. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press. 674 p. ISBN 0-12-473540-1
- Martinelli, A.** 1991. Problems and perspectives for the automated propagation of fruit trees. In: Vasil, I. K. (ed.). Scale-up and automation in plant propagation. San Diego: Academic Press. p. 133–145. ISBN 0-12-715008-0
- Medford, J. I., Horgan, R., El-Sawi, Z. & Klee, H. J.** 1989. Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell* 1: 403–413.
- Moncousin, Ch.** 1991. Rooting of microcuttings: general aspects. *Acta Horticulturae* 289: 301–310.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nordström, A.-C. & Eliasson, L.** 1986. Uptake and translocation of [<sup>14</sup>C]-labelled benzylaminopurine in apple shoots grown *in vitro* in relation to shoot development. *Physiologia Plantarum* 68: 431–435.
- Palme, K.** 1993. From binding proteins to hormone receptors? *Journal of Plant Growth Regulation* 12: 171–178.
- Piagnani, C. & Eccher, T.** 1988. Factors affecting the proliferation and rooting of chestnut *in vitro*. *Acta Horticulturae* 227: 384–386.
- Quoirin, M., Lepoivre, P. & Boxus, P.** 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. In: Rech, C. R. (ed.). 1976-1977. Rapport de synthèse de la Station de Cultures Fruitières et Maraîchères, Gembloux, Belgique. p. 93–97.
- Yang, G. & Read, P. E.** 1993. *In vitro* culture of Vanhoutte's spirea explants from 'secondary cultures' and dormant stems forced in solutions containing plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 25–30.

# Japanilaisten puuvartisten kasvien mikrolisäys: selviytyminen Suomen talvessa

---

Anna Kärkönen & Liisa Kaarina Simola  
*Biotieteiden laitos, Kasvifysiologian osasto, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto*  
*e-mail: anna.karkonen@helsinki.fi*

Helsingin yliopiston Kasvitieteellisen puutarhan matkalla Pohjois-Japaniin kerättiin puuvartisia kasveja tarkoituksena löytää Etelä-Suomeen sopivia lajeja. Yhdentoista japanilaisen puuvartisen lajin (*Callicarpa dichotoma*, *Chosenia arbutifolia*, *Lonicera chamissoi*, *Maackia amurensis*, *Morus alba*, *Populus maximowiczii*, *Prunus nipponica*, *Ribes japonicum*, *Toisus urbaniana*, *Salix sachalinensis*, *Ulmus laciniata*) mikrolisäys onnistui hankasilmuista aloitetuista versoviljelmistä. Yhdeksästä lajista taimet istutettiin ulos talvenkestävyyden havainnoimiseksi. Kolme lajia selviytyi ankarasta talvesta vaurioitta, neljä kärsi jonkin verran vaurioista, jotka kohdistuivat lähinnä versonkärkiin, ja kaksi lajia kärsi vakavia vaurioita. Päivänpituus Etelä-Suomessa (60 N) vaikuttaa japanilaisten puuvartisten lajien talveentumiseen (Hokkaido 42-43 N), mutta joitakin kestävimpiä lajeja voidaan mahdollisesti käyttää koristekasveina puutarhoissa.

*Avainsanat:* hankasilmut, karaistuminen, solukkoviljely, talvenkestävyys



# Abstract

## Micropropagation of Japanese woody plants: overwintering under Finnish conditions

Anna Kärkönen & Liisa Kaarina Simola

*Department of Biosciences, Division of Plant Physiology,*

*P. O. BOX 56, FIN-00014 University of Helsinki*

*e-mail: anna.karkonen@helsinki.fi*

Eleven Japanese broad-leaved species (*Callicarpa dichotoma*, *Chosenia arbutifolia*, *Lonicera chamissoi*, *Maackia amurensis*, *Morus alba*, *Populus maximowiczii*, *Prunus nipponica*, *Ribes japonicum*, *Toisusu urbaniana*, *Salix sachalinensis*, *Ulmus laciniata*) were successfully micropropagated using axillary bud culture in the project of the Botanical Garden, University of Helsinki in order to introduce new amenity species to south Finland. The plantlets produced were transplanted out of doors in the Botanical Garden and studied for winter hardiness. Three out of nine species survived the hard winter without any damage, four sustained some damage, mainly shoot tip injuries, and two species suffered serious winter damage. It is apparent that the photoperiod in south Finland (60 N) affects the development of dormancy of Japanese woody plants (Hokkaido 42-43 N), but some of the most hardy ones may be used for horticultural purposes.

*Keywords:* acclimation, axillary buds, winter hardiness, tissue culture

## Johdanto

Päivänpituuden muutos on useilla lajeilla pääasiallinen, fytokromin välittämä signaali, joka saa kasvun päättymään ja kasvin valmistautumaan talveen syksyllä (Wareing 1956, Vaartaja 1959, Junttila & Kaurin 1985, Baumann 1995). Monien puuvartisten lajien eri ekotyypit vaativat eripituisen valojakson kasvun päättymiseksi ja päätesilmujen muodostumiseksi. Sekä luontaisen kasvupaikan leveysaste että korkeus merenpinnasta vaikuttavat tähän kriittiseen päivänpituuteen (critical photoperiod). Mitä pohjoisempaa kasvi kasvaa sitä pidempi on se päivänpituus, joka indusoi kasvun päättymisen (Sylvén 1940, Vaartaja 1959, Junttila & Kaurin 1985). Myös lämpötila vaikuttaa sekä ruoho- että puuvartisten kasvien talveentumiseen (Wareing 1956). Kun kasvi siirretään luontaiselta kasvupaikaltaan huomattavasti pohjoisemmaksi, kasvu-aika pitenee, ja päinvastoin siirrettäessä, pohjoinen laji etelämmäksi, kasvuun käytetty aika lyhenee. Eteläistä alkuperää oleva laji siis kasvaa kauemmin kasvukaudessa pohjoiseen siirrettynä, mutta kärsii usein syyspakkasista, koska talveentuminen ei indusoidu ajoissa (Wareing 1956). Kosken ja Sieväsen mukaan (1985) lämpösumma ja päivänpituus yhdessä aikaansaavat puuvartisten kasvien kasvun päättymisen syksyllä.

Helsingin yliopiston kasvitieteellinen puutarha järjesti matkan Etelä-Suomen kasvi- ja maantieteellisille vastinalueille Pohjois-Japaniin, Hokkaidolle, syyskuussa 1993. Matkalla kerättiin siemeniä Kumpulaan rakennettavaa uutta puutarhaa varten. Puuvartisista lajeista, joista siemeniä ei ollut saatavilla, kerättiin oksia, jotka lähetettiin Suomeen koeputkissa. Silmulisäysviljelmät aloitettiin hankasilmuista. Tiedot siemenkeräysmatkasta ja kerätystä aineistosta löytyvät julkaisuista Koponen & Koponen (1994, 1995).

## Aineisto ja menetelmät

Oksat säilytettiin kylmähuoneessa (+4 °C) silmulisäysviljelmien aloitukseen asti. Oksat jaettiin nivelpaloiksi, jotka pintasteriloitiin kastamalla 70 % etanoliin (1 min), jonka jälkeen ne siirrettiin 2 % natriumhypokloriittiin 10-18 minuutiksi silmujen kunnosta riippuen. Silmut huuhdeltiin 5 kertaa steriilillä tislattulla vedellä, silmusuomut poistettiin ja kasvupiste ja muutama sitä ympäröivä lehdenaihe siirrettiin aseptisesti ravintoalustalle. Aloitusalustoina käytettiin modifioituja MS- (Murashige & Skoog 1962), WPM- (Lloyd & McCown 1980), DKW- (Driver & Kuniyuki 1984) tai A3-ravintoalustoja (Anderson 1984), joihin oli lisätty sytokiniiniä (N<sup>6</sup>-bentsyyliadeniini, BA) joko pelkästään tai yhdessä auksiinin (indoli-3-voihappo, IBA tai indoli-3-etikkahappo, IAA) kanssa. Alustoissa oli 30 g/l sakkaroosia, 5 mg/l askorbiinihappoa ja 7 g/l agaria (Difcon Bacto). Ravintoalustojen pH säädettiin 5,7:ksi tai 4,8:ksi (A3-alusta) ennen autoklavointia. Viljelmiä kasvatettiin valorytmisissä 16 h valo (25 °C)/8 h pimeä (20 °C), valaistusvoimakkuus oli 70-80 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Puhjenneet silmut siirrettiin muutaman viikon päästä tuoreille alustoille. Pidenneet versot leikattiin nivelpaloiksi ja siirrettiin 50 ml erlenmeyerpulloihin, joissa oli 20 ml ravintoalustaa. Viljelmät siirrettiin 4-5 viikon välein tuoreille alustoille. Alustoissa oli kasvuaineena BA:ta 0,44-5,0 μmol/l pelkästään tai yhdessä IBA:n (0,5 μmol/l) tai IAA:n (2,9 μmol/l) kanssa. Versot juurrutettiin WPM- tai MS-alustoilla, joiden makroravinne- ja sokeripitoisuus olivat puolet alkuperäisestä, ja joissa oli 1 tai 2,5 μmol/l IBA:a tai ei kasvuaineita (*Morus alba*). Taimet istutettiin turve-hiekkaseokseen tai pelkkään hiekkaan (*Toisusu urbaniana*) ja kasvatettiin ensin muovikuvun alla ja sitten ne siirrettiin kasvihuoneolosuhteisiin. Solukkoviljelytaimia istutettiin ulos kasvitieteelliseen puutarhaan kesällä 1994 ja 1995. Niiden selvitymistä tarkkailtiin seuraavana kesänä.

**Taulukko 1.** Mikrolisätyt japanilaiset lajit ja niiden talvehtiminen.

Laji	Talvehtiminen
<i>Lonicera chamissoi</i> Bunge	ei talvivaurioita
<i>Maackia amurensis</i> Rupr. & Maxim	ei talvivaurioita
<i>Ribes japonicum</i> Maxim	latvapaaleltumia
<i>Morus alba</i> L.	ei talvivaurioita
<i>Prunus nipponica</i> Matsum.	ei tutkittu
<i>Chosenia arbutifolia</i> (Pallas) B. V. Skvortz. (2 kantaa)	versopaaleltumia, juurivesoja
<i>Populus maximowiczii</i> Henry	latvapaaleltumia
<i>Salix sachalinensis</i> F. Schmidt	versopaaleltumia, juurivesoja
<i>Toisusu urbaniana</i> (Seemen) Kimura	latvapaaleltumia
<i>Ulmus laciniata</i> (Trautv.) Mayr	ei tutkittu
<i>Callicarpa dichotoma</i> (Lour.) K. Koch	latvapaaleltumia

## Tulokset ja niiden tarkastelu

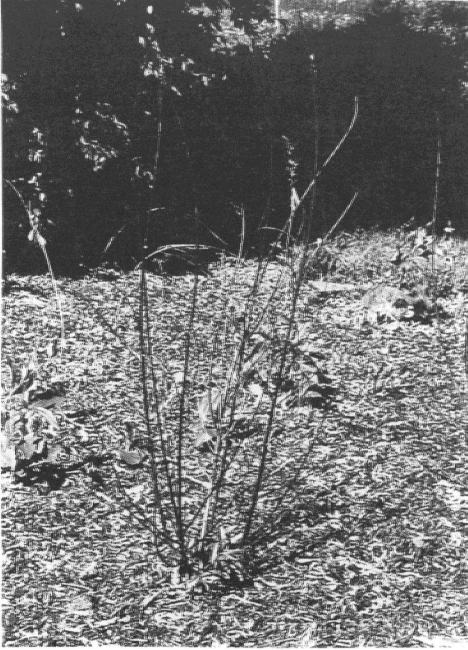
Silmulisäystä yritettiin 52 kannasta (44 eri lajista). Viljelmien aloituksessa oli ongelmia kontaminaatioiden vuoksi. Kaksitoista japanilaista kantaa (11 eri lajista) tuotti monistuvan versoviljelmän (Taulukko 1). MS-alusta osoittautui parhaimmaksi seuraavien lajien lisäämiseen: *Callicarpa dichotoma*, *Morus alba*, *Populus maximowiczii*, *Prunus nipponica*, *Ribes japonicum* ja *Toisusu urbaniana*. WPM-alusta oli paras seuraaville lajeille: *Chosenia arbutifolia*, *Lonicera chamissoi* ja *Salix sachalinensis* ja DKW-ravintoalusta seuraaville: *Maackia amurensis* ja *Ulmus laciniata*. Suurin osa versoista juurtui ongelmitta juurruutusalustoilla; juurtumisprosentti vaihteli 21-100 %:iin. Useimmat taimet myös selvisivät hyvin ruukkuihin istutuksesta ja sopeutuksesta kasvihuoneolosuhteisiin.

Talvi 1995-1996 oli Etelä-Suomessa kylmä. Ulos istutetuista japanilaisista lajeista kolme lajia yhdeksästä (*L. chamissoi*, *M. amurensis*, *M. alba*) selvisi ensimmäisestä talvestaan Suomessa ilman näkyviä talvivaurioita, neljä lajia (*C. dichotoma*, *P. maximowiczii*, *R. japonicum*, *T. urbaniana*) kärsi latvapaaleltumista ja kahden pajujen heimon lajin (*C. arbutifolia*, *S. sachalinensis*) versot paleltuivat miltei täysin, mutta tuottivat seuraavana kesänä juurivesoja. Taimien selviytymistä seurataan myös jatkossa. Päivänpituus eroaa huomattavasti Etelä-Suomen (60 N) ja Pohjois-Japanin (42-43 N) välillä. Japanilaisten lajien talveenvalmistautumisessa on selvä ero: pajujen heimon lajit jatkavat kasvuaan lokamarraskuulle asti eivätkä silloinkaan vielä muodosta päätesilmuja. Tämä näkyy vaurioiden talven jälkeen (Kuva 1). Toiset lajit esim. *R. japonicum* muodostavat päätesilmun, mutta kärsivät silti latvapaaleltumista (Kuva 2).

# Kirjallisuus

---

- Anderson, W. C.** 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 343–347.
- Baumann, C.** 1995. Dormancy development in trees. *Meddelelser fra Skogforsk* 47.8: 1–15.
- Driver, J. A. & Kuniyuki, A. H.** 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507–509.
- Heikinheimo, O.** 1956. Tuloksia ulkomaisten puulajien viljelystä Suomessa. (Ergebnisse von einigen Anbauversuchen mit fremdländischen Holzarten in Finnland). *Metsäntutkimuslaitoksen Julkaisuja* 46.3: 1–129.
- Junttila, O. & Kaurin, A.** 1985. Climatic control of apical growth cessation in latitudinal ecotypes of *Salix pentandra* L. In: Kaurin, A., Junttila, O. & Nilsen, J. (eds). *Plant production in the north: proceedings from "Plant adaptation workshop"*. 1985. Tromsø: Norwegian University Press. p. 83–91. ISBN 82-00-07385-8
- Koponen, T. & Koponen, A.** 1994. Delectus seminum. List of seeds available in 1994. Supplement. Seeds from natural habitats in Hokkaido, Japan. Botanical Garden, University of Helsinki, 15 p. (ISSN 1237-1025)
- Koponen, T. & Koponen, A.** 1995. Botanical Garden goes to Far East - test of a theory. *Universitas Helsingiensis* 2/1995: 4–8.
- Koski, V. & Sievänen, R.** 1985. Timing of growth cessation in relation to the variations in the growing season. In: Tigerstedt, P. M. A., Puttonen, P. & Koski, V. (eds). *Crop physiology of forest trees* 1985. Helsinki: Helsinki University Press. p. 167–193. ISBN 951-45-3705-X
- Lloyd, G. & McCown, B.** 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *The International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings* 30: 421–427.
- Lähde, E., Werren, M., Etholén, K. & Silander, V.** 1984. Ulkomaisten havupuulajien varttuneista viljelmistä Suomessa. (Summary: Older forest trials of exotic conifer species in Finland). *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 125: 1–87.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Sylvén, N.** 1940. Lång- och kortdagstyper av de svenska skogsträden. Longday and shortday types of Swedish forest trees. *Svensk Papperstidning* 43: 317–324; 332–342; 350–354.
- Tigerstedt, P.** 1970. Dendrologiska experiment på Arboretum Mustila. (Summary: Dendrological experiments at Arboretum Mustila). *Lustgården* 71: 141–174.
- Vaartaja, O.** 1959. Evidence of photoperiodic ecotypes in trees. *Ecological Monographs* 29: 91–111.
- Wareing, P. F.** 1956. Photoperiodism in woody plants. *Annual Review of Plant Physiology* 7: 191–214.



**Kuva 1.** *Salix sachalinensis* -lajin versot paleltuivat täysin talvella. Juuristo säilyi hengissä: juurivesojen kasvu on runsasta.



**Kuva 2.** *Ribes japonicum* kärsi latvapaaleltumista talven jälkeen.

## Yhteenveto

Pitkäaikaiset kasvatuskokeet Metsäntutkimuslaitoksella ja Mustilan Arboretumissa osoitta-

vat, että monet japanilaiset metsäpuut selviävät Suomen talvessa (Heikinheimo 1956, Tigerstedt 1970, Lähde *et al.* 1984). Mahdollisesti jotkin nyt lisätystä lajeista selviävät meillä ja niitä voidaan käyttää esim. koristepuina tai pensaina puutarhoissa.

# Solukkoviljelymenetelmien hyödyntäminen liljojen kasvatuksessa ja jalostuksessa

---

Veli-Pekka Pelkonen

*Biologian laitos/Kasvitiede, Oulun yliopisto, PL 333, 90571 Oulu*

*e-mail: vpp@raita.oulu.fi*

Liljoja (*Lilium* sp.) on tuhansia vuosia käytetty koristekasveina, mutta liljojen jalostus alkoi vasta viime vuosisadan lopulla. *In vitro* -menetelmät lisäävät mahdollisuuksia jalostaa uusia lajikkeita. Siementen itämistä voidaan edistää *in vitro*, ja alkionpelastusta käyttämällä voidaan tuottaa uusia hybridejä kasveja. Lajien välistä hybridisaatiota voidaan myös edistää leikatun luotin menetelmällä ja sikiäimen kasvatuksella. Liljojen lisäyksessä on sovellettu useita solukkoviljelyn menetelmiä. Aloituskasvatuksena käytetään tavallisimmin sipulisuomuja. Kalluksen kasvatusta on melko helppoa ja regeneraatio tapahtuu organogeneesin tai embryogeneesin kautta. Protoplastiviljelyä, jotka yleensä aloitetaan siitepölystä, mutta myös kalluksesta, voidaan käyttää geeninsiirrossa. Geeninsiirrossa on kokeiltu useita eri menetelmiä. Oulussa on tutkittu useita solukkoviljelymenetelmiä sekä perinteisillä että harvinaisemmilla liljalajeilla. Ulkomaiset lajit eivät ole sopeutuneita Suomessa ja ne häviävät kukkapenkistä. Keskittymme sen vuoksi geneettisen tutkimuksen ja liljakantojen rekisteröimisen lisäksi kylmänkestävyyden fysiologian tutkimukseen.

*Avainsanat:* alkionpelastus, embryogeneesi, geenitekniikka, kylmänkestävyys, *Lilium* sp., liljanjalostus, liljat, organogeneesi

# Abstract

## Tissue culture in the breeding and cultivation of lilies

Veli-Pekka Pelkonen

Department of Biology/Botany, University of Oulu, P. O. BOX 333, FIN-90571 Oulu

e-mail: [vpp@raita.oulu.fi](mailto:vpp@raita.oulu.fi)

Lilies (*Lilium* sp.) have a history of several thousand years as ornamental plants but breeding this very diverse plant family did not start until the end of the last century. Modern *in vitro* techniques offer new possibilities for varietal breeding. Germination of seed can be enhanced *in vitro*, and the technique can be further modified for use in embryo rescue for production of new hybrid plants. Distant hybridisation can also be enhanced by the cut stigma method and ovary cultivation. Various tissue culture methods have been applied to propagation of lilies. Bulb scales are the most regenerable explants. Callus induction and differentiation is relatively easy and regeneration from callus occurs via organogenesis and embryogenesis. Protoplasts offer a means for genetic transformation and they are commonly isolated from pollen, but also from callus. Several methods for gene transfer have been applied, but so far the techniques have been applied mainly in research. In Oulu various tissue culture methods have been studied on a number of traditional and less well known lily species. Foreign varieties are not adapted to Finnish conditions and they tend to disappear from the flower beds. The research is therefore directed towards understanding cold hardiness physiology of lilies in addition to genetic studies and registration of selected disease resistant material representing species both common and rare in Finland.

*Key words:* cold hardiness, embryo rescue, embryogenesis, gene technology, *Lilium* sp., lily breeding, organogenesis

# Johdanto

Liljoilla on pitkä historia koristekasveina. Ensimmäiset todisteet niiden viljelystä ovat yli 2000 vuoden takaa ennen ajanlaskumme alkua. Liljojen jalostus alkoi kuitenkin vasta viime vuosisadan loppupuolella, kun löytöretkien mukana Eurooppaan tuotiin uusia lajeja Aasiasta ja Amerikasta. Liljojen suvussa on 80-90 lajia - valtaosa niistä on kotoisin Itä-Aasiasta ja Pohjois-Amerikasta. Muonimuotoisuudesta huolimatta suvun kaikki lajit soveltuvat koristearvonsa vuoksi viljelyyn. Jatkuvasti kasvava lajikkeiden joukko varmistaa myös liljojen monipuolisen käytön sekä puutarha- että leikkokukkina. Uudet risteytys- ja viljelymenetelmät ovat lisäksi tuoneet aivan uudenlaisia mahdollisuuksia lajikkeiden tuotantoon.

Koska liljojen jalostus ja kaupallinen tuotanto ovat keskittyneet Alankomaihin, Yhdysvaltoihin ja Japaniin, ei Suomen erityisolosuhteita ole jalostuksessa otettu huomioon. Suomen kesän pituus ei useinkaan riitä monien ulkomaisten lajikkeiden kukintaan, eikä varsinkaan versojen tuleentumiseen. Tämä johtaa tavallisesti liljojen taantumiseen ja lopulta niiden häviämiseen kukkapenkistä. Perinteisten lajien lisäksi meillä voitaisiin kokeilla liljojen monimuotoisesta suvusta uusia lajeja, joista parhaat kannat valittaisiin jatkokasvatukseen. Näitä lajeja voitaisiin käyttää sitten myös meillä menestyvien lajikkeiden jalostuksessa.

## Solukkoviljelymenetelmien käyttö liljoilla

### *In vitro* -idätys ja siihen liittyvät erikoismenetelmät

*In vitro* -olosuhteissa itäminen on yleensä huomattavasti nopeampaa kuin *in vivo*. Lisäksi saadaan patogeeneistä puhdasta kasvimateriaalia, ja jalostusta varten uutta geneettistä materiaalia. Siemenen sterilointi on helppoa eikä kontaminaatio-ongelmia tavallisesti ole.

Eri liljalajien itävyys vaihtelee suuresti. Lajit jaetaan kahteen pääluokkaan itävyytensä perusteella: maanalaiseen eli hypogeeiseen ja maanpäälliseen eli epigeeiseen. Yleensä hypogeeinen itäminen on hidasta ja epigeeinen nopeaa. Erikoissovellutuksena *in vitro* -idätyksessä on alkionpelastusmenetelmä, jossa epäkypsästä tai kypsästä siemenestä preparoidaan alkio erilleen. Preparoitu alkio laitetaan kasvatusalustalle, jossa se yleensä alkaa kasvaa. Tämä menetelmä mahdollistaa mm. epätäydellisesti kehittyneissä siemenissä olevien alkoiden kasvattamisen. Tällaiset alkiot eivät muuten pystyisi kehittymään. Epätäydellisiä siemeniähän kehittyi usein lajiristeymien tuloksena. Alkiopelastusmenetelmän avulla on pystytty tuottamaan aivan uudenlaisia lajiristeymiä, joiden tuottaminen perinteisin menetelmin ei olisi mahdollista (Okazaki *et al.* 1992).

Muita risteytysmenetelmiä ovat mm. leikatun luotin menetelmä ja sikiäimen kasvat. Leikatun luotin menetelmässä saadaan hyvinkin erilaisten lajien siitepölyllä aikaan hedelmöitys. Kun luotti katkaistaan, yltää vieraan lajin siiteputki hedelmöittämään munasolun. Tähän voidaan vielä yhdistää sikiäimen kasvatuserä, jolloin pölytetystä emistä saadaan hybridisolut erilaistumaan aikuisiksi kasveiksi. Pölytetty sikiäin halkaistaan pitkittäin ja laitetaan kasvatusalustalle, jolloin kehittyvät paitsi emokasvin somaattiset solut myös hedelmöittyneet munasolut ja keskustumat tuottaen heterogeenistä kasvimateriaalia (Niimi *et al.* 1996). Myös pölyttämätön sikiäin voidaan preparoida tällä tavoin ja somaattisista soluista erilaistuneiden diploidien kasvien lisäksi saadaan myös sikiäimen generatiivisista tumista erilaistuneita haploideja kasveja (Gu & Cheng 1983).

### Kasvimateriaalin lisäys *in vitro*

Liljojen lisäyksessä on käytetty kaikkia solukkoviljelysovellutuksia. Kaupallisessa viljelyssä merkityksellisin on versojen lisäys kasvinosista suoraan organogeneesin kautta (Takayama & Misawa 1979, 1980, 1983, Niimi & Saito 1990, Priyadarshi & Sen 1992). Tavallisimmin aloitusmateriaalina käytetään sipulisuomuja, sillä



niiden regeneroitumiskyky on suurin myös perinteisessä viljelyssä (van Aartrijk & Blom-Barnhoorn 1983). Myös muita verson osia, esim. lehtiä, voidaan käyttää (Niimi 1986, Caputo *et al.* 1990). Alustoina käytetään perusalustoja (MS, Murashige & Skoog 1962) ja niiden erilaisia muunnelmia. Tavallisimmin alusta on kiinteä, mutta myös suspensioviljelyä on muutamalle lajille kehitetty.

Kallusmenetelmiä on tutkittu useilla lajeilla. Kalluksen indusointi samoin kuin kasvatukin on yleensä varsin ongelmatonta (Priyadarshi & Sen 1992). Kallusta muodostuu useimmilla lajeilla sipulisuomujen lisäksi melkein mistä tahansa verson osasta. Lehdet ovat myös osoittautuneet hyväksi kalluksen lähteeksi. Kalluksen erilaistuminen on runsasta - riippuen tietenkin aloitusmateriaalista. Erilaistumisessa voidaan havaita yhtäaikaaisesti sekä organogeneesiä että somaattista embryogeneesiä, joista somaattinen embryogeneesi on huomattavasti vähäisempää.

Solususpensioita ei ole juurikaan liljoilla tutkittu. Suspensioviljelmien aloittaminen on helppoa, kun on saatavilla riittävän murenevaa kallusta. Alustana käytetään samoja perusalustoja kuin kiinteässä viljelyssäkin, mutta auki-siirikonsentraation ja sokeripitoisuuden on oltava korkeammat. Solukko lisääntyy kohtalaisen nopeasti, ja erilaistumistakin on jossain vaiheessa havaittavissa. Somaattista embryogeneesiä ei kiistattomasti ole saatu kuitenkaan suspensioissa indusoidua (Mii *et al.* 1994). Kallus on osoittautunut geneettisesti hyvin stabiiliksi, eikä merkittäviä kromosomitason muutoksia vuosienkaan viljelyn jälkeen ole tavattu. Kromosomien sisäisiä muutoksia eli geenimutaatioita kallusviljelyn aikana ei ole tutkittu. Liljoilla hyvin runsaana esiintyvät transposonit tuottanevat siinä määrin somaklonaalista muuntelua, että kalluslisäyksellä on tutkimuksen lisäksi merkitystä vain lajien massalisäyksessä, jossa kohtalainen muuntelu saattaa olla jopa eduksi.

Erilaistuneiden versojen siirto *in vivo* -olosuhteisiin vaatii usein kylmäkäsitellyn dor-

manssin murtamiseksi (de Klerk 1992, Delvallée *et al.* 1990, Aguetaz *et al.* 1990, de Klerk *et al.* 1992). Myös tässä suhteessa eri lajien välillä on suuria eroja. Hyvä kasvu- ja lepo-kausirytmiiikka saavutetaan, kun jaetaan vuosi kolmeen 6 viikon lepokauteen ja näiden välisiin 11-12 viikon kasvukausiin.

## Protoplastien eristys ja transformointi

Liljoilla protoplasteja on eristetty paljon siitepölystä lähinnä pölytysbiologista tutkimusta varten (Tanaka *et al.* 1987, Tanaka & Wakayabashi 1992, Ueda *et al.* 1990). Siitepölyn protoplasteja on myös transformoitu. Somaattisesta solukosta on tavallisimmin käytetty kallusta, josta eristetyt protoplastit on myös saatu erilaistumaan kokonaisiksi kasveiksi (Sugiura 1993). Erilaistuminen on erityisen tehokasta silloin, kun viljely on aloitettu kärkimeristemisolukosta (Godo *et al.* 1996). Lehtimateriaalista saadaan myös erinomaisia protoplasteja, mutta ne eivät erilaistu yhtä helposti. Transformaatiota on saatu aikaan elektroporaation ja PEG-ohjatun geeninsiirron avulla. Onpa myös kokeiltu kohtalaisen menestyksekkäästi *Agrobacterium*-menetelmää (Langeveld *et al.* 1995). Myös partikkelipommitusta on käytetty (Nishihara *et al.* 1993). Siirrettävinä geeneinä on käytetty tavallisia reporterigenejä (GUS). Transformaatiomenetelmien tehokkuuden testaamisen lisäksi on tutkittu markkereihin fuusioitujen erilaisten solukospesifisten promoottereiden aktiivisuutta eri solukoissa (Tabata *et al.* 1993). Geeninsiirroilla on merkitystä nimenomaan geneettisessä tutkimuksessa, ei niinkään jalostuksessa, koska liljojen genomia ei tunneta.

Protoplasteja on myös saatu erilaistumaan. Parasta materiaalia näyttäisivät olevan meristeemistä indusoidusta kalluksesta saadut solut, sillä niiden erilaistumiskyky on suurin. Myös siitepölystä saadut protoplastit on saatu jakautumaan.

# Oman tutkimuksen tavoitteet ja menetelmät

Aloitin työskentelyn liljojen parissa syksyllä 1993. Tähän saakka olen keskittynyt lähinnä solukkoviljelymenetelmien kehittämiseen. Eniten olen tutkinut meillä perinteisesti kasvatettuja lajeja (*Lilium regale*, *L. bulbiferum*, *L. martagon* ja *L. lancifolium*), mutta olen myös kokeillut meillä tuntemattomia lajeja (mm. *L. canadense*, *L. monadelphum*, *L. amabile*, *L. concolor* ja *L. pardalium*). Tällä hetkellä kasvatuksessa on n. 40 lajia. Etenkin Pohjois-Amerikan mantereella on paljon potentiaalisia lajeja, joita ei ole Suomen olosuhteissa aikaisemmin kokeiltu. Jatkossa aloitan kylmästressin indusoiman geeniekspression tutkimisen proteiinitasolla

eri lajeilla ja kannoilla. Jatkan myös lisäystutkimusta ja jatkossa tutkin mm. alhaisessa lämpötilassa tapahtuvaa kasvatusta ja solukoiden kryopreservaatiota.

Työn tavoitteena on: 1) tautipuhtaiden ja kestävien liljakantojen kehittäminen perinteisistä ja uusista lajeista, 2) valikoitujen liljakantojen rekisteröiminen ja geenipankin perustaminen, 3) eri liljalajien ja -kantojen kylmänkestävyyden fysiologisen taustan tutkiminen ja 4) liljalajien ja -kantojen genomien kartoitus.

Työ liittyy jatkossa Maatalouden tutkimuskeskuksen kanssa yhteistyöhankkeena tehtävään perennojen kehittämishankkeeseen ”Kestävät perennat 2001”, jonka on määrä alkaa vuoden 1997 alussa. Liljojen lisäksi hankkeessa on mukana kymmenkunta muuta perennasukua.

## Kirjallisuus

Aartrijk, J. van & Blom-Barnhoorn, G. J. 1983. Adventitious bud formation from bulb-scale explants of *Lilium speciosum* Thunb. *in vitro*. Effects of wounding, TIBA, and temperature. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 110: 355–363.

Aguettaz, P., Paffen, A., Delvallée, I., Linde, P. van der & Klerk, G.-J. de 1990. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. I. The effects of culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22: 167–172.

Caputo, G., Apollonio, G., Scaramuzzi, F. & D'Emérico, S. 1990. Recherches sur la multiplication végétative de *Lilium* "Casa Blanca" par culture *in vitro* de divers types d'explants. *Comptes Rendus Société de Biologie* 184: 123–134.

Delvallée, I., Paffen, A. & Klerk, G.-J. de 1990. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. II. The effect of temperature. *Physiologia Plantarum* 80: 431–436.

Godó, T., Matsui, K., Kida, T. & Mii, M. 1996. Effect of sugar type on the efficiency of plant regeneration from protoplasts isolated from shoot tip derived meristematic nodular cell plumps of *Lilium x formolongi* hort. *Plant Cell Reports* 15: 401–404.

Gu, Z.-P. & Cheng, K.-C. 1983. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryological observation. *Acta Botanica Sinica* 25: 24–28.

Klerk, G.-J. de 1992. Hormonal control of dormancy and apical dominance in tissue-cultured plants. *Acta Botanica Neerlandica* 41: 443–451.

Klerk, G.-J. de, Delvallée, I. & Paffen, A. 1992. Dormancy release of micropropagated bulblets of *Lilium speciosum* after long culture in soil. *HortScience* 27: 147–148.

Langeveld, S. A., Gerrits, M. M., Derks, A. F. L. M., Boonekamp, P. M. & Bol, J. F. 1995. Transformation of lily by *Agrobacterium*. *Euphytica* 85: 97–100.

Mii, M., Yuzawa, Y., Suetomi, H., Motegi, T. & Godó, T. 1994. Fertile plant regeneration from protoplasts of a seed-propagated cultivar of *Lilium x formolongi* by utilizing meristematic nodular cell clumps. *Plant Science* 100: 221–226.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

Niimi, Y. 1986. Application of leaf-segment cultures to *in vitro* bulblet production of six *Lilium* species. *Acta Botanica Neerlandica* 35: 189–194.

Niimi, Y., Nakano, M., & Maki, K. I. 1996. Production of interspecific hybrids between *Lilium regale* and *L. rubellum* via ovule culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences* 64: 919–925.

Niimi, Y. & Saito, I. 1990. Production of bulbs of *Lilium rubellum* Baker. An attempt to improve *in vitro* growth of bulblets regenerated from cultured bulb scales. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Sciences* 59: 635–640.

Nishihara, M., Ito, M., Tanaka, I., Kyo, M., Ono, K., Irifune, K. & Morikawa, H. 1993. Expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and peony (*Paeonia lactifolia*) by particle bombardment. *Plant Physiology* 102: 357–361.

Okazaki, K., Umada, Y., Urshima, O., Kawada, J., Kunishige, M. & Murakami, K. 1992. Interspecific hybrids of *Lilium longiflorum* and *L. x formolongi* with *L. rubellum* and *L. japonicum* through embryo culture. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 60: 997–1002.

Priyadarshi, S. & Sen, S. 1992. A revised scheme for mass propagation of easter lily. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 193–197.

Sugiura, H. 1993. Plant regeneration from protoplast of *Lilium speciosum* and *L. x elegans*. *Japanese Journal of Breeding* 43: 429–437.

Tabata, S. Sato, S., Watanabe, Y., Yamamoto, M. & Hotta, Y. 1993. Evidence on meiosis-specific regulation of gene expression in lily microsporocytes. *Plant Science* 89: 31–41.

Takayama, S. & Misawa, M. 1979. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiologia Plantarum* 46: 184–190.

Takayama, S. & Misawa, M. 1980. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 48: 121–125.

Takayama, S. & Misawa, M. 1983. The mass propagation of *Lilium in vitro* by stimulation of multiple adventitious bulb scale formation and by shake culture. *Canadian Journal of Botany* 61: 224–228.

Tanaka, I., Kitazume, C. & Ito, M. 1987. The isolation and culture of lily pollen protoplasts. *Plant Science* 50: 205–211.

Tanaka, I. & Wakayabashi, T. 1992. Organization of the actin and microtubule cytoskeleton preceding pollen germination. An analysis using cultured pollen protoplasts of *Lilium longiflorum*. *Planta* 186: 473–482.

Ueda, K., Miyamoto, Y. & Tanaka, I. 1990. Fusion studies of pollen protoplasts and generative cell protoplasts in *Lilium longiflorum*. *Plant Science* 72: 259–266.

# Hybridejä, osittaishybridejä ja monoploidisia jälkeläiskasveja vehnän-sukuisten lajien risteytyksistä alkioviljelyä käyttämällä

---

Hannu Ahokas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Biotieteiden laitos, Perinnöllisyystieteen osasto, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto

<sup>2</sup> MTT, Kasvintuotannon tutkimuslaitos, Kasvinjalostuksen tutkimusala, 31600 Jokioinen  
e-mail: hannu.ahokas@mtt.fi

Tuloksellisiin lajiristeytyksiin käytettiin ohraa (*Hordeum vulgare*), ruista (*Secale cereale*), erilaisia vehnälajeja (*Triticum* sp.) sekä lapinvehnää (*Elymus mutabilis*), tunturivehnnää (*E. alaskanus*), rantavehnnää (*Leymus arenarius*) ja ulkomaisia sukulaislajeja *Dasyphyrum villosum*, *Elymus canadensis*, *Hordeum bulbosum*, *Leymus mollis* ja *L. racemosus*. Heikosti kehittyneiden risteytyssementen keskosalkioita viljeltiin ravintoalustalla, ja niistä saatiin risteytymiä, osittaisristeytymiä ja eräistä kombinaatioista monoploidisia kasveja. Kahdesta risteytyksestä näyttää jälkeläisten siemenproteiinien muuntelusta pääteltynä syntyneen lajien keskeisiä rekombinantteja. Ohran ja rantavehnnän vastavuoroisista risteytys suunnista syntyi merkitsevästi eroava tulos: kun rantavehnnä oli äitinä, syntyi monoploidisia rantavehnniä, kun taas ohra äitinä tuotti lähinnä vain hybridejä. Monoploidisen, 28-kromosomisen rantavehnnän meiosisin I jakautumisen ilmiöt vahvistavat käsitystä, että tässä lajissa on genomien yleistä homeologiaa.

*Avainsanat:* gibberelliinit, gliadiinit, hybridikloroosi, keskosalkiot, lajenvälinen rekombinaatio, leymiinit, maternaalinen vaikutus, ohra, ruis, vehnä

# Abstract

## Hybrids, partial hybrids and monolpoids from interspecific crosses of the Triticeae species attained by *in vitro* embryo culture

Hannu Ahokas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Division of Genetics, P. O. BOX 56, FIN-00014 University of Helsinki

<sup>2</sup> Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Crop and Soil Science,

Plant Breeding Section, FIN-31600 Jokioinen

e-mail: hannu.abokas@mtt.fi

Crosses involving barley (*Hordeum vulgare*), common wheat (*Triticum aestivum*), rye (*Secale cereale*), *Dasyphyrum villosum*, *Elymus alaskanus*, *E. canadensis*, *E. mutabilis*, *Hordeum bulbosum*, *Leymus arenarius*, *L. mollis*, *L. racemosus*, *Triticum monococcum*, *T. ovatum*, *T. turgidum* convar. *durum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccon* and *T. zhukovskiyi* were carried out using hybrid embryo culture on nutrient media. Some crosses resulted in hybrids, few in partial hybrids and some in monolpoids. Two combinations resulted provisionally in interspecific recombination. Reciprocal crosses with barley and *Leymus arenarius* have significantly different outcomes: when *L. arenarius* is the seed parent, monolpoids are obtained, while the reciprocal crosses mostly yield hybrids. Meiosis of the monolpoid *L. arenarius* indicates that the 28 chromosomes of the monolpoid include homoeologous genomes.

*Key words:* barley, gibberellins, gliadins, hybrid chlorosis, interspecific recombination, leymins, maternal effect, rye, wheat

# Keinosiemenet puutarhakasvien lisäyksessä

---

Seppo Sorvari

MTT, Puutarhatuotannon tutkimuslaitos, Toivolinnantie 518, 21500 Piikkiö  
e-mail: [seppo.sorvari@mtt.fi](mailto:seppo.sorvari@mtt.fi)

Puutarhakasveja voidaan tuottaa suvuttomasti keinotekoisesti valmistetuista siemenistä. Perinteisin suvuttomin lisäysmenetelmin kasveja tuotetaan esim. pistokkaiden, rönsyjen ja sipulien avulla. Keinosiementenkin käyttö kuuluu kasvullisten lisäysmenetelmien joukkoon. Se poikkeaa perinteisistä menetelmistä siinä, että kasvin solukosta tuotetaan bioteknisin menetelmin uusia alkioita. Näitä alkioita kutsutaan somaattisiksi alkioksi erotuksena hedelmöityksen kautta syntyneisiin siementen alkioihin. Keinotekoisissa siemenissä lähtömateriaalina voivat olla erilaiset kasvin vegetatiiviset osat. Menetelmän perusajatuksena on, että kasvin erilaistuneet solut saadaan palautettua takaisin ”nuoriksi” aktiivisesti jakautuviksi soluiksi, ja kehittymään ikään kuin hedelmöitetty munasolu. Oleellisin ero keinotekoisien ja pölytyksellä syntyneen alkion välillä on se, että somaattiselta alkiolta puuttuu endospermi ja testa. Lisäksi alkiot eivät siirry lepotilaan missään kehitysvaiheessa ellei sitä erikseen indusoida. Puutarhasektorilla kasvien vegetatiivisen lisäyksen tarve on suuri. Esim. herukat, mansikka, hedelmäpuut ja monet koristekasvit lisätään vegetatiivisesti joko pistokkaista, rönsyistä tai mikrolisäämällä. Nämä menetelmät vaativat melko suuria aineellisia valmiuksia, mikä heijastuu myös taimien hinnoissa. Keinosiementekniikkaa sovellettaessa ei kylvösiemenen tuotanto ole enää kiinni ajasta eikä leveysasteista. Tekniikassa on kolme aluetta, joiden tutkimusta tulisi tehostaa. Nämä ovat menetelmän kehittäminen uusille kasvilajeille, alkoiden viljelytekniikan automaatio ja alkoiden varastointi- ja kylvökelpoisuuden edistäminen.

*Avainsanat:* bioreaktori, *Daucus carota*, keinotekoinen endospermi, nesteviljely, porkkana, solukkoviljely, somaattinen alkiio, somaattinen embryogeneesi, suspensioviljely

# Abstract

## Artificial seed in propagation of horticultural crops

Seppo Sorvari

*Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Horticulture,*

*Toivonlinnantie 518, FIN-21500 Piikkiö*

*e-mail: seppo.sorvari@mtt.fi*

The "artificial seed technique" in propagation of horticultural crops represents a means to multiply crops vegetatively using manufactured seeds. In traditional vegetative propagation methods new plants are produced from e.g. cuttings, runners and bulbs. Artificial seed, despite in fact representing a vegetative propagation method, differs from the other traditional ones in that new embryos are produced from plant tissue using biotechnology. The new embryos are termed somatic embryos to distinguish them from embryos of real seed which have resulted from a sexual process, fertilization. Different vegetative parts of the plant can be used as explants to produce artificial seed. The basic idea is that differentiated cells can revert to young actively dividing cells which finally develop like a fertilized egg cell. The most important differences between somatic and sexual embryos are that somatic embryos have no endosperm and seed coat. Also somatic embryos do not go through dormancy at any developmental stage unless this is specifically induced. In horticulture the need to propagate plants vegetatively is large. For instance currants, strawberry, fruit trees and many ornamentals are vegetatively propagated either from cuttings, runners or via micropropagation. These methods are rather demanding of resources thus resulting in a high price for plantlets. When applying artificial seed to plant propagation, seed propagation is no longer dependent on the time of the year, or latitude. There are three areas of research in artificial seed technology which need emphasis: 1) expanding the methodology to new plant species, 2) automation of embryo culture and 3) enhancement of the storage and sowing technology for the embryos.

*Key words:* artificial endosperm, bioreactor, carrot, *Daucus carota*, liquid culture, somatic embryogenesis, suspension culture, tissue culture

# Johdanto

Toshio Murashige mainitsi vuonna 1977 puutarhakasvien solukkoviljelyä koskevassa seminaarissa Gentissä Belgiassa mm., että kloonaukseen perustuva menetelmä on soveltamiskelpoinen ainoastaan, mikäli se on erittäin nopea, sillä kyetään tuottamaan useita miljoonia kasveja päivässä, ja se on taloudellisesti kilpailukykyinen siementen tuottamisen kanssa (Murashige 1977).

Kuitenkin peltokasveista poiketen monet tärkeät puutarhakasvit ovat itse asiassa heterotsygootteja kloonaja, joiden siemenlisäys ei ole ilman mittavaa homotsygotointi-prosessia edes mahdollista. Näin ollen mikäli haluamme säilyttää alkuperäiset lajikeominaisuudet meidän täytyy edelleenkin kloonata näitä kasveja soveltamalla perinteisiä vegetatiivisia lisäysmenetelmiä, mikrolisäystä tai somaattiseen embryogeneesiin perustuvaa keinosiementekniikkaa. Olisi luonnollisesti ihanteellista, jos vegetatiivinenkin lisäys voisi tapahtua siemenlisäyksen kaltaisesti kuitenkin menettämättä heterotsygotian mukanaan tuomia etuja - eli käyttämällä hyväksi keinosiemeniä.

Aidolla siemenellä on muutamia ominaisuuksia, jotka tekevät siitä niin erinomaisen lisäysyksikön. Kun kasvun kausi koittaa, on siinä alkion käytettävissä tuhti eväspaketti, endospermi. Kova ulkokuori, testa, on kilpenä ulkomaailmaa vastaan suojaamassa siemenen sisäosia. Epäedulliset kasvukaudet ja olosuhteet ohitetaan kuin unessa, lepotilaan, dormanssiin vaipumalla.

Tämänkaltaisen paketin kokoaminen synteettisesti on vaativa tehtävä, sillä somaattiselta alkioilta puuttuvat sekä endospermi että testa. Lisäksi alkiot eivät ole valmistuttuaan juuriin lepotilassa vaan jatkavat kasvuaan mikäli olosuhteet sen muuten sallivat.

Lisäksi millin mittaisen, paljaan somaattisen alkion käsittely on hankalaa, eivätkä alkion sisältämät ravinteet yksinään riitä luonnon ankarissa olosuhteissa kasvun alkuun. Tämän vuoksi alkio pitää suojata keinotekoisella endospermillä, tarvittaessa myös keinotekoisella testalla ja viritetään se lepotilaan, dormanssiin, odottamaan sopivaa kylvöhetkeä.

Redenbaugh *et al.* (1991) ovat luetelleet joukon ominaisuuksia, jotka hyvän keinosiementen tulisi täyttää. Näitä ovat:

1. alkion itäminen, joka näkyy mm. juuren kasvuna
2. voimakkaan ja toimivan juuriston kehittyminen
3. versojen kasvu ja kehittyminen
4. kasvulehtiä on vähintään kaksi
5. verson ja juurien välinen yhteys toimii aidosti
6. hypokotyylin turpoamista ei esiinny
7. kalluksen kasvu hypokotyyllissä tai muissa osissa minimaalista
8. kasvi on ilmiänsultaan eli fenotyybiltään normaali ja vihreä

Somaattisten alkoiden tuotantoa ajatellen luulteloon voisi lisätä vielä Murashigen (1977) esittämän vaatimuksen, että alkioita täytyy voida tuottaa paljon ja halvalla eli tuotanto pitäisi automatisoida mahdollisimman pitkälle. Kuinka paljon alkioita pitäisi tuottaa, jotta siitä tulisi kannattavaa, on suhteellinen ja lajikohtainen kysymys. Porkkanan suspensiossa on laskettu olevan yli miljoona alkioita litrassa eli  $1\text{m}^3$ :n sammiollinen riittäisi koko Suomen siementarpeeseen. Parhaimmillaan menetelmä olisi-kin siellä, missä tarvitaan halvalla suuria siemenmääriä.

Automatisoinnin kannalta koko prosessin tulisi tapahtua nesteviljelyssä. Porkkanalla hyvin luotettavaksi on osoittautunut menetelmä, joka käynnistetään suoraan siementaimien hypokotyylin pätkistä. Automaattisessa tuotantoprosessissa mekaaninen siivilöinti ei kuitenkaan ole riittävän hyvä erottamaan samassa kehitysvaiheessa olevia alkioita ja lisäksi se on automaattisessa järjestelmässä vaikea toteuttaa. Synkronisaatio, eli alkoiden samanaikainen kehittyminen, tulisikin mieluummin voida toteuttaa esim. biokemiallisesti.

Kertalatauksella toimiva bioreaktoriastia on itse asiassa parannettu malli Erlenmeyer-pullost, jossa voidaan kontrolloida lämpötilaa, pH:ta,  $\text{dO}_2$ :ta ja sekoitusnopeutta. Siirryttäessä laajamittaiseen alkoiden tuotantoon täytyy kasvatusolosuhteita voida kontrolloida paremmin kuin Erlenmeyer-pulloa käyttäen. Koska tämäntyyppisessä bioreaktorissa viljely tapahtuu kerta-annoksissa, se hidastaa biore-



aktorin käyttöä huomattavasti. Alkioiden tai keinosiemennän tuotannossa jatkuvatoiminen nk. avoin järjestelmä saattaisi olla käyttökelpoisempi. Siinä voitaisiin pH:n ja dO<sub>2</sub>:n lisäksi kontrolloida myös ravintosuolojen, hormonien ja orgaanisten lisäaineiden kulutusta. Muita parannettavia kohteita ovat mm. sekoitusjärjestelmä, hapetus ja bioreaktorin astian muotoilu siten, että siinä ei ole tarttumapaikkoja kasvin soluille.

## Materiaali ja menetelmät

Esimerkkitapauksessa tutkittiin porkkanaa (*Daucus carota* L.) lajiketta Duke, jolla alkioiden tuotanto käynnistettiin siementaimien hypokotyylin pätkestä.

### A) Siementen steriili idätys

Siemenet laitetaan 500 µm:n verkkoputkeen ja huuhdellaan ioninvaihtovedellä, varsinkin jos käytetään peitattuja siemeniä. Siemenet siirretään steriloituun 500 µm:n verkkoputkeen ja kastetaan (2-3 s) 95 %:seen etanoliin. Etanoli huuhdellaan nopeasti steriilillä tislattulla vedellä (etanoli ja hypokloriitti muodostavat alkyylhypokloriitteja). Verkkoputkessa olevia siemeniä ravistellaan 30 min 5 %:sessa natriumhypokloriitissa (5 % aktiiviklooria), johon on lisätty Triton X-100:aa (pari tippaa/50 ml). Siemenet huuhdellaan 3 kertaa steriilillä tislattulla vedellä (noin 5 min/vesi) verkkoputken avulla. Huuhtelun jälkeen siemenet kaadetaan putkesta steriilille petrimaljalle.

Idätys tehdään lasisissa petrimaljoissa (Ø 100 mm), joissa on Selstoff-vanua 5-7 kerrosta. Selstoff kostutetaan petrimaljoissa tislattulla vedellä ja autoklavoidaan (20 min, 121 °C). Maljalle poimitaan steriloiduilla pinseteillä 20 siementä. Siemeniä idätetään ensin pimeässä 4 vrk ja sen jälkeen valossa (16 h valoa/vrk) 4 vrk.

### B) Suspensioviljelmän aloitus

Sirkkataimista leikataan 5-10 mm:n mittaisia hypokotyylin paloja. Yhdeltä maljalta saadaan 15-20 hypokotyylin pätkeä. Leikkaaminen tehdään siten, että pinseteillä tartutaan sirkkatairehypokotyyliin ja leikataan sirkkajuuri irti jättäen se idätysmaljalle. Irti leikattu sirkkataire siirretään puhtaalle maljalle ja poistetaan sirkkalehdet ja meristeemi. Hypokotyyli laitetaan välittömästi ravintoliuokseen. Yhden maljan hypokotyyli kerätään aina yhteen pulloon. Ravintoalusta on modifioitu Murashige & Skoog (1962) ravintoalusta, jossa on 1 mg/l 2,4-D:a (MS034). 100 ml:n Erlenmeyer-pullossa on 20 ml ravintoalustaa. Viljelmiä inkuboidaan ravistelijassa (100 rpm) ja valossa (16 h valoa/vrk) neljä viikkoa.

### C) Alaviljelmät 1-10

Ensimmäinen alaviljelämä tehdään, kun suspensio on kehittynyt neljä viikkoa. Jatkossa kasvatusaika on kaksi viikkoa. Kasvatuspulloissa oleva suspensio kaadetaan 355 µm:n verkkoputkeen. Putki pidetään 100 ml:n dekantterissa ja ravistellaan kunnes kaikki hienempi soluaines on mennyt läpi ja verkolle ovat jääneet kaikkein suurimmat solurykelmät. Läpi mennyt suspensio jaetaan kahteen 10 ml:n sentrifugiputkeen ja suljetaan steriilisti alumiinifoliolla. Solut sentrifugoidaan 5 min, 100 G:tä (817 rpm).

Sentrifugoinnin jälkeen pipetoidaan kirkas supernatantti ja soluylimäärä pois. Pakattua solua pipetoidaan muovisella Pasteur-pipetillä 0,5-0,7 ml. Pipetoinnissa käytetään apuna tuoretta ravintoalustaa. Alaviljelmissä käytetään MS034-ravintoalustaa (20 ml/ 100 ml:n Erlenmeyer-pullo). Suspensioita inkuboidaan ravistelijassa valossa (16 h valoa/vrk).

## D) Alkioiden indusointi

Alkioiden indusointiin käytetään aikaisintaan kolmatta ja viimeisenä kymmenettä alaviljelmää. Alaviljelmiä tehdään kahdeksan vuorokauden ikäisestä suspensiosta. Solususpensiota kaadetaan kahdesta alaviljelmäpullosta 355 µm:n verkkoputkeen, putkea välillä ravistaen. Ravistelua jatketaan kunnes ainoastaan kaikkein karkein aines jää verkolle. Läpi mennyt suspensio kaadetaan seuraavaksi 200 µm:n verkolle ja edelleen 100 µm:n, 45 µm:n ja 27 µm:n verkoille. Joka vaiheessa suodatetaan huolellisesti hienoin suspensio verkko läpi. Verkkoputkia pidetään 100 ml:n dekantterissa. 27 µm:n verkolle jäävät yksittäiset solut pestään MS035-ravintoliuoksella (hormoniton). Pesu tehdään siten, että putki siirretään puhtaaseen dekantteriin ja liuosta kaadetaan putken sisäreunoja myöten noin 20 ml ja ravistellaan. Pesuliuos kaadetaan pois. Sama toistetaan kolme kertaa. Nämä kolme pesua voidaan tehdä kuitenkin yhdessä ja samassa dekantterissa. Pestyt solut valutetaan pois putkesta pipetoimalla muovisella Pasteur-pipetillä putkeen MS035-ravintoalustaa. Soluja kerätään yhteen dekantteriin, kunnes niitä on riittävästi.

Muovisella Pasteur-pipetillä purskuttamalla pidetään suspensio tasaisena, jotta siitä saadaan luotettava näyte solutiheyden määrittämiseksi. Tätä varten otetaan lasisella Pasteur-pipetillä pieni pisara solususpensiota ja laitetään se verisolulaskukammioon (Fuchs-Rosenthal). Laskurin kammioihin otetaan pisarat kahdella eri pipetillä, jotta solutiheyden vaihtelusta johtuva virhe jäisi mahdollisimman pieneksi.

Mikroskoopin avulla lasketaan solujen määrä kymmenestä ruudukosta. Keskimääräistä ruudukon solujen määrää ja laskukammion tilavuutta hyväksi käyttäen lasketaan solutiheys millilitraa kohti solususpensiosta. Saadun arvon avulla lasketaan se suspensiomäärä, joka tarvitaan 20 ml:aan ravintoalustaa, jotta lopullinen solutiheys on 30 000 solua/ml. Induktioalustana käytetään MS035-ravintoalustaa. Alkioiden induktio tapahtuu ravistelijassa (100 rpm) pimeässä kahden viikon aikana.

## E) Alginaattipohjaisten keinosiemementen valmistus

Kemikaalit: 2 % natriumalginaattiliuos ja 100 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$

Kahden viikon ikäistä alkiosuspensiota kaadetaan 500 µm:n verkkoputkeen ja ravistellaan. Verkolle jäävät suurimmat alkiot poistetaan. Verkon läpi menevät pienet alkiot kaadetaan 355 µm:n verkkoputkeen ja ravistellaan pienimpien alkioiden poistamiseksi. Verkolle jääviä alkiota pestään kaatamalla pesuliuosta putken sisäreunoja myöten ja putkea ravistelemalla. Pesu tehdään kaksi kertaa vaihtamalla putki aina puhtaaseen 100 ml:n dekantteriin. Pesuliuos on hormoniton ja sokeriton 1/3MS liuos. Pestyt alkiot valutetaan putkesta dekantteriin kääntämällä putki ylösalaisin ja painamalla Pasteur-pipetillä pesuliuosta verkon läpi.

Saatu alkiosuspensiota pipetoidaan steriilille kertakäyttöiselle petrimaljalle (Greiner, Ø 60 mm). Suspensioon sekoitetaan varovasti natriumalginaattia muovisella Pasteur-pipetillä alkiota vahingoittamatta. Sekoitussuhde on neljä millilitraa alginaattiliuosta yhtä suspensiomillilitraa kohti.

Alkioiden poiminta aloitetaan mahdollisimman nopeasti alginaatin haittavaikutuksista johtuen. Lasisella Pasteur-pipetillä imetään ensin hieman puhdasta alkio-alginaattiseosta pipetin kapillaariosaan. Valitaan yksi normaalisti kehittynyt torpedovaiheinen alkio ja imetään se pipettiin. Alkio saa jäädä kapillaarin kärkiosaan. Alkio pudotetaan pisarana kalsiumnitraattiliukseen, jossa alkaa välittömästi alginaatin polymerisointuminen. Kalsiumnitraattia on noin 40 ml 100 ml:n dekantterissa. Alkioita poimitaan kymmenen minuuttia, jonka jälkeen ne saavat polymerisoitua 25 min. Näin saadaan erä, jossa polymerisointuisaika on 30 min  $\pm$  5 min. Polymerisointumisen aikana dekantteria ravistellaan joitakin kertoja. Jokaista poimintaa varten tehdään uusi alkio-alginaattiseos. Kalsiumnitraatti pipetoidaan pois. Keinosiemementen päälle kaadetaan hieman alkioiden pesuliuosta ja pipetoidaan se pois. Näin

saadaan liika kalsiumnitraatti pois. Varsinaiseen pesuun käytetään noin 40 ml samaa pesuliuosta, mutta pesuaika on 60 min. Dekanteri suljetaan steriilisti alumiinifoliolla ja laitetaan pesun ajaksi ravistelijaan (100 rpm).

Pesuliuos pipetoidaan pois. Keinosiemenet huuhdotaan vielä pienellä määrällä pesuliuosta, jotta kaikki kalsiumnitraatti saadaan pois. Keinosiementen siirtely ja käsittely tapahtuu helposti muovisen 3 ml:n Pasteur-pipetin avulla. Keinosiemen "imetään" pipetin kärkeen, missä se pysyy imun avulla.

## F) Keinosiementen koeidätys

Idätyksessä käytetään ravintoalustaa, joka on 1/3 MS, 30 g/l sakkaroosia ja hormoniton. Havainnointia ja idätyksen tehostusta varten lisätään alustaan aktiivihientä 0,2 %. Ravintoalusta valetaan kertakäyttöisille petrimaljoille (Greiner, Ø 60 mm). Yhdelle maljalle laitetaan 10 kpl keinosiemeniä. Kasvatus kestää kaksi viikkoa valossa (16 h valoa/vrk).

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

Alkioiden viljelyn käynnistämässä on käytössä erilaisia menetelmiä. Normaalisti kasvatus tehdään alusta loppuun kiinteällä alustalla, jolloin alkioiden muodostus tapahtuu kallussolkossa. Kasvien monistusta ajatellen metodi eroaa itse asiassa vain vähän mikrolisäyksestä, jossa kaikki vaiheet täytyy tehdä käsin. Automaation kannalta parempi vaihtoehto olisi käynnistää viljelämä suoraan nesteviljelmänä, jolloin liuokseen irtautuvat embryogeeniset solut voidaan poimia automaattisesti jatkokasvatukseen ja viedä näin koko prosessi alusta loppuun.

Tsygoottisista alkiosta poiketen somaattisilta alkioilta puuttuvat endospermi ja testa. Kehitettäessä keinotekoista endospermiä ja testaa keinosiemenille, paras lähtökohta lienee pyrkiä simuloimaan luonnollista endospermiä ja testaa. Kalsiumalginaatti, joka on usein käytetty materiaali alkioiden kapseloinnissa, soveltuu heikosti keinosiementen pitkäaikaiseen varastointiin, mutta lyhytaikaisesti sekin voi olla käyttökelpoinen ratkaisu. Eräs tärkeä seikka keinotekoista endospermiä kehitettäessä on sen polymerisaatiokyky normaalissa huoneen lämmössä. Natriumalginaatti on sikäli erittäin sopiva, että sen polymerisaatio tapahtuu normaalilämpötilassa 100 mM:ssa  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ :ssa kalsiumalginaatiksi. Vastaavanlaisia polymeerejä ja niiden kombinaatioita löytyy useitakin (Taulukko 1).

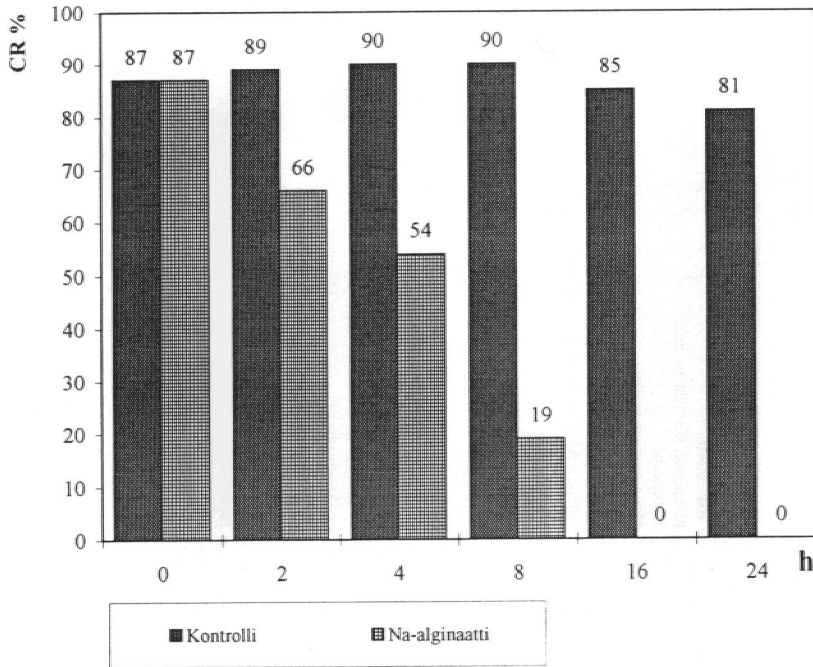
Na-alginaattia käytettäessä nopea työskentely on tärkeää, sillä polymerisoimaton alginaatti vaikuttaa haitallisesti alkioiden itävyyteen. Itävyyttä tutkittiin inkuboimalla alkiota alginaatissa 24 tunnin ajan (Kuva 1). Näytteet otettiin 2, 4, 8, 16 ja 24 tunnin kuluttua inkubaation aloituksesta. Alkioiden itävyys laski hyvin nopeasti ja oli vastaavasti 66, 54, 19, 0 ja 0 %. Eli 16 tunnin inkubaation jälkeen ei enää löydetty yhtään itävää alkiota, kun vastaavan ajan kuluttua kontrollialustalla ilman Na-alginaattia itävyys oli yhä 85 %. Vielä 24 tunnin inkubaationkin jälkeen kontrollialustojen alkioiden itävyys oli 81 %.

Somaattisten alkioiden ja keinotekoisten siementen käyttö puutarhakasvien lisäyksessä ja jalostuksessa on toistaiseksi vielä melko rajallista. Eräillä mallikasveilla kuten esim. porkkanalla, sellerillä ja sinimailasella on kuitenkin voitu osoittaa menetelmän toimivuus käytännössä. Somaattinen embryogeneesi voi olla myös tehokas työkalu kasvinjalostuksessa. Koska useat puutarhakasvit ovat itse asiassa heterotsygootteja klooneja, voidaan risteytysjälkeläiset nopeasti kloonata käyttämällä keinosiementekniikkaa. Näin saadaan nopeasti

**Taulukko 1.** Yhteenveto erilaisista kaupallisesti saatavista polysakkarideista ja galaktomannaaneista, joita joko yksin tai yhdessä muiden kanssa voidaan käyttää alkioiden kapseloimtiin. Merkittävää näissä kombinaatioissa on niiden geelinmuodostuskyky normaalissa huoneen lämmössä.

No	Lähde	Galaktomannaani/ polysakkaridit	Alkuperä	Rakenne	Pitoi- suus %	Hyvेलömittömmän seoksen (hs) ja kapseloiden (k) ominaisuuksia
1	Fluka	-Na-alginaatti, Kategoria Nr. 71238	-Ruskolevä ( <i>Laminaria hyperborea</i> )	-D-mannuronihappo 25-30 %	2,0	hs: alhainen viskositeetti k: kirrkaat, kimmoiset, kestävät, pyöreät
2	Sanofi	-E410 Locust bean gum -uite (Lysozyme® 6)	- <i>Cerantonia siliqua</i> endospermi	-1 galaktoosi-osa/neljä maamooositähdetä	1,0	hs: korkea viskositeetti k: melko kirrkaat, hauraat, pyöreät
3	Fluka	-Na-alginaatti (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	1,0	hs: korkea viskositeetti, harmaa k: vaalean harmaat, jäykät, melko kestävät, pyöreät
3	Sanofi	-E415 Xanthan gum (Satiaxane® CX 90)	- <i>Xanthomonas campestris</i> viljelmä	-Glukoosi-, mannoosi- ja glukuronihappotähteet	1,0	hs: korkea viskositeetti, harmaa k: vaalean harmaat, jäykät, melko kestävät, pyöreät
4	Fluka	-Na-alginaatti (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	1,0	hs: korkea viskositeetti, harmaa k: vaalean harmaat, jäykät, melko kestävät, pyöreät
4	Sanofi	-E415 Xanthan gum (Satiaxane® CX 91)	- <i>Xanthomonas campestris</i> viljelmä	-ks. edellä	1,0	hs: korkea viskositeetti, harmaa k: vaalean harmaat, jäykät, melko kestävät, pyöreät
5	Fluka	-Na-alginaatti (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	1,0	hs: korkea viskositeetti k: kirrkaat, jäykät, melko kestävät, epäsäännölliset
5	Sanofi	-E412 Guar gum (Viscogum® HV 3000 A)	- <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> endospermi	-1 galaktoosi-osa/neljä maamooositähdetä	1,0	hs: alhainen viskositeetti k: kirrkaat, kimmoiset, hyvin kestävät, epäsäännölliset
6	Fluka	-Na-alginaatti (ks. edellä)	-ks. edellä	-Sulfatoidut galaktoositähteet	1,0	hs: alhainen viskositeetti k: kirrkaat, kimmoiset, hyvin kestävät, epäsäännölliset
6	Fluka	-Kappa-carrageenan, Kategoria Nr. 22048	-Punalevä	ja 3,6-anhydrogalaktoosi	0,5	hs: alhainen viskositeetti k: kirrkaat, kimmoiset, hyvin kestävät, epäsäännölliset
7	Fluka	-Na-alginaatti (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	1,0	hs: alhainen viskositeetti k: kirrkaat, kimmoiset, hyvin kestävät, pienet, pyöreät
7	Fluka	-Vehnätärkkelys, Kategoria Nr. 85649	- <i>Triticum aestivum</i> endospermi	-Amyloosi 20-30 %, amylopektiini 70-80 %	5,0	hs: alhainen viskositeetti k: kirrkaat, kimmoiset, hyvin kestävät, pienet, pyöreät
Sanofi		-Cecalgum S 500 (Na-alginaatti)	-Ruskolevä	-D-mannuronihappo-osa/ L-glukuronihappo-osa	2,0	hs: alhainen viskositeetti k: kirrkaat, kimmoiset, hyvin kestävät, epäsäännölliset
8	Fluka	-Vehnätärkkelys (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	5,0	hs: kirrkaas, korkea viskositeetti pH 6,8:ssä k: kirrkaat, jäykät, hauraat, epäsäännölliset
Fluka		-Kappa-carrageenan (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	1,0	hs: kirrkaas, alhainen viskositeetti pH 4,5:ssä k: sameat, hauraat, epäsäännölliset
9	Fluka	-Vehnätärkkelys (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	5,0	hs: kirrkaas, alhainen viskositeetti pH 4,5:ssä k: sameat, hauraat, epäsäännölliset
Fluka		-Kappa-carrageenan (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	0,5	hs: kirrkaas, alhainen viskositeetti pH 6,9:ssä k: kirrkaat, melko kimmoiset, hauraat, epäsäännölliset
Sanofi		-E440 low metoxyl pectins (Unipectine® 325 NH 95)	-Omenan puristusjäte tai sitruhedelmän kuori	-Galaktopyranosyluronihap- po-osat osittain esteröityneinä metanolin kanssa (esteröity- misaste < 50 %)	4,0	hs: kirrkaas, alhainen viskositeetti pH 6,9:ssä k: kirrkaat, melko kimmoiset, hauraat, epäsäännölliset
10	Fluka	-Vehnätärkkelys (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	5,0	hs: kirrkaas, alhainen viskositeetti pH 6,9:ssä k: kirrkaat, melko kimmoiset, hauraat, epäsäännölliset
Fluka		-Kappa-carrageenan (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	0,8	hs: kirrkaas, alhainen viskositeetti pH 6,9:ssä k: kirrkaat, melko kimmoiset, hauraat, epäsäännölliset
Fluka		-Na-alginaatti (ks. edellä)	-ks. edellä	-ks. edellä	0,5	hs: kirrkaas, alhainen viskositeetti pH 6,9:ssä k: kirrkaat, melko kimmoiset, hauraat, epäsäännölliset

Komponentit sekoitetaan keskenään autoklavoinnin jälkeen, minkä jälkeen kapselointi tapahtuu puudottamalla stauusseosta Pasteur-pipetillä steriiliin 100 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-seokseen (pH 5,5).



**Kuva 1.** Porkkanan somaattisten alkoiden itämisprosentit (CR %) 0-24 tunnin (h) inkubaation jälkeen ilman Na-alginaattia (=kontrolli) tai Na-alginaatin kanssa.

riittävän suuret aineistot ensimmäisiä kenttäkokeita varten. Yhdistämällä keinosiementekniikka ja geeninsiirto, voidaan muuten hyvän lajikkeen tiettyä ominaisuutta parantaa lisää-

mällä siihen tarvittava geeni tai geenejä, kloonata transgeeninen kasvi keinosiementekniikan avulla ja viedä keinosiemenet myyntiin.

## Kirjallisuus

**Murashige, T.** 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae* 78: 17-30.

**Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

**Redenbaugh, K., Fujii, J., Slade, D., Viss, P. & Kossler, M.** 1991. Artificial seeds - encapsulated somatic embryos. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation I.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. Volume 17: 395-416. ISBN 3-540-53656-6

# Puiden somaattinen embryogeneesi biotekniikassa

---

Liisa Kaarina Simola

*Biotieteiden laitos, Kasvifysiologian osasto, PL 56, 00014 Helsingin yliopisto  
e-mail: liisa.simola@helsinki.fi*

Somaattista embryogeneesiä on indusoitu useilla puuvartisilla kasveilla käyttäen lähtöaineistona alkioita tai niistä tuotettuja kallussolukoita. Somaattisten alkoiden tuottaminen vegetatiivisesta solukosta saatuihin solukkoviljelmiin on harvinaisempaa. Eräillä havupuilla, kuten kuusella (*Picea* sp.) ja lehtikuusella (*Larix* sp.) somaattisten alkoiden induktio ja kypsytytys tunnetaan jo hyvin. Toistaiseksi on onnistuttu kasvattamaan vähäisessä määrin kokonaisia taimia, joiden ominaisuuksia voidaan tutkia kenttäkokein. Tulppaanipuulla (*Liriodendron tulipifera*) taimien massatuotannossa voidaan käyttää siivilöityä, alkioita runsaasti sisältävää jaosta, ja alkiot itävät ilman lepoaihetta. Vielä ei tiedetä mikä aiheuttaa somaattisen solun muuttumisen alkioita tuottavaksi. Polyamiineilla ja aminohapoilla näyttää kasvihormonien ohella olevan säätelevä vaikutus. Mikäli somaattisista alkioista halutaan keinotekoisia siemeniä, on endospermi ja siemenenkuori korvattava keinotekoisilla jäljitelmillä. Olemme viljelleet embryogeenistä solukkoa sekä kuusen alkioista että megagametofyyttisolukosta. Suurin osa megagametofyyttilinjoista kuolee haploidivaiheessa esiintulevien letaaligeenien vaikutuksesta. Alunperin haploidi megagametofyyttisolukko diploidisoituu spontaanisti ja tuloksena on homotsygoottinen linja, joka harvoin tuottaa alkioita. Metsälehmuksen (*Tilia cordata*) epäkypsistä alkioista olemme tuottaneet somaattisen embryogeenin kautta taimia useasta provenienssista. Mikäli somaattisia alkioita halutaan geneettisesti manipuloida, täytyy olla saatavana spesifisiä geenejä ja promoottoreja. Näitä ei puista juuri tunneta, ja ominaisuudet ovat usein monen geenin säätelemiä. Geeninsiirtotekniikat eivät takaa geenin asettumista sopivaan paikkaan ja ekspressoitumista. Olisi oltava myös valintakeino transformoitujen solujen tunnistamiseksi. Transformoidut alkiot täytyy saada kehittymään uusiksi kasveiksi, ja niitä on voitava lisätä suvuttomasti taimien massatuotantoa varten.

*Avainsanat: geenitekniikka, keinosiemenet, Picea abies, puuvartiset kasvit, solukkoviljely, Tilia cordata*

# Abstract

## Somatic embryogenesis in biotechnology of woody plants

Liisa Kaarina Simola

*Department of Biosciences, Division of Plant Physiology, P. O. BOX 56,  
FIN-00014 University of Helsinki  
e-mail: liisa.simola@helsinki.fi*

With several woody plants somatic embryogenesis has been induced from embryos or embryo-derived callus tissue as explants. Induction of somatic embryos from callus produced from vegetative tissue is less common. With some conifers, such as spruce (*Picea* sp.) and larch (*Larix* sp.), induction and development of somatic embryos is well known. Regeneration of complete plantlets has been successful to some extent and their properties can be studied in the field. With tulip tree (*Liriodendron tulipifera*) suspension cultures containing abundant embryos can be sieved and used for mass propagation, and the embryos germinate without dormancy. The cause of proliferation of embryos from a somatic cell is not known. It seems that polyamines and amino acids have, in addition to growth substances, a regulatory role. If artificial seeds are to be produced from somatic embryos, the endosperm and seed coat must be replaced by an artificial substitute. We have cultured embryogenic callus both from spruce embryos and from megagametophytic tissue. Most of the megagametophytic lines die during the haploid phase due to expression of lethal genes. Diploidisation of the haploid callus of megagametophyte origin is spontaneous, resulting in a homozygous line which rarely produces embryos. We have cultured plantlets via somatic embryogenesis of several provenances of lime (*Tilia cordata*) by using immature embryos as explants. If genetic transformation of somatic embryos is desired, specific genes and promoters must be available. With trees these are often not known and characters are coded for by multiple genes. Gene transfer techniques do not guarantee that the gene is suitably located and expressed. Selection methods should also be available for identification of the transformed cells. One must be able to culture transformed embryos into new plants and propagate them vegetatively for mass production of plantlets.

*Key words:* artificial seed, genetic engineering, *Picea abies*, *Tilia cordata*, tissue culture

# Johdanto

Usein puiden kyky tuottaa kypsiä siemeniä heikkenee niiden vanhetessa. Pistokaslisäys taas saattaa tuottaa huonon tuloksen johtuen kehittyvän taimen oksamaisesta kasvutavasta ja heikosta juurtumisesta. Vaikka verraten vanhojen puiden jälsi tuottaa kallusta, niin erilaistumisen induktio on useimmiten heikkoa. Somaattisia alkioita, joita raportoitiin harvinaisina erikoisuuksina 10 vuotta sitten, tutkitaan tällä hetkellä vilkkaasti. Niiden käyttö perustutkimuksessa ja biotekniikassa on viime vuosina voimakkaasti lisääntynyt. Tästä osoitukse-  
na ovat mm. alan erikoissymposiumit sekä vuonna 1995 ilmestynyt kolmiosainen teos: *Somatic embryogenesis of woody plants I-III* (toim. Jain *et al.*).

## Somaattisen embryogeneesin esiintyminen ja induktio

Täysikasvuisista puista on usein sängen vaikea saada jatkuvasti alkioita tuottavia solukkoviljelmiä. Puun erilaistuneet tumalliset solut eivät helposti indusoidu jakautumaan, saati sitten tuottamaan alkioita vastaavissa olosuhteissa kuin esim. saman lajin vesoista otetut siirränäiset. Jotkut toistaiseksi tuntemattomat geenit ovat ensin mainituissa soluissa repressoituneet. Sen sijaan on verraten helppo indusoida adventiivialkioita vanhankin puun kehittyvään alkioon, jolloin solujen katsotaan jo ennalta määrättyneen embryoitu tuottaviksi. Tosin lehtipuista tunnetaan useita yksittäistapauksia, joissa kukanosiin on kehittynyt somaattisia alkioita. Erityisesti tammen (*Quercus robur*) hedenorkot ovat osoittautuneet hyväksi lähtöaineistoksi (Gingas 1991). Myös 50-vuotiaasta rautatammesta (*Quercus ilex*) otettu lehtisiirränäinen saatiin tuottamaan ravintoalustalla nystyryitä, joihin kehittyi somaattisia alkioita (Feraud-Keller & Espagnac 1989). Eräs keino saada aikaan somaattista embryogeneesia on tuottaa täysikasvuisesta puusta ensin mikrolisäysmenetelmällä versoja, ja indusoida näiden

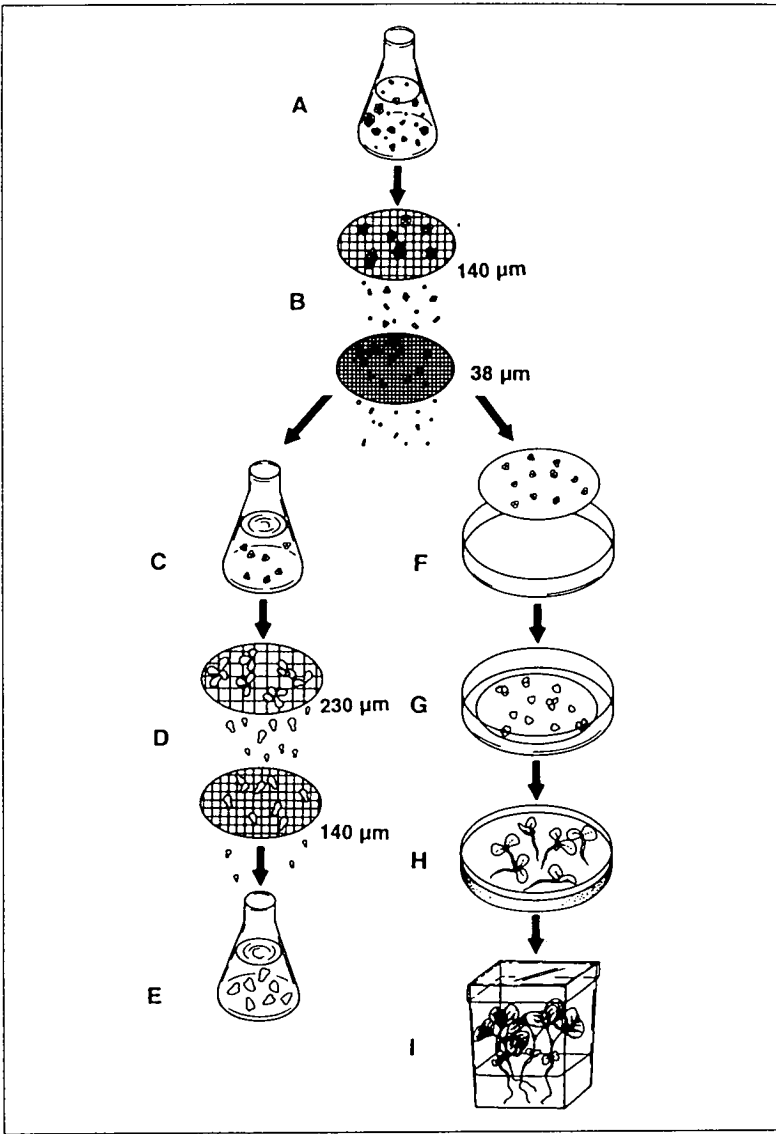
lehtilapoihin tai ruoteihin alkionmuodostusta (Michler & Bauer 1991).

Joskus parin päivän auksiinilisäys ravintoliuokseen saattaa indusoida vuosia jatkuvan somaattisen embryogeneesin viljelmässä. Tätä ns. autoembryoniaa on havaittu esim. valeakasiolla (*Robinia pseudoacacia*) (Merkle & Wiecko 1989). Tulppaanipuulla (*Liriodendron tulipifera*) auksiinia (2,4-dikloorifenoksisietikkahappo, 2,4-D) tarvitaan alkioiden jatkuvaan tuottamiseen. Kun se jätetään pois ravintoliuoksesta, somaattiset alkiot jatkavat kehitystään taimiksi ilman lepovaihetta (Merkle & Sommer 1986). Sama ilmiö on havaittu esim. erällä kastanjalajeilla (*Castanea* sp.) (Merkle *et al.* 1991). Valitettavasti pitkäaikainen auksiinikäsitely saattaa johtaa somaattisten alkioiden kehityshäiriöihin.

On varsin ongelmallista saada puuvartiset kasvit tuottamaan paljon somaattisia alkioita. Usein on päästy hyvään tulokseen, kun lähtöaineistona on käytetty tsygoottiin alkioihin, varsinkin niiden sirkkalehtiin tai -varteen erilaistuvia alkioita. Joskus saadaan vain muutama yksittäinen alkio, joka voi kehittyä taimeksi, mutta lajin suurimittaiseen lisäämiseen ei päästä. Eräissä tapauksissa primaarinen somaattinen alkio ei kypsy, vaan siitä lähtee kasvaamaan uusia alkioita. Nämä saavat yleensä alkunsa epidermi- tai subepidermisoluista. Tämä ilmiö voi johtaa somaattisten alkioiden massatuotantoon (Kuva 1).

Joskus myös lehtipuiden proembryogeenista massaa voidaan viljellä pitkiä aikoja auksiinia sisältävällä alustalla. Kehitys jää varhaiseen pallovaiheeseen, mutta viljelmän siirto auksiinia sisältämättömälle alustalle mahdollistaa alkioiden jatkokehityksen, ja muutamasta grammasta proembryogeenistä viljelmää saadaan tuhansia somaattisia alkioita. Merklen työryhmä on kehittänyt viljelymenetelmän, jossa tulppaanipuun alkioita tuottava suspensioviljelelmä siivöidään ja pallovaiheisia alkioita sisältävä jaos kerätään suodatinpaperille Büchner-suppiloa ja vähäistä tyhjiötä käyttäen. Suodatinpaperi ja sen pinnalla olevat alkiot laitetaan puolikiinteälle alustalle valoon 30 °C:seen (Kuva 1). Kahden viikon kuluttua kehittyi samanaikaisesti kokonainen populaatio pitemmälle kehittyneitä alkioita (Merkle *et al.* 1993).





**Kuva 1.** Tulppaanipuun (*Liriodendron tulipifera*) alkioita muodostavan (embryogeenisen) viljelmän jaottelu ja synkronointi massakasvatusta varten. A. Embryogeenistä suspensioviljelmää kasvatetaan nestemäisessä induktiokasvatusliuoksessa pullossa ravistelussa. B. Proembryogeeniset solukat jaotellaan terässiivilällä, ja jaos, joka menee läpi 140 µm:n, muttei 38 µm:n aukoista, säästetään. C. Jaosta viljellään viikko peruskasvatusliuoksessa. D. Pallovaiheen alkioit jaotellaan jälleen, jotta voitaisiin poistaa solurykelmät ja vapaat solut; 230 µm:n, muttei 140 µm:n aukoista läpimenevä jaos säästetään. E. Pallovaiheen alkioita kasvatetaan vielä 7-10 päivää perusalustalla, jotta saadaan synkronoitua sydän-torpedovaiheen alkioita. F. Vaihtoehtoisesti proembryogeeniset solukat siirretään välittömästi ensimmäisen jaotellun jälkeen suodatinpaperille, joka asetetaan puolikiinteälle perusalustalle. G. Proembryogeenisiä solukoita kasvatetaan 12-14 päivää abskisiinihappoa sisältävällä erikoisalustalla, jotta saadaan kypsiä alkioita. H. Kypset alkioit siirretään perusalustalle ilman suodatinpaperia itämisen edistämiseksi. I. Taimet siirretään uudelle erikoisalustalle, josta ne istutetaan 6-8 viikon kuluttua maaseokseen [Simola 1995, Merklen *et al.* (1990a) mukaan].

Somaattisten alkoiden jatkokehitys on usein heikkoa. Vaikeuksia voi olla alkoiden kypsymisessä. Meristeemien aktivoituminen jakautumaan ja solujen polarisoituminen ovat ongelmina. Seuraavaksi on juuren ja verson erilaistuttava anatomisesti ja fysiologisesti. Ongelmia on varsinkin juuren kasvuunlähdössä ja verson piteneemisessä. Jatkovaa embryogeneesiä varten tunnetaan muutamasta havupuuvuovusta viljelymenetelmiä, joissa proembryoita tuottavaa solukkoa voidaan viljellä paljonkin (Attree & Fowke 1993). Kuitenkin somaattisten alkoiden heikko jatkokehitys on usein hyvin vakava ongelma. Olisikin pystyttävä jäljittämään kunkin lajin normaalien tsygoottisten alkoiden kehitystä (jälkikypsyminen, vernalisaation tarve jne.), jotta somaattiset alkiot kehittyisivät taimiksi.

## Kuusen ja lehmuksen somaattinen embryogeneesi

Omassa laboratoriossamme on tutkittu kuusen (*Picea abies*) megagametofyytti- ja alkioperäisten kalluslinjojen induktiota ja kasvua sekä erilaistumista sääteleviä tekijöitä. Pyrkimyksenä oli saada megagametofyyteistä haploideja kalluslinjoja, joista joko spontaanisti tai kolkisiinikäsitteillä päästäisiin diploideihin (dihaploideihin) homotsygoottisiin linjoihin. Haploidivaihe toimisi letaaligeenien karsimisen mahdollistavana siivilänä. Kun viljelmät aloitettiin epäkypsistä vernalisoiduista siemenistä, niistä kuoli usein 98-99 % puolen vuoden kuluessa viljelmän aloittamisesta (Simola & Honkanen 1983). Sen sijaan alkiosta saatiin paljon edelleen viljeltäviä linjoja, mutta niiden rakenne ja väri sekä kyky tuottaa spontaanisti proembryoita vaihteli paljon (Simola *et al.* julkaisematon).

Megagametofyyttinjat diploidisoituivat spontaanisti ja embryogeneesin induktio onnistui parhaiten alustalla, joka oli kehitetty loblollymännyn (*Pinus taeda*) siemenen koostumuksen pohjalta (Teasdale *et al.* 1986), mutta pientä määrää orgaanista typpeä (kaseiinihydrolysaatti 100 mg/l ja 0,5 mM glutamiini,

0,25 mM arginiini) käytettiin epäorgaanisen typen lisänä. 2,4-D (10  $\mu$ M) ja kinetiini (2,5 tai 5  $\mu$ M) osoittautuivat embryogeneesille edullisimmiksi kasvuaineiksi (Taulukko 1). Megagametofyyttinjojen erilaistuminen proembryovaihetta pidemmälle oli harvinaista (Simola & Santanen 1990).

Havupuilla abskisiinihappokäsittely on yleensä tarpeen alkoiden kypsymiselle (von Arnold & Hakman 1988, Simola & Santanen 1990), mutta se näyttää olevan eduksi myös metsälehmuksen (*Tilia cordata*) somaattisten alkoiden jatkokehitykselle (Simola & Kärkönen 1996). Puiden somaattisilla ja tsygoottisilla alkiolla on hyvin samankaltainen elektronimikroskooppinen rakenne (Joy *et al.* 1991, Simola & Kärkönen 1994). Eräissä tapauksissa osmoottisilla olosuhteilla ja sopivilla typen lähteillä, erityisesti proliinilla ja glutamiinilla on alkoiden kehitystä edistävä vaikutus (Wetherell & Dougall 1976, Nuti Ronchi *et al.* 1984). Joskus kuivuminen ja kylmäkäsittely ovat siemenen jälkikypsymisvaatimuksena. Tätä tietoa joudutaan soveltamaan, kun somaattisista alkiosta yritetään saada itäviä keinotekoisia siemeniä (Merkle *et al.* 1990b).

Koska polyamiinilisäyksellä oli kuusen megagametofyyttinjojen kasvuun ja erilaistumiseen suotuisa vaikutus, tutkimme myös somaattisen embryogeneesin aikaisia muutoksia tällä lajilla (Simola & Honkanen 1983). Porkkanan (*Daucus carota*) suspensioviljelmässä oli jo todettu polyamiinien synteisiin liittyvien entsyymien ja embryogeneesin välillä selvä korrelaatio (Montaque *et al.* 1978). Kuusen yleisimmät polyamiinit olivat putreskiini ja spermidiini, joista varsinkin spermidiinin määrä nousi embryogeneesin aikana (Santanen & Simola 1992). Polyamiinit esiintyvät paitsi vapaina - jossa muodossa ne useimmiten määritetään - myös fenoleihin konjugoituneina tai sitoutuneina esim. solunseiniin ja tuman proteiineihin. Valkokuusella (*Picea glauca*) on yleisimpiä polyamiineja paikannettu immunohistokemiallisin keinoin alkiota tuottavan kallusolukon tumaan ja tumajyvaseen (Amarsinghe & Carlson 1994).

Kuusella spermidiinin konjugoito muoto yleistyi embryogeneesin aikana, mutta putres-

**Taulukko 1.** Ravintoalustojen (1-6) ja kasvuaineiden vaikutus kuusen (*Picea abies*) kallusviljelmien proembryoiden induktioon (megagametofyyttiperäinen viljelmä). Makroravinnekoostumus: 1) N<sub>6</sub>-makroravinteet (Chu *et al.* 1975) (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1:4), 2) N<sub>6</sub>-makroravinteet (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1:4), 3) T-makroravinteet (Simola & Santanen 1990) (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1:2), 4) T-makroravinteet (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1:4), 5) T-makroravinteet (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1:2), 6) T-makroravinteet (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1:4). Alustassa 1 MS-mikroravinteet (Murashige & Skoog 1962), alustoissa 2-6 on SS-mikroravinteet (Simola & Santanen 1990) sisältäen myös nikkeliä. Alustat 1, 3, 5 ja 6 sisältävät orgaanista tyypeä (kaseiinihydrolysaatti 100 mg/l, arginiini 0,25 mM ja glutamiini 0,5 mM). Kaksi perättäistä koetta (I ja II). Proembryoiden lukumäärä/1g kallus; +, 1-50; ++, 51-100; +++, 101-200; +++, >200. (Simola & Santanen 1990).

Ravintoalusta	Kasvuaineet	Orgaaninen tyyppi	Proembryoita/l g kallus	
			I	II
1A	2,4-D 10 µM	+	+	+
2A	kinetiini 2,5 µM	-	+++	+++
3A		+	+++	-
4A		-	+	+++
5A		+	++++	+
6A		+	+++	+++
1B	2,4-D 10 µM	+	+	+
2B	kinetiini 5 µM	-	+++	+
3B		+	+	+
4B		-	+	+
5B		+	+	+
6B		+	+++	+
1C	indolivoihappo 0,5 µM	+	++	+
2C	kinetiini 5 µM	-	+	+
3C		+	+	+
4C		-	+	+
5C		+	+	+
6C		+	+	+
1D	indolivoihappo 0,5 µM	+	+	+
2D	kinetiini 25 µM	-	+++	+
3D		+	+	+
4D		-	+++	+
5D		+	+	+
6D		+	+	+

kiiniä oli vain vähän, eikä sitä esiintynyt lainkaan sidotussa muodossa (Santanen & Simola 1992). Selvitimme myös diamiineja ja polyamiineja hajoitavien entsyymien aktiivisuuden alkion kehityksen eri vaiheissa ja vertasimme näiden entsyymien aktiivisuutta vastaaviin aktiivuisuuksiin samanikäisissä ja samoissa oloissa kasvaneissa embryoita tuottamattomissa linjoissa. Voimakkaasti kasvavissa viljelmissä entsyymien aktiivisuudet ovat alhaiset. Verrattaessa kypsyviä alkioita ja alkioita tuottamatonta osaa viljelmästä, todettiin viimeksi mainitussa selvästi korkeammat entsyymien aktiivisuudet (Santanen & Simola 1994).

## Transgeeniset kasvit

Mikäli primaariseen somaattiseen alkioon sen kehityksen varhaisvaiheessa onnistutaan siirtämään toivottuja geenejä, ja nämä ekspressoituvat, voitaisiin olettaa merkittäviä puiden geenimanipulaation sovellutuksia olevan näköpiirissä. On kuitenkin otettava huomioon, että monet ominaisuudet ovat lukuisten geenien säätelemiä. Siirrettäessä geenejä biolistisin menetelmin proembryoihin, soluissa tapahtuu tuskin koskaan samanlaisia osumia. Toisin kuin sanikkaisten, siemenkasvien juuren ja verson kasvupiste koostuu useasta solusta. Näin ollen erilaisten kimeroiden ja epämuodostumien kehitys on varsin todennäköistä. Menetelmää lieneekin esitelty todellista tuloksellisempana.

Vaikka somaattinen embryogeneesi saattaa näyttää lupaavalta menetelmältä transgeenisten puiden massatuotannossa, liittyy siihen merkittäviä ongelmia. Ne on ensin myönnettävä ja sitten ratkaistava vankan tiedon, taidon, kovan työn ja intuition tuloksena. Samankin lajin eri linjat reagoivat esim. eri aminohappolisäyksiin ja kasvuaineisiin täysin eri tavoin. Lisäksi saman linjan eri viljelmäpolvet saat-

tavat käyttäytyä eri tavoin (Simola *et al.* julkaisematon).

Tulppaanipuulla proembryoita sisältävää viljelmää on yritetty transformoida biolistisin keinoin ampumalla niihin plasmidi pB1121, jossa on  $\beta$ -glukuronidaasi- (GUS, pektinaasi) ja kanamysiiniresistenssigeeni (Wilde *et al.* 1992). Kanamysiiniresistentit soluryhmät näkyvät kuuden viikon kuluttua. Näistä viljelmistä on regeneroitunut transeenisiä kasveja, joissa  $\beta$ -glukuronidaasi ekspressoituu vielä viiden vuoden ikäisissä puissa. Tutkijaryhmää ei tunnu vaivaavan se tosiasia, että kasveilla on yleensä jo valmiina tämä geeni, mutta se ekspressoituu vain kehityksen tietyssä vaiheessa, jolloin sillä on merkitystä esim. hedelmien kypsymisessä.

## Keinotekoiset siemenet

Mikäli alkioiden tuotanto ja jatkokehitys sirkakalehdelliseen vaiheeseen ovat hyvät, voidaan kokeilla niiden kapselointia alginaattigeeliin, johon on liitetty sopivat epäorgaaniset ravinteet. Verraten hyvään tulokseen pääsimme jäljittelemällä itävän siemenen aminohappokoostumuksessa tapahtuvia muutoksia. Arginiinin ja glutamiinin lisäys keinotekoiseen endospermiin lisäsi selvästi itämistä (Simola *et al.* julkaisematon).

Usein puita koskevat työt jäävät raporteiksi onnistuneesta somaattisesta embryogeneesista ilman jatkotutkimuksia. Näin ei tiedetä, kehittyvätkö alkiot taimiksi ja selviävätkö taimet ruukutusvaiheessa kasvihuoneolosuhteissa ja edelleen kenttäkokeissa. Jos laji hyötyy mykorrhitsasta taimistossa, on sopiva sieni-infektio aiheellinen. Tosin keinotekoisesti aikaansaatua kasvi-sienisymbioosi saattaa korvautua luonnossa toisella symbiosilla, jossa mykorrhitsasieni jää usein tunnistamatta.

# Kirjallisuus

- Amarasinghe, V. & Carlson, J. E.** 1994. Subcellular localization of polyamines in embryogenic callus of white spruce (*Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany* 72: 788–793.
- Arnold, S. von & Hakman, I.** 1988. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *Journal of Plant Physiology* 132: 164–169.
- Attree, S. M. & Fowke, L. C.** 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35: 1–35.
- Chu, C.-C., Wang, C.-C., Sun, C.-S., Hsu, C., Yin, K.-C., Chu, C.-Y. & Bi, F.-Y.** 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659–668.
- Feraud-Keller, C. & Espagnac, H.** 1989. Conditions d'apparition d'une embryogenèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Canadian Journal of Botany* 67: 1066–1070.
- Gingas, V. M.** 1991. Asexual embryogenesis and plant regeneration from male catkins of *Quercus*. *HortScience* 26: 1217–1218.
- Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J.** 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Volumes 1–3. ISBN 0-7923-3035-8, ISBN 0-7923-3070-6, ISBN 0-7923-2939-2
- Joy, R. W., IV, Yeung, E. C., Kong, L. & Thorpe, T. A.** 1991. Development of white spruce embryos 1. Storage product deposition. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 27P: 32–41.
- Merkle, S. A., Parrot, W. A. & Williams, E. G.** 1990a. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani, S. S. (ed.). *Plant tissue culture: applications and limitations. Developments in crop science.* Amsterdam: Elsevier. Volume 19: 67–101. ISBN 0-444-88883-7
- Merkle, S. A. & Sommer, H. E.** 1986. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera*. *Canadian Journal of Forest Research* 16: 420–422.
- Merkle, S. A. & Wiecko, A. T.** 1989. Regeneration of *Robinia pseudoacacia* via somatic embryogenesis. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 285–288.
- Merkle, S. A., Wiecko, A. T., Sotak, R. J. & Sommer, H. E.** 1990b. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26: 1086–1093.
- Merkle, S. A., Wiecko, A. T. & Watson-Pauley, B. A.** 1991. Somatic embryogenesis in American chestnut. *Canadian Journal of Forest Research* 21: 1698–1701.
- Merkle, S. A., Wilde, H. D. & Sommer, H. E.** 1993. *In vitro* culture of *Liriodendron tulipifera*. In: Ahuja, M. R. (ed.). *Micropropagation of woody plants.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 281–302. ISBN 0-7923-1807-2
- Michler, C. H. & Bauer, E. O.** 1991. High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of *Populus* spp. *Plant Science* 77: 111–118.
- Montaque, M. J., Koppenbrink, J. W. & Javorski, E. G.** 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiology* 62: 430–433.
- Murashige, T & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nuti Ronchi, V., Caligo, A. M., Nozzolini, M. & Luccarini, G.** 1984. Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. *Plant Cell Reports* 3: 210–214.
- Santanen, A. & Simola, L. K.** 1992. Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Journal of Plant Physiology* 140: 475–480.
- Santanen, A. & Simola, L. K.** 1994. Catabolism of putrescine and spermidine in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 90: 125–129.
- Simola, L. K.** 1995. Kasvien somaattisen embryogeneesin fysiologiaa. Luonnon Tutkija 3: 84–89.
- Simola, L. K. & Honkanen, J.** 1983. Organogenesis and fine structure in megagametophyte callus lines of *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 59: 551–561.
- Simola, L. K. & Kärkönen, A.** 1994. Cell organelles in somatic and zygotic embryos of *Tilia*

*cordata*. Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, Italy, June 12-17, Firenze: International Association for Plant Tissue Culture. p. 161: S8-9.

**Simola, L. K. & Kärkönen, A.** 1996. Ultrastructure and immunohistochemical localization of cytokinins in somatic embryos of *Tilia cordata*. In: From single cell to plant - progress towards understanding zygotic, androgenic and somatic embryogenesis. Plant Embryogenesis Workshop, Hamburg, Germany, September 12-14, 1996. Hamburg: Centre for Applied Plant Molecular Biology, University of Hamburg. p. 43: S11-14.

**Simola, L. K. & Santanen, A.** 1990. Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megagametophyte and embryo callus lines of *Picea abies*. Physiologia Plantarum 80: 27-35.

**Teasdale, R. D., Dawson, P. A. & Woolhouse, H. W.** 1986. Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. Evaluation of a medium formulated from seed composition data. Plant Physiology 82: 924-945.

**Wetherell, D. F. & Dougall, D. K.** 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiologia Plantarum 37: 97-103.

**Wilde, H. D., Meagher, R. B. & Merkle, S. A.** 1992. Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. Plant Physiology 98: 114-120.

# Solukkoviljelyn hyödyntäminen POHERIKA - pohjoiset erikoiskasvit - projektissa. Kihokin, venäjänjuuren ja ranskalaisen rakuunan mikrolisäys

---

Terttu Kämäräinen

Oulun yliopisto, Kasvitieteellinen puutarha, PL 333, 90571 Oulu

e-mail: [mtk@sun3.oulu.fi](mailto:mtk@sun3.oulu.fi)

POHERIKA-projektissa tavoitteena on löytää uusia hyödynnettäviä yrtti- ja rohdoskasvilajeja sekä tehostaa nykyisten viljelyä, jatkojalostusta ja kauppaa. Projektissa on mukana tutkijoita Oulun yliopiston eri laitoksilta ja osastoilta. Hankkeessa on mukana myös MTT:n tutkimusasemia sekä yrtyyrittäjiä. Oulun yliopiston kasvitieteellisen puutarhan tehtävä on etsiä ja kartoittaa uusia viljelyyn sopivia yrtti- ja rohdoskasveja, testata eri lisäysmenetelmiä sekä valita tutkituista kasvilajeista viljelyyn parhaiten sopivia kantoja. Kasvitieteellisen puutarhan solukkoviljelylaboratoriossa tuotetaan lisäksi tutkimusmateriaalia muille hankkeessa mukana oleville. Solukkoviljelyä hyödynnetään projektissa sellaisilla kasvilajeilla, joiden lisäys muilla menetelmillä on hankalaa tai hidasta, esim. ranskalainen rakuuna (*Artemisia dracunculus*). Venäjänjuuren (*Acanthopanax senticosus*) siementen itävyys on yleensä ollut huono, ja vaihdon kautta ei ole ollut mahdollista saada suuria määriä siemeniä. Kenttäkokeisiin tarvittavien kasvien kasvattaminen on täten ollut ongelmallista. Venäjänjuuren lisäyksessä on kokeiltu mm. meristeemiviljelyä ja kallus-solukon erilaistamista taimiksi. Lupaavimmaksi menetelmäksi venäjänjuuren lisäyksessä on osoittautunut somaattisen embryogeneesin indusoiminen siemenistä. Pyöreälehtikihokin (*Drosera rotundifolia*) tutkimuksissa tavoitteena on löytää sellaiset kannat ja kasvatusolosuhteet, joissa tiettyjen sekundaärimetaboliittien tuotanto on tehokkainta. Viljelyä testataan tarkoitusta varten rakennetuissa kasvatusaltaissa. Solukkoviljelykokeissa on testattu eri alkuperää olevien kasvien siementen itämiskykyä sekä ravinteiden ja valon vaikutusta kasvuun ja 7-metyyljuglonin tuotantoon.

*Avainsanat:* juurrutus, kallus, meristeemiviljely, regeneraatio, rohdoskasvit, somaattinen embryogeneesi, yrtyt

# Abstract

## Tissue culture in the POHERIKA - special crops of the north - project. Micropropagation of sundew, Russian ginseng and French tarragon

Terttu Kämäräinen

Botanical Gardens, University of Oulu, P. O. BOX 333, FIN-90571 Oulu

e-mail: [mtk@sun3.oulu.fi](mailto:mtk@sun3.oulu.fi)

POHERIKA -project deals with herb and medicinal plant cultivation, product processing, quality refining and marketing in northern Finland. Research is mainly done by different departments and laboratories at the University of Oulu. Also MTT and some herb producers are participating in the project. The role of the Botanical Gardens in the project is to search for and select new plant species and provenances for the project, and to develop cultivation methods for the chosen plant species. Micropropagation is used for multiplication of some plants and provenances which would otherwise be difficult to propagate. French tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) does not produce viable seeds and micropropagation has proven to be the fastest and the most efficient way for its propagation. Russian ginseng (*Acanthopanax senticosus* Rupr. & Maxim. ex Maxim. Harms.) seed material is rare in Finland and the germination of seeds is poor. The most promising method so far examined for its propagation is induction of somatic embryogenesis from seeds. Sundew (*Drosera rotundifolia* L.) produces some medically valuable secondary products. Selection of populations for cultivation is based on the capacity of different populations to grow and produce these compounds. The effect of nutrients (especially nitrogen compounds) on growth and production of secondary metabolites is tested *in vitro*.

*Key words:* callus, herbs, medicinal plants, meristem culture, regeneration, rooting, somatic embryogenesis



## Johdanto

POHERIKA-projektissa tavoitteena on löytää uusia hyödynnettäviä yrtti- ja rohdoskasveja sekä tehostaa nykyisten viljelyä, jatkojalostusta ja kauppaa. Projektissa on mukana tutkijoita Oulun yliopiston eri laitoksilta ja osastoilta, mm. kemian laitokselta, prosessiteknikan- ja kone-tekniikan osastolta sekä teollisuustalouden ja yrittäjyyden yksiköstä. Hankkeessa on mukana myös Maatalouden tutkimuskeskuksen tutkimusasemia ja yrtyrittäjiä. Oulun yliopiston kasvitieteellisen puutarhan tehtävä on etsiä ja kartoittaa uusia potentiaalisia viljelyyn sopivia yrtti- ja rohdoskasveja, testata eri lisäysmenetelmiä ja valita tutkituista kasvilajeista viljelyyn parhaiten sopivia kantoja. Lisäksi kasvitieteellisen puutarhan solukkoviljelylaboratoriossa tuotetaan tutkimusmateriaalia muille hankkeessa mukana oleville tahoille. Käsittelen tässä kolmea projektin kannalta tärkeää lajia: rakuunaa (*Artemisia dracuncululus* L.), venäjänjuurta (*Acanthopanax senticosus* Rupr. & Maxim. ex Maxim. Harms.) ja pyöreälehtikihokkia (*Drosera rotundifolia* L.).

Rakuunasta on olemassa kaksi toisistaan poikkeavaa viljelymuotoa: venäläinen ja ranskalainen. Ne eroavat toisistaan mm. aromi-ainekoostumuksen ja talvenkestävyyden suhteen. Ranskalainen rakuuna ei tuota itämiskykyistä siementä, joten sen lisäykseen on perinteisesti käytetty pistokkaita. Solukkoviljely on osoittautunut tehokkaimmaksi tavaksi lisätä tätä lajia.

Venäjänjuuri muistuttaa rohdosominaisuuksiltaan paljon ginseng-juurta (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Oulun yliopiston kasvitieteellisessä puutarhassa on kasvatettu venäjänjuuria avomaalla ja talvehtiminen on onnistunut kohtalaisen hyvin. Vanhimmat talvehtineet yksilöt ovat yli 10-vuotiaita. Lajilla voi siis olla menestymisedellytyksiä myös Pohjois-Suomessa. Venäjänjuuren lisäyksessä ongelmana on ollut Suomessa suhteellisen tuntemattoman lajin siemenmateriaalin heikko saatavuus.

Kihokkeja käytetään raaka-aineena mm. yskänlääkkeisiin. Suomessa luonnonvaraisena kasvavan pyöreälehtikihokin lisäksi keskieu-rooppalaiset lääketehaat käyttävät muita lajeja, esim. *D. madagascariensis*, jota viedään Mada-

gaskarilta arviolta 3-10 tonnia vuosittain (Kirch 1995). Suomessa luonnosta kerättyjen kasvien myynti on viimeaikoina ollut n. 400-1000 kg/vuosi. Pyöreälehtikihokin tutkimuksessa päämääränä on löytää parhaimmat kannat ja sellaiset kasvatusolosuhteet, joissa kihokit kasvavat parhaiten ja niiden tuottamien tiettyjen sekundäärimetaboliittien pitoisuudet ovat korkeimmat.

## Aineisto ja menetelmät

Ranskalaisesta rakuunasta on kasvitieteellisellä puutarhalla lisäyksessä kolme eri alkuperää. Rakuunan mikrolisäys aloitetaan kevättalvella kasvihuoneessa talvehtineiden, kasvun aloittaneiden kasvien versojen kärjistä. Lisäysalustoina käytetään MS-pohjaisia alustoja (Murashige & Skoog 1962). Juurrutukseen käytetään vähemmän ravinteita sisältäviä WPM-pohjaisia alustoja (Lloyd & McCown 1980).

Venäjänjuurta on lisätty idättämällä puutarhalla kasvavien kasvien siemeniä tai siemen- vaihdon kautta saatuja siemeniä perinteisesti hiekkaturveseoksessa. Myös pistokaslisäystä on testattu. Mikrolisäysmenetelmistä on kehitetty mm. meristeemiviljelyä. Viljely on aloitettu aikaisin keväällä avautumattomista silmuista. Kallussolukon indusointia on testattu käyttämällä lehtiä ja eri-ikäisiä verson osia aloitusmateriaalina. Siemenistä aloitetussa mikrolisäyksessä tulokset ovat olleet lupaavimpia. Siementen itämistä on nopeutettu gibberelliini- ( $GA_3$ ) ja kinetiinikäsittelyillä (Isoda & Shoji 1989). Somaattista embryogeneesiä on indusoitu siemenistä 2,4-D:tä (2,4-dikloorifenoksietikkahappo) sisältävällä alustalla pimeässä (Gui *et al.* 1991).

Solukkoviljelyä käytetään kihokin tutkimuksessa testattaessa ravinteiden vaikutusta kihokin kasvuun ja sekundäärimetaboliittien tuotantoon. Kihokin mikrolisäys aloitetaan joko siemenistä tai talvehtimissilmuista. Kontaminaatoriski on hyvin suuri, kun talvehtimissilmuja käytetään aloitusmateriaalina (Anthony 1992). Hyvin pohjoisilla kihokkikannoilla siementen käyttö ei ole mahdollista, koska kasvit eivät ainakaan kaikkina kesinä tuota itä-

miskykyistä siementä. Solukkoviljelyssä on testattu orgaanisen ja epäorgaanisen tyypin vaikutusta kasvuun ja 7-metyylijuglonin tuottoon. Solukkoviljelyä on käytetty myös eri kantojen siementen itämisen testaukseen. Parhaaksi osoittautuneilla kannoilla on mikrolisäyksellä tuotettu materiaalia kokeisiin, joissa on testattu eri kasvualustojen (hiekkaturve, raakaturve ja lannoitettu turve) vaikutusta kihokkien kasvuun kasvihuoneolosuhteissa ja avomaalla. Osa parhaista kannoista on siirretty *in vivo* - kylmäsäilytykseen.

## Tulokset

Ranskalainen rakuuna versoo testaamistamme MS-pohjaisista lisäsalusosista parhaiten MH-alustalla (Haapala & Niskanen 1992). Juurrutukseen sopivimmaksi on havaittu WPM-pohjainen YÖ-alusta (Haapala & Niskanen 1992), jolla juurrutus on onnistunut erinomaisesti. Samoin sopeutuminen *in vivo* -olosuhteisiin on onnistunut hyvin.

Venäjänjuuren havaittiin itävän n. 10 kk:n kuluttua kylvöstä hiekka-turveseokseen. Itävyys oli hyvin heikkoa. Pistokaslisäys ei osoittautunut käyttökelpoiseksi lisäysmenetelmäksi, sillä keväällä otetut pistokkaat eivät muodostaneet juuria. Solukkoviljely ei onnistunut toivotulla tavalla. Versominen oli heikkoa ja taimet kuolivat lopulta. Kallussolukon indusointi ja solukon erilaistaminen taimiksi ei myöskään onnistunut. Kallussolukon todettiin indusoituvan parhaiten puutumattomista saman vuoden versoista, mutta kallusta ei onnistuttu erilaistamaan. Parhaat tulokset saatiin idättämällä siemeniä. Tähänasti testatuista puutarhalla kasvavien venäjänjuurten siemenistä n. 3 % muodosti somaattisia alkioita. Alkioista erilaistui taimia, kun ne siirrettiin valoon ja hormonitomalle MS-alustalle. Taimia koulittaessa hävikki oli suurta. Vain n. 10 % voitiin siirtää avomaalle.

Pyöreälehtikihokin solukkoviljelyssä on kantojen välisiä eroja siementen tuotossa, kasvunopeudessa ja 7-metyylijuglonin synteesissä. Kahteen viimeksimainittuun seikkaan vaikut-

tavat myös käytetyn kasvualustan tyyppiyhdisteiden laatu ja pitoisuus.

## Tulosten tarkastelu

Ranskalaisen rakuunan mikrolisäys on sujunut ongelmitta. Rakuunaa on lisätty tutkimus- ja koekäyttöön, sekä alueen viljelijöille. Rajoituksia lisäykseen aiheuttaa lähinnä koulimisvaiheessa tarvittava kasvihuonetilä. Nyt lisätty rakuuna on osoittautunut talvenkestäväksi ja hyväkasvuiseksi myös Pohjois-Suomen olosuhteissa. Rakuunasta on mahdollista kerätä kaksi satoa toisena kasvukautena, jolloin parhaat kasviyksilöt ovat tuottaneet yhteensä yli kilon tuoresatoa. Kasvitauteja ei ole esiintynyt eikä tuholaisista ole ollut mainittavaa haittaa. Helposti lisättävän rakuunan ongelma on vielä se, että toistaiseksi viljelijöille toimitetut rakuunat ovat kaikki samaa alkuperää. Jos viljelmille leviää syystä tai toisesta kasvitauti tai tuholainen, on vaarana kaikkien kasvien saastuminen tai tuhoutuminen. Tätä riskiä pyritään pienentämään ottamalla lisäykseen uusia eri alkuperää olevia kasveja.

Ranskalaisen rakuunan peltoviljelykokeet on siirretty MTT:n tutkimusasemalle Ruukiin. Ranskalaisen rakuunan solukkolisäyksellä pystytään tuottamaan viljelyyn kasvimateriaalia, jonka saatavuus viljelijöiden keskuudessa on muuten ollut heikkoa. Solukkolisäys on suhteellinen kallista, joten sen käyttö on perusteltua vain emokasvimateriaalin tuotannossa viljelijöille.

Rakuunaan verrattuna venäjänjuuren mikrolisäysmenetelmien testaus ja kehittäminen etenee hitaasti. Toistaiseksi on onnistuttu kasvattamaan n. 45 tainta kenttäkokeisiin. Tavoitteen -venäjänjuuren peltoviljelyn yleistymisen - saavuttamiseen tulee kulumaan huomattavasti pitempi aika kuin muilla tutkittavilla lajeilla. Vastaavasti venäjänjuuren viljelyssä voidaan päästä suurempiin rahallisiin tuottoihin.

Kihokin mikrolisäystä käytetään eri alkuperää olevien kasvien ominaisuuksien tutkimiseen. Sillä tuetaan muuta tutkimusta, mutta se ei ole taloudellisesti kannattavaa.

# Kirjallisuus

---

**Anthony, J. L.** 1992. *In vitro* propagation of *Drosera* spp. Horticultural Science 27: 850.

**Gui, Y., Guo, Z., Ke, S. & Skirvin, R. M.** 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus*. Plant Cell Reports 9: 514–516.

**Haapala, T. & Niskanen, A.-M.** 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. VAPK-kustannus 93 p. ISBN 951-37-0933-7

**Isoda, S. & Shoji, J.** 1989. Studies on the cultivation of *Eleutherococcus senticosus* Maxim. On the after ripening and breaking dormancy. Shoyakugaku Zasshi 43: 71–77.

**Kirch, C.** 1995. Problematik bei der Beschaffung von Drosera - Droge. Esitelmäabstrakti Drosera-Workshop, 10.11.1995 Wien.

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

**Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497.

# Kauran kaksoishaploidien tuotto- menetelmän kehittäminen

---

Elina Kiviharju

MTT, Kasvintuotannon tutkimuslaitos, Kasvinjalostuksen tutkimusala, 31600 Jokioinen  
e-mail: elina.kiviharju@mtt.fi

Kaura (*Avena sativa* L.) tuottaa Suomessa määrällisesti ja laadullisesti hyvän sadon ja on oloissamme viljelyvarma. Tuotantokustannuksia voidaan edelleen alentaa lajikkeenjalostuksella. Uusien lajikkeiden jalostusta on mahdollista nopeuttaa ja tehostaa käyttämällä hyväksi kaksoishaploideja. Tehokkain kaksoishaploidien tuottotapa on ponsi/mikrosporiviljely. Kaksoishaploidien tuotto ponsiviljelyllä onnistuu monilla viljakasveilla mm. ohralla ja vehnällä. Kauran ponsiviljely on kuitenkin osoittautunut ongelmalliseksi: kaikenkaikkiaan vain kolme tainta on onnistuttu erilaistamaan (Rines 1983). Lisäksi kuorettomalla kauralla (*A. nuda* L.) on raportoitu taimien tuotto alhaisella frekvenssillä (Sun *et al.* 1991). Tässä tutkimuksessa kauran ponsiviljelymenetelmää on pyritty kehittämään lähtökohtana ponsiviljelyssä toimivilla viljakasveilla saadut tulokset. Kuten muillakin viljalajeilla, genotyyppi vaikutti kauran ponsiviljelyvasteeseen: 31 genotyyppiä 45:stä tuotti induktioalustalla joko alkiorakenteita tai kallusta. Androgeneesin hormonaalinen säätely osoittautui monimutkaiseksi verrattuna muilla yksisirkkaisilla saatuihin tuloksiin. Alkiotuottoon voitiin vaikuttaa myös emokasveihin ja eristettyihin heteen ponsiin kohdistetuilla stressi-käsittelyillä. Taimia ei kauran ponsiviljelmistä ole onnistuttu erilaistamaan huolimatta testigenotyyppien korkeasta alkiorakenteiden tuotosta. Alkioiden kehitys pysähtyy varhaisessa vaiheessa. Sensijaan lähisukulaisen, villikauran (*A. sterilis*) linja tuotti toistettavasti taimia, joskin alhaisella frekvenssillä. Lisätutkimuksia vaaditaan kauran ponsiviljelyllä tuotettujen alkioiden erilaistamisongelmien selvittämiseksi.

*Avainsanat:* albiino, androgeneesi, *Avena sativa*, gameettinen embryogeneesi, kallus, mikrospori, ponsiviljely, regeneraatio

# Abstract

## Developing a method for producing doubled haploids of oats

Elina Kiviharju

*Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Crop and Soil Science,  
Plant Breeding Section, FIN-31600 Jokioinen  
e-mail: elina.kiviharju@mtt.fi*

In our northern conditions, oat (*Avena sativa* L.) has good productivity and high quality yield. Production costs can still be lowered by efficient plant breeding. Plant biotechnology provides new tools for plant breeders. Use of doubled haploids in a breeding programme can speed up and increase the efficiency of cultivar breeding. Anther culture can be considered to be the most productive method to produce doubled haploids. Although doubled haploids can be produced efficiently by anther culture in many cereals, oat has proved to be recalcitrant: only three anther-derived plants have been reported (Rines 1983). In addition, naked oat (*A. nuda* L.) has been reported to produce regenerants in low frequency (Sun *et al.* 1991). In our study we have aimed at developing a method to produce doubled haploids via anther culture based on the methods used for other cereal species. Anther culture response of oat is very dependent on genotype: 31/45 genotypes produced callus or embryo-structures in induction culture. Hormonal regulation has proved to be complicated compared with other monocotyledonous species. Temperature treatments for isolated anthers or tillers, as well as some stress treatments for donor plants, have had a positive effect on production of anther-derived embryos. The problem is that the development of anther-derived embryo-structures is arrested at early stages resulting in no plant regeneration in cultivated oat. A closely related species, *Avena sterilis* L., has in our experiments regenerated plants consistently at low frequencies. More research is needed to understand the nature of the regeneration problems of anther-derived embryos of oat.

*Key words:* albino, androgenesis, anther culture, *Avena sativa*, callus, gametic embryogenesis, microspore, regeneration

# Johdanto

## Kauran merkitys Suomen maataloudessa

Kaura (*Avena sativa* L.) on viljelypinta-alan ja sadon määrän perusteella arvioituna ohran jälkeen Suomen toiseksi tärkein viljakasvi. Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskuksen mukaan kauran viljelypinta-ala vuonna 1995 oli 329 000 hehtaaria ja sato 1 097 miljoonaa kiloa. Suomi on täten kansainvälisesti merkittävä kaurantuottaja. Kaura on hyvin sopeutunut Suomen olosuhteisiin ja viljelyvarma. Se tuottaa meillä määrällisesti ja laadullisesti hyvän sadon. Suurin osa kaurasta menee rehukäyttöön, mutta kiinnostus kauraa kohtaan myös elintarvikkeena on lisääntynyt sen terveellisyden vuoksi. Tuotantokustannuksia voidaan edelleen alentaa tehokkaalla lajikkeenjalostuksella vaikuttamalla mm. aikaisuuteen, korrenlujuuteen, taudinkestävyyteen ja sadon määrään. Biotekniikka tarjoaa uusia välineitä kasvinjalostuksen avuksi. Erityisesti kaksoishaploidien käyttäminen jalostuksessa nopeuttaisi huomattavasti uusien lajikkeiden tuottamista.

## Mitä kaksoishaploidit ovat?

Kaksoishaploidit ovat kasveja, joiden ainoastaan toisesta sukusolusta peräisin oleva haploidi perimä on kahdentunut joko spontaanisti tai kemikaalien vaikutuksesta. Siten kaksoishaploideilla on diploidin kasvin kromosomiluku. Kaksoishaploidit kasvit ovat fertiilejä ja täysin homotsygoottisia. Kaksoishaploideja voidaan tuottaa joko viljelemällä heteiden ponsia, niistä eristettyjä mikrosproreja (siitepölyhiukkasen esiaste) tai munasolun sisältäviä emejä. Kaksoishaploidien tuotto onnistuu myös etäristeytysten kautta. Esimerkiksi ohran (*Hordeum vulgare* L.) kaksoishaploidituotossa on käytetty *Hordeum bulbosum* L. risteytyksiä (Kasha & Kao 1970), vehnällä (*Triticum aestivum* L.) ja kauralla maissiristeytyksiä (*Zea mays*

L.) (Laurie *et al.* 1990, Rines & Dahleen 1990). Etäristeytyksissä vieras siitepöly saa aikaan alkionkehityksen alkamisen, mutta sen kromosomit eliminoiduvat jatkossa. Kehittyvän alkion kromosomit kahdentuvat spontaanisti tai muodostuneen haploidin taimen perimä kahdennetaan antimitoottisilla aineilla, joista tavallisin on kolkisiini. Lisäksi haploideja taimia on tuotettu ohralla ns. *Hap*-geeniä hyödyntämällä (Hagberg & Hagberg 1981). Tehokkaimmin kaksoishaploideja voidaan tuottaa ponsi- tai mikrosporiviljelyllä edellyttäen, että menetelmä kyseisellä kasvilajilla on pystytty kehittämään riittävän toimivaksi.

## Mihin kaksoishaploideja voidaan käyttää?

Kaksoishaploideja voidaan käyttää suoraan lajikkeenjalostusmateriaalina jalostusohjelmien eri vaiheissa. Kaksoishaploidit ovat myös ainutlaatuista geneettistä aineistoa sekä klassisen kvantitatiivisen genetiikan tutkimukselle että uusinta molekyylibiologiaa soveltavalle kasvinjalostustutkimukselle. Kaksoishaploidimenetelmä lisää myös valmiuksia tuoda uutta muuntelua jalostusaineistoon bioteknisin keinoin.

Kasvinjalostusta tehostava vaikutus perustuu pääosin siihen, että heterotsygoottisesta jalostusjälkeläistöstä voidaan tuottaa yhdessä sukupolvessa täysin homotsygootteja linjoja. Tämän avulla voidaan parhaassa tapauksessa nopeuttaa lajikkeenjalostusta 4-6 vuodella. Suurin hyöty kaksoishaploideista saavutetaan itsepölytteisillä viljoilla, kuten ohralla, vehnällä ja kauralla, joissa savutettu homotsygotia pysyy - toisin kuin ristipölytteisillä lajeilla. Kaksoishaploidijälkeläistöissä myös additiivinen geneettinen muuntelu on suurempaa kuin heterotsygoottisissa risteytysjälkeläistöissä (Choo *et al.* 1985, Snape 1989), koska puhtaat linjat voidaan tuottaa ilman ympäristön jatkuvaa valitsevaa vaikutusta. Yksisirkkaisilla lajeilla lajikkeita on tuotettu haploidiajalostusta hyväksikäyttäen ohralla (Kuhlmann & Foroughi-Wehr 1989, Ho & Jones 1980), vehnällä (Pauk *et al.* 1995, de Buyser *et al.* 1987) ja riisillä (*Oryza sativa* L.) (Croughan *et al.* 1985).

# Kauran kaksoishaploiditutkimus

## Yleistä

Vaikka somaattinen embryogeneesi toimii kaurallakin kohtuullisen hyvin (Chen *et al.* 1995, Gana *et al.* 1995, Bregitser *et al.* 1989), kaksoishaploidien tuotto ponsiviljelmissä on ollut ongelmallista: vain kolme tainta on raportoitu (Rines 1983). Lisäksi kuorettoman kauran (*A. nuda* L.) ponsiviljelmistä on julkaistu taimituotto alhaisella frekvenssillä (Sun *et al.* 1991). Kauran etäisristeytyksiä on tutkittu 1990-luvulla ja haploideja/kaksoishaploideja taimia on onnistuttu tuottamaan toistettavasti käyttäen maissia pölyttäjänä. Tosin onnistumisprosentit ovat myös etäisristeytysten osalta olleet alhaisia (Rines & Dahleen 1990).

## Suuntaviivoja kauran kaksoihaploiditutkimuksesta MTT:llä

Kauran kaksoishaploiditutkimusta on MTT:n kasvinjalostuksen tutkimusosalalla tehty yhteistyössä Boreal Suomen Kasvinjalostuksen ja Helsingin yliopiston kasvintuotantotieteen laitoksen kanssa. Tavoitteena on ollut tuottaa uusi työkalu kauranjalostukselle ja siten tehostaa suomalaisen kauran lajikejalostusta. Kasvinjalostuksen tutkimusosalalla on perinteitä ponsiviljelyn kehittämisessä ohralla ja vehnällä, joilla kaksoishaploidituotto ponsiviljelyn kautta toimii hyvin. Lisäksi myös maailmalla vähän tutkittu ruis (*Secale cereale* L.) vaikuttaa lupaavalta.

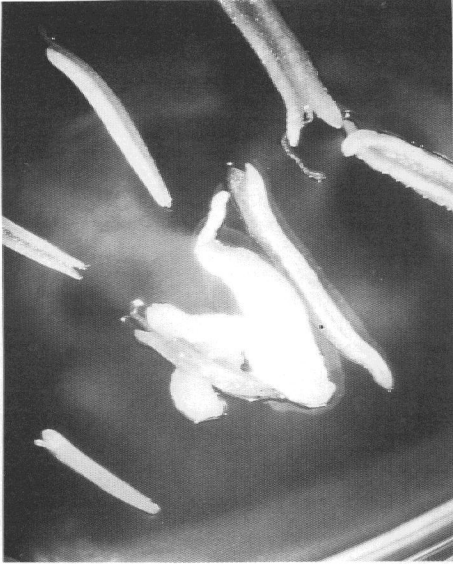
Kauratutkimuksissamme on keskitytty erityisesti heteen ponsien viljelyyn, mutta myös mikrosporiviljelyä on sovellettu. Erilaisten androgeneesiin vaikuttavien tekijöiden osuutta kauran ponsiviljelyvasteeseen tutkittiin systemaattisesti tukeutuen muilla viljakasveilla saattuihin tuloksiin. Näitä tekijöitä ovat mm. genotyyppi, emokasvien kasvatusolosuhteet, kas-

vatusalustan koostumus (ravinteet, energialähde, hormonit) sekä fysikaaliset tekijät.

Kuten muillakin viljalajeilla, genotyyppi vaikutti kauran ponsiviljelyvasteeseen. Genotyyppiä testattiin 45. Näistä vastetta induktioalustalla tuotti kaikenkaikkiaan 31, joista puolestaan vain 8 tuotti alkiorakenteita (Kiviharju *et al.* 1996) (Kuva 1). Taimia ei viljellyllä kauralla kuitenkaan ole alkioituotosta huolimatta pystytty regeneroimaan. Kauran lähisukulaislinjalla (*Avena sterilis* L.) sensijaan ponsiviljelyllä tuotetuista alkiosta kyettiin toistettavasti erilaistamaan taimia (Kiviharju *et al.* 1995) (Kuva 2). Kyseistä linjaa käytettiin myöhemmin mallina kuvaamaan mahdollista *Avena*-suvun ponsiviljelykäyttäytymistä suhteessa eri tekijöihin. Koska *A. sativa* ja *A. sterilis* ovat molemmat heksaploideja ja niillä on sama kromosomiluku, ne kykenevät risteytymään keskenään. Regeneroitumisominaisuuden siirtäminen risteyttämällä *A. sterilis* x *A. sativa* -jälkeläistöön näyttäisi alustavien tulosten mukaan olevan mahdollista.

Yleensä ponsiviljelyssä alkioituotto indusoidaan auksiiniin läsnäollessa ja taimien regeneroituminen saadaan aikaan alentamalla auksiinipitoisuutta tai poistamalla auksiini kokonaan. Kauran ponsiviljelyn hormonaalinen säätely poikkeaa muista viljakasveista. Yleensä hyväksi havaituilla auksiinipitoisuuksilla ei ole saatu kauralla androgeneesiä laukaisevaa vaikutusta. Kauran ponsiviljelyssä on myös julkaistu vahva auksiini-inhibitio (Rines 1983). Tulokset ovat kuitenkin hieman ristiriitaisia, sillä toistaiseksi ainoa taimien erilaistuminen kauralla on saatu aikaan 2,4-D (2,4-dikloorifenoksietikkahappo) -induktiolla (Rines 1983). Tutkimuksissamme toisen tärkeän morfogeneesiä säätelevän hormonin, sytokiniinin, lisäys ruskettaa heteen ponnet nopeasti. Aineistosta tehdyn *Pro gradu* -tutkielman mukaan hyvin korkeat auksiinipitoisuudet kuitenkin edistävät alkioiden indusoitumista ponsiviljelmistä (Tauriainen & Kiviharju 1996).

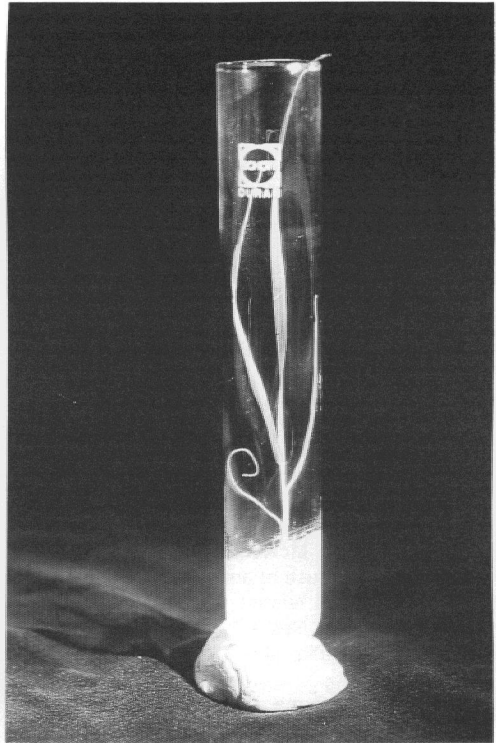
Emokasvien kasvatusolosuhteiden havaittiin vaikuttavan ponsiviljelmien alkiontuotto-kykyyn. Kokeissamme stressiolosuhteet kuten kuivuus ja alhainen typpilannoitus edistivät alkioituottoa. Kylmäkäsitellyt versoille ja lämpökäsitellyt eristetyille ponsille edistivät alkio-



**Kuva 1.** *Avena sterilis* -lajin ponsiviljelyssä tuotettu alkio

tuottoa niinikään (parhaimmillaan jopa satoja alkioita sataa viljeltyä heteen pontta kohti) sekä *A. sativalla* että *A. sterilisillä* (Kiviharju & Pehu 1996).

Vaikka alkioita saadaan muodostumaan viljellyn kauran ponsiviljelmistä, ongelmana on alkioiden erilaistaminen taimiksi. Vuonna 1996 yli 7000 kauran ponsiviljelyssä tuotettua alkioita siirrettiin erilaistumalustoille (137 erilaistumalustaa tai -käsittelyä), mutta yksikään taimi ei erilaistunut. Villikauralla (*A. sterilis*) taimien tuotto onnistuu toistettavasti, joskin alhaisella frekvenssillä. Villikauran versoista vajaa kolmannes on albiinoja, vihreistä taimista noin kaksi kolmannesta haploideja ja yksi kolmannes spontaanisti kaksoishaploideja.



**Kuva 2.** *Avena sterilis* -lajin ponsiviljelyssä regeneroitu taimi

## Yhteenveto

Kauran kaksoishaploidituotto ponsiviljelyn kautta vaatii vielä kehittämistä. Alkiorakenteiden tuotto ponsiviljelmistä valikoiduilla genotyypeillä onnistuu toistettavasti jopa suhteellisen hyvällä frekvenssillä. Alkioiden kehittyminen pysähtyy kuitenkin varhaisessa vaiheessa. Erityistä panostusta tarvitaan alkioiden regeneroitumisongelmien ratkaisemiseksi. Malligenotyyppinä käyttämämme, helpommin regeneroituva villilaji *A. sterilis* on tuonut arvokasta lisätietoa kauran käyttäytymisestä ponsiviljelyssä.



# Kirjallisuus

- Bregitsner, P., Somers, D. A. & Rines, H. W.** 1989. Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. *Crop Science* 29: 798–803.
- Buyser, J. de, Henry, Y., Lonnet, P., Herzog, R. & Hespel, A.** 1987. 'Florin': a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding* 98: 53–56.
- Chen, Z., Zhuge, Q. & Sundqvist, C.** 1995. Oat leaf base: tissue with an efficient regeneration capacity. *Plant Cell Reports* 14: 354–358.
- Choo, T. M., Reinbergs, E. & Kasha, K. J.** 1985. Use of haploids in breeding barley. *Plant Breeding Reviews* 3: 219–252.
- Croughan, T. P., McKenzie, K. S. & Pizzolatto, M. M.** 1985. The use of anther culture to expedite the breeding and release of new variety of rice. Annual Progress Report, Louisiana, Agricultural Experimental Station, No. 77: 64–65.
- Gana, J. A., Sharma, G. C., Zipf, A., Saha, S., Roberts, J. & Wesenberg, D. M.** 1995. Genotype effect on plant regeneration in callus and suspension cultures of *Avena*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 217–224.
- Hagberg, G. & Hagberg, A.** 1981. Haploidy initiator gene in barley. In: *Barley genetics IV*. Edinburg: University Press. p. 686–689. ISBN 0-9508016-0-7
- Ho, K. M. & Jones, G. E.** 1980. Mingo barley. *Canadian Journal of Plant Science* 60: 279–280.
- Kasha, K. J. & Kao, K. N.** 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874–876.
- Kiviharju, E., Puolimatka, M., Saastamoinen, M., Hovinen, S., Pehu, E. & Pulli, S.** 1995. Plant regeneration through anther culture of *Avena sterilis* L. In: Raatikainen, M. (ed.). Abstracts, Adaptation in plant breeding. XIV EUCARPIA Congress, Jyväskylä, Finland, July 31 - August 4, 1996. Jyväskylä: University of Jyväskylä. p. 101. ISBN 951-34-0570-2
- Kiviharju, E. & Pehu E.** 1996. The effect of heat pretreatment on anther culture response of cultivated and wild oat. In: Xu, Z.-H., An, X.-P., Sun, Y.-R., Jia, S.-R., Zhu, Z.-Q. & Chen, Z.-H. (eds). Plant biotechnology for sustainable development of agriculture. Abstract. 2nd Asia-Pasific Conference of Plant Cell and Tissue Culture, July 28-Aug. 1, Beijing, China, p. 49: III–7.
- Kuhlmann, U. & Foroughi-Wehr, B.** 1989. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Reports* 8: 78–81.
- Laurie, D. A., O'Donoghue, L. S. & Bennett, M. D.** 1990. Wheat x maize and other wide sexual hybrids: Their potential for genetic manipulation and crop improvement. In: Gustafson, J. P. (ed.). Gene manipulation in plant improvement II. Proceedings of the 19th Stadler Genetics Symposium, Columbia, Missouri, USA, March 13–15 1989. New York: Plenum Press, p. 95-125. ISBN 0-306-43595-0
- Pauk, J., Kertesz, Z., Beke, B., Bona, L., Csösz, M. & Matuz, J.** 1995. New winter wheat variety: 'GK Délibáb' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. *Cereal Research Communications* 23: 251–256.
- Rines, H. W.** 1983. Oat anther culture: Genotype effects on callus initiation and the production of a haploid plant. *Crop Science* 23: 268–272.
- Rines, H. W. & Dahleen, L. S.** 1990. Haploid oat plants produced by application of maize pollen to emasculated oat florets. *Crop Science* 30: 1073–1078.
- Snape, J. W.** 1989. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. In: Mujeeb-Kazi, A. & Sitch, L. A. (eds). Review of advances in plant biotechnology, 1985-88: 2nd International Symposium on Genetic Manipulation in Crops. Mexico, D.F., Mexico and Manila, Philippines: CIMMYT and IRRI. p. 19–30. ISBN 968-6127-34-8
- Sun, J.-S., Lu, T. G. & Söndahl, N. R.** 1991. Anther culture of naked oat and the establishment of its haploid suspension cell. *Acta Botanica Sinica* 33: 417–420.
- Tauriainen, A. & Kiviharju, E.** 1996. Effect of 2,4-D and kinetin on cultivated and wild oat androgenesis. Abstract, *Hereditas* 124: 285–299, p. 298.

# Onko rukiista kaksoishaploidiksi?

---

Sirkka Immonen

MTT, Kasvintuotannon tutkimuslaitos, Kasvinjalostuksen tutkimusala, 31600 Jokioinen  
e-mail: sirkka.immonen@mtt.fi

Ponsiviljelyä voidaan käyttää kasvinjalostuksessa ja siihen liittyvässä tutkimuksessa tuottamaan täysin homotsygootteja, kaksoishaploideja kasveja ja nopeuttamaan sekä täsmentämään valintaa. Ristipölytteisillä kasveilla, kuten rukiilla (*Secale cereale* L.), kaksoishaploidiaa voitaisiin käyttää valinnan tehostamiseksi useassa peräkkäisessä risteytyskuviossa tai jalostettaessa synteettisiä ja hybridilajikkeita. Rukiin ponsiviljelyprojektissa etsittiin aluksi ponsiviljelyvasteeltaan hyviä linjoja sekä kevät- että syysruismateriaalista. Kokeissa käytettäväksi löytyi kaksi suomalaista kevätruuslinjaa 'Jo 02' ja 'Hännilä', joiden kalluksentuottokyky oli hyvä, ja erityisesti linjalla 'Jo 02' oli poikkeuksellisen hyvä vihreiden kasvien regeneraatiokyky. Eri kokeissa saimme aikaan suurimman lisäyksen kalluksen tuotannossa ja vihreiden kasvien regeneraatiossa optimoimalla seuraavia seikkoja: 1) kylmäsäätelyn kesto, 2) mikrosporien kehitysvaihe, 3) ilmatila kasvatusmaljalla, 4) induktioalustan olomuoto ja 5) kasvatusalustojen koostumus. Kun testasimme menetelmää, jossa em. seikkoja on tulosten pohjalta optimoitu, ja vertasimme tuloksia projektin alussa käyttämäämme, muiden julkaisemiin tuloksiin perustuvaan menetelmään (testimateriaalina 20 syysruuslinjaa), havaitsimme lisäystä sekä ponsivasteessa että vihreiden kasvien regeneraatiossa. Onnistuimme nostamaan vihreiden kasvien saantoa yleisesti (2,7 vihreää kasvia/100 pontta vs. 0,6/100) ja vihreiden kasvien määrää suhteessa albiinoiden määrään (25,1 % vs. 16,3 %). Tulokset mahdollistavat menetelmän sovelluskokeen oikeassa jalostustilanteessa lyhytkortisten ruispopulaatioiden luomiseksi.

*Avainsanat:* albiino, androgeneesi, Ficoll, gameettinen embryogeneesi, kylmäsäätely, mikrospori, ponsiviljely, regeneraatio, *Secale cereale*

# Abstract

## Is rye suited for doubled haploidy?

Sirkka Immonen

*Agricultural Research Centre of Finland, Institute Crop and Soil Science,  
Plant Breeding Section, FIN-31600 Jokioinen  
e-mail: sirkka.immonen@mtt.fi*

Via anther culture completely homozygous doubled haploids can be produced for use in plant breeding and related research. With cross breeding species, such as rye (*Secale cereale* L.), doubled haploids could be used in several recurrent selection cycles to improve selection efficiency or in breeding synthetic and hybrid varieties. In the rye anther culture project both winter and spring rye material was initially tested for identifying lines with good anther culture ability. Two Finnish spring rye lines, 'Jo 02' and 'Hännilä' were chosen for further experiments. These lines have high anther response and the line 'Jo 02' has exceptionally good green plant regeneration ability. In various experiments we observed that the following factors affected callus production and green plant regeneration most: 1) duration of cold pretreatment, 2) microspore developmental stage, 3) gas space in the culture vessel, 4) medium phase, 5) components of the media. We tested an optimised method on 20 winter ryes and compared the results with the initial results obtained using a method based on rye anther culture publications. We have managed to increase green plant yield in general (2.7 green plants/100 anthers vs. 0.6/100) and the proportion of green plants (25.1 % vs. 16.3 %). The results enable us to test the method in a real breeding situation for developing rye populations of reduced height.

*Key words:* albino, androgenesis, anther culture, cold pretreatment, Ficoll, gametic embryogenesis, microspore, regeneration, *Secale cereale*

# Johdanto

Suomessa rukiinjalostus (viljelty ruis, *Secale cereale* L.) on populaatiojalostusta, jossa pyritään yhdistämään korkea sato ja riittävä talvenkestävyys lyhyempään korteen kuin nykyisten lajikkeiden korsi. Korrenpituuteen voidaan vaikuttaa käyttämällä jalostuksessa mutantteja kääpiörükiä, joista yleisimmin käytetyssä EM 1 mutantissa on dominantti kääpiökasvugeeni (Korzun *et al.* 1996). Dominantin geenin haittapuolena ovat sukupolvesta toiseen segregaat-ion kautta esille tulevat pitkäkortiset resessiiviset homotsygotit. Kaksoishaploidien käyttö saattaisi edistää mm. lyhytkortisuuden tai muun yksinkertaisesti periytyvän ominaisuuden jalostamista, jos valinta voidaan suorittaa riittävällä tarkkuudella halutunlaisten risteytyspopulaatioiden muodostamiseksi. Toimivaa kaksoishaploidimenetelmää voitaisiin hyödyntää myös peräkkäisillä valintakierroksilla valintatehon parantamiseksi. Rukiin hybridijalostus on lisääntynyt mm. Keski-Euroopassa ja Ruotsissa. Tästä johtuen jalostajilla on kiinnostusta rukiin kaksoishaploidien käyttöön hybridivanhempien jalostuksessa (Wilde 1996).

Rukiin kaksoishaploidituotantoa on tutkittu viljelemällä ponsia (Wenzel & Thomas 1974, Flehinghaus *et al.* 1991, Daniel 1993, Flehinghaus-Roux *et al.* 1995) ja eristettyjä mikrosporeja (Thomas *et al.* 1975, Wenzel *et al.* 1975, Deimling *et al.* 1994) ja tekemällä etäristeytyksiä (ruis x maissi; Zenkteler & Nitsche 1984, Laurie *et al.* 1990). Useimmat tutkimukset, joita on ollut esim. ohraan (*Hordeum vulgare* L.) ja vehnään (*Triticum aestivum* L.) verrattuna vähän, ovat keskittyneet ponsiviljelyyn. Viljeltyä ruista pidetään vaikeana kasvina ja parhaat tulokset on saatu linjoilla, joiden perimässä on *Secale vavilovii* -lajia (Flehinghaus *et al.* 1991, Daniel 1993, Flehinghaus-Roux *et al.* 1995). Vieraiden lajien käyttö rukiin populaatiojalostuksessa saattaa kuitenkin olla ongelmallista, jos itsepölytytys ja sen seurauksena sisäsiitosdepressio lisääntyvät (Friedt *et al.* 1983). Maatalouden tutkimuskeskuksen rukiin ponsiviljelyprojektin tarkoituksena on luoda menetelmä, jolla vihreitä kaksoishaploideja

voidaan tuottaa jalostusprojektin kannalta riittäviä määriä mahdollisimman monista viljellyn rukiin genotyypeistä. Tutkimuksen alkuvaiheiden tuloksia on jo aiemmin julkaistu kongressijulkaisussa (Immonen 1996).

## Aineisto ja menetelmät

### Kasvimateriaali

Projektin alussa 1994 määritettiin eräänlainen lähtötaso testaamalla 20 syysruislinjaa (Taulukko 1), pääasiassa suomalaista jalostajan aineistoa, sekä kotimaisia ja muutamia ulkomaisia lajikkeita. Samoja linjoja käytettiin koetulosten perusteella optimoidun protokollan testaamiseen 1996. Hyvää ponsiviljelyvastetta etsittiin myös keväörükiä. Jalostaja T. Juuti (Boreal Suomen Kasvinjalostus) antoi käyttöömmekä sekä syys- että kevätruismateriaalia. Lisäksi käytimme kokeissa kääpiörüismutantteja (Snoopy-linjoja), jotka saimme kansainvälisestä vehnän- ja maissintutkimuslaitoksesta (CIMMYT), Meksikosta. Syysrukiit kasvatettiin 1994 pellolla ja 1996 kasvihuoneessa. Kevätruikiit kasvatettiin kasvihuoneessa. Tähtikivät versot kerättiin, kun tähkä oli juuri tulossa esiin lehtiupesta. Ponsien mikrosporit olivat tuolloin yksitumavaiheessa. Versoja säilytettiin vedessä +4 °C:ssa. Kokeesta riippuen versoja pidettiin eripituisia aikoja pimeässä paitsi kokeissa, joissa testattiin valon vaikutusta (16 h valoa/vrk). Nypintään valittiin tähkiä, joissa mikrosporit olivat myöhäisessä yksituma- tai varhaisessa kaksitumavaiheessa (lukuunottamatta mikrosporien kehitysvaiheita testaavassa kokeessa). Tähkät pintasteriloitiin 20 min 1,6 %:ssa natriumhypokloriitissa, johon oli lisätty n. 0,5 % Tween 80 -liuosta, ja huuhdeltiin viidesti steriilissä vedessä. Ponnit nypittiin kasvatusalustalle steriileihin petrimaljoihin (Ø 3,4 cm tai 5,4 cm), jotka suljettiin Parafilmillä. Pienemmille maljoille nypittiin 20 ja suuremmille 50 pontta satunnaisesti kierrättämällä maljoja nypinnän aikana. Kaikkiaan nypittiin 800 pontta jokaista käsittely x ruislinja -yhdistelmää kohden. Maljoja inkuboitiin +25 °C:ssa



kokeisiin valittiin 190-2. Kasvualustoissa käytettiin samaa vitamiinikoostumusta ja rautapitoisuutta kuin MS-alustassa sekä 2,4-dikloorifenoksietikkahappoa (2,4-D)  $9 \mu\text{M}$  ja kinetiiniä  $2,3 \mu\text{M}$ . Energianlähteenä käytettiin maltoosia (6-12 % kokeesta riippuen). Kiinteään alustaan käytettiin Phytageliä  $3 \text{ g/l}$ . Kokeissa kokeiltiin myös nestealustaa, johon lisättiin Ficoll 400:aa  $100 \text{ g/l}$ . Regeneraatioalustana käytettiin 190-2-alustaa tai MS-alustaa, jossa mikro- ja makrosuolojen pitoisuus oli puolitettu. Regeneraatioalustaan lisättiin  $\alpha$ -naftaleenietikkahappoa (NAA)  $0,27 \mu\text{M}$  ja  $\text{N}^6$ -bentsyyliadeniinia (BA)  $2,2 \mu\text{M}$ , 3 % sakkaroosia sekä  $3 \text{ g/l}$  Phytageliä alustan kiinteyttämiseksi. Alustoissa pH säädettiin 5,8:aan ennen autoklavointia. AA-alustan aminohappokomponentit steriloidiin suodattamalla.

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

### Esikäsittelykokeet

Esikäsittelyn ( $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) vaikutuksesta, jota testattiin kolmessa kokeessa, on yhteenveto taulukossa 2. Tulokset sekä ponsivasteen että kasvien regeneraation suhteen vaihtelivat suuresti eri linjojen välillä. Käyttämällä pitkiä kylmäkäsittelyjaksoja (3-4 viikkoa) saatiin joissakin tapauksissa moninkertaistettua ponsivasteen ja vihreiden kasvien tuotto. Parhaimmat tulokset saatiin linjoilla 'Jo 02' (max. 30,6 vihreää kasvia/100 pontta) ja 'Hännilä' (17,3 vihreää kasvia/100 pontta). Joillakin linjoilla esikäsittely valossa lisäsi vastetta. Tulokset ovat merkittäviä, sillä aiemmin julkaistuissa tuloksissa on viljellyllä rukiilla saatu n. 0-5 % vihreitä kasveja riippuen siitä kuinka paljon villiruista on ollut koemateriaalin perimässä (Flehinghaus *et al.* 1991, Daniel 1993, Flehinghaus-Roux *et al.* 1995). Raportoiduissa kokeissa on käytetty yhden viikon kylmäkäsittelyä. Pitkiä esikäsittelyjaksoja olisi syytä kokeilla laajemmalla ruisaineistolla, jolla on todettu heikko ponsiviljelyvaste. Kokeissa testattiin myös mannitolin vai-

kutusta inkuboimalla kasvatuksen alussa ponsia kolme vrk. alustalla, jossa oli ainoana hiilihydraattilähteenä mannitolia  $32 \text{ g/l}$ . Mannitolin on raportoitu lisäävän vihreiden kasvien regeneraatiota ohran ponsiviljelyssä (Cistué *et al.* 1994). Rukiilla mannitolikäsitteily kuitenkin ehkäisi mikrosporien kehittymisen lähes täydellisesti.

### Mikrosporien kehitysvaihe

Kokeessa tarkasteltiin kahta ponsiviljelyvasteeltaan erilaista ruislinjaa. Näistä 'Jo 02' tuottaa suhteellisen hyvin regeneroitumiskykyisiä alkiorakenteita. 'Hännilä' tuottaa runsaasti kallusta ja alkiorakenteita, mutta regeneraatio on heikkoa verrattuna 'Jo 02' -linjaan. Ponsiviljelyvaste ja regeneroituminen eripituista ponsista on esitetty kuvassa 1a ja b. Ponsien pituus korreloi tässä kokeessa mikrosporin kehitysvaiheen kanssa siten, että molemmissa ruislinjoissa mikrosporit olivat jakautumisvaiheessa 6-6,5 mm:n mittaisissa ponsissa. 'Hännilä'-rukiilla ponsiviljelyvaste kasvoi lineaarisesti kaksitumavaiheeseen asti (7-7,5 mm:n ponnit) ja väheni sen jälkeen. Myös 'Jo 02'-rukiilla paras induktiovaste havaittiin kaksitumavaiheessa. Sen sijaan kehittymättömistä mikrosporeista syntyneet alkio regeneroituiivat tehokkaammin kuin myöhäisemmissä vaiheissa nypityistä ponsista syntyneet. Linjalla 'Jo 02' vihreitä kasveja syntyi kaikissa kehitysvaiheissa olevista mikrosporeista kehittyneistä alkioista, eikä mikrosporin kehitysvaihe ollut kriittinen tekijä. Sen sijaan ponsiviljelykyvyltään heikommalla 'Hännilä'-linjalla saatiin vihreitä kasveja eniten alkioista, jotka olivat peräisin jakautumis- tai kaksitumavaiheessa olevista mikrosporeista.

### Kasvatusalustakokeet

Kallusta ja alkiorakenteita saatiin kahdessa kokeessa kaikista ruislinjoista kaikilla ravinnesuolakoostumuksilla (Taulukko 3). Alustoilla AA,  $\text{N}_6$  ja W14 kalluksen/alkioiden tuotto alkoi n. kaksi viikkoa myöhemmin kuin muilla

**Taulukko 2.** Tähkien kylmäkäsitteilyn vaikutus ruislinjojen ponsivijelyvasteeseen kolmessa eri kokeessa. Poikkeuksellisen korkeat vihreiden kasvien regeneraatiomäärät on merkitty tummentaen.

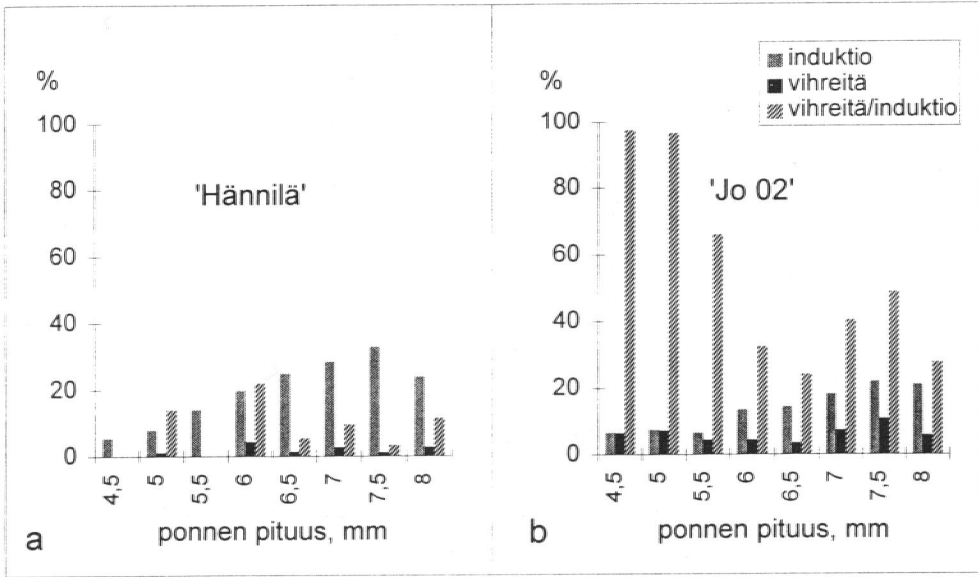
Esikäsitteily	Viikkoa	Koc						Koc								
		Hja 7052/Warko <sup>1</sup>			Jo 8603/Jo 8708 <sup>1</sup>			Hänniä <sup>2</sup>			Hänniä			Jo 02 <sup>2</sup>		
		I <sup>3</sup>	VK <sup>4</sup>	I	I	VK	I	VK	I	VK	I	VK	I	VK	I	VK
Kontrolli	0	1,1	0,1	3,9	0,1	0,1	5,4	0,2	3,8	1,5	15,9	1,2				
Pimeä	1	1,1	0,1	11,5	0	0	13,9	0	11,1	1,4	2,1	3,4				
+4 °C	2	3,1	0	5,3	0	0	11,5	0	12,4	1,0	12,0	1,9				
	3						9,8	4,3	22,3	0,8	13,1	<b>16,4</b>				
	4						10,0	<b>17,3</b>								
Valo 16 h	1	3,3	0,3	1,5	0	0			1,9	0,1	7,8	1,9				
+4 °C	2	9,5	<b>4,3</b>	5,6	0,1	0,1			12,1	0,1	3,4	0,1				
	3								11,6	0,3	19,1	<b>30,6</b>				

1 syysruukiita

2 kevätruukiita

3 induktio = kallusta tai alkiolta tuottavia ponsia/100 ponia

4 vihreitä kasveja/100 ponia



**Kuva 1a ja b.** Mikrosporin kehitysvaiheen vaikutus induktioon ja vihreiden kasvien regeneraatioon kevätruusulinjoilla a) 'Jo 02' ja b) 'Hännilä'.

alustoilla. Tulokset olivat kahdessa kokeessa samankaltaiset. Alusta 190-2 osoittautui parhaimmaksi ponsivasteen suhteen, mutta se ei poikennut 1. kokeessa merkitsevästi W14-alustasta ja 2. kokeessa W14- ja OAC-1-alustoista. Näille kolmelle alustalle on yhteistä suhteellisen alhainen ammoniumtyypen osuus kokonaistypestä ja alhainen kokonaistyyppipitoisuus verrattuna MS- ja N<sub>6</sub>-alustaan (190-2: 17,8 %, 12,9 mM; W14: 23,1 mM, 14,3%; OAC-1: 0 %, 4,3 mM; MS 34 %, 60 mM; N<sub>6</sub>: 20 %, 35 mM). AA-alustassa on pelkästään orgaanista tyyppiä (21,8 mM). Typen määrä ja laatu saattaa olla merkittävä tekijä rukiin ponsiviljelyssä. Alusta 190-2 valittiin jatkokokeisiin, koska se edisti kalluksen/alkioiden kehittymistä aikaisemmin kuin W14. Alustavassa kokeessa Ficoll edisti alkionkehitystä merkitsevästi verrattuna kiinteään alustaan ja nestealustaan, josta Ficoll puuttui. Maltoosipitoisuutta testattiin kolmella eri tasolla: 60, 90 ja 120 g/l. Havaittiin, että maltoosipitoisuuden nostaminen lisäsi kalluksen ja alkiorakenteiden syntymistä, mutta vähensi vihreiden kasvien saantoa. Alkioiden regeneroitumiskyky ja vihreiden kasvien kokonaismäärä olivat parhaim-

mat alhaisimmalla maltoositasolla. Myöhemmät tulokset ovat vahvistaneet tätä havaintoa.

### Maljakoon vaikutus ponsiviljelyvasteeseen

Erlaisia ponsitiheyksiä ja kahta maljakokoa (Ø5,4 cm ja 3,4 cm) vertailevan kokeen tuloksista havaittiin, että isommalta maljalta siirrettyistä alkiosta saatiin keskimäärin viisinkertainen määrä vihreitä kasveja, vaikka kalluksen ja alkiorakenteiden tuotto oli samanlaista molemmilla maljoilla (Taulukko 4). Ponsitiheyksissä ei ollut merkitseviä eroja. Maljan ilmatila ja kaasunvaihto riippuvat maljan koosta. Tulokset viittaavatkin siihen, että kaasun vaihdolla on vaikutusta ponsiviljelyvasteeseen ja aivan erityisesti alkioiden regeneroitumiskykyyn.

### Syysruislinjojen ponsiviljelyvaste

Syysruislinjojen ponsiviljelyvastetta testattiin uudestaan 1996. Nyt käytettiin menetelmää,



**Taulukko 3.** Peruskasvatusalustojen vaikutus ruislinjojen ponsiviljelyvasteeseen kahdessa kokeessa.

Ruislinja Kasvualusta	Amilo/Jo 7808 <sup>1</sup>		Warko/Jo 9212 <sup>1</sup>		Hja 7068 <sup>2</sup>		Hja 7009 <sup>2</sup>	
	I <sup>3</sup>	VK <sup>4</sup>	I	VK	I	VK	I	VK
190-2	25,3	4,0	14,7	3,2	4,9	0,3	10,6	0
W14	25,1	2,4	14,3	4,8	4,0	1,3	8,5	0
OAC-1	22,5	1,9	13,0	1,0	2,0	0	6,0	0,3
N <sub>6</sub>	20,1	1,8	9,0	1,9	2,8	0	5,2	0,6
MS	14,7	0,8	11,0	0,1	1,9	1,9	4,8	0,1
AA	16,5	2,4	8,0	1,8	3,8	0,5	4,8	0

<sup>1</sup> koe 1<sup>2</sup> koe 2<sup>3</sup> induktio = kallusta tai alkiorakenteita tuottavia ponsia/100 pontta<sup>4</sup> vihreitä kasveja/100 pontta**Taulukko 4.** Maljakoon ja ponsitiheyden vaikutus ponsiviljelyvasteeseen kevätruuslinjalla 'Jo 02'.

Malja Ø, cm	Ponsia/mm <sup>2</sup>	Ponsia/malja	I <sup>1</sup>	VK <sup>2</sup>
3,4	1,1	10	22,1	0,8
	2,2	20	20,3	1,4
	3,3	30	16,0	1,1
5,4	1,1	25	19,5	5,8
	2,2	50	19,1	7,5
	3,3	75	16,2	4,2

<sup>1</sup> induktio = kallusta tai alkiorakenteita tuottavia ponsia/100 pontta<sup>2</sup> vihreitä kasveja/100 pontta

jossa eri tekijöitä oli muutettu kokeista saatujen tulosten perusteella riippumatta siitä, olivatko paremmat tulokset kokeissa tilastollisesti merkitseviä vai eivät. Yleisesti havaittiin parannusta vihreiden kasvien regeneraatioissa: sekä kasvien kokonaismäärissä, että vihreiden kasvien tuoton suhteessa albiinoiden määriin. Linjatestauksen päätulokset verrattuna lähtötasoon on esitetty taulukossa 1. Ensimmäisessä kokeessa vihreiden kasvien määrät olivat alhaisempia, vaikka kolmetoista kasvia kahdestakymmenestä tuotti yhden tai useampia vihreitä kasveja. Toisessa kokeessa puolet linjoista tuotti yli kymmenen kasvia, ja suurin kasvimäärä oli sata vihreää kasvia yhdestä linjasta. Käytännön kasvinjalostuskoetta varten voitaisiin määrittää sellainen nyppittävien ponsien taso, jolla jokaisesta risteytyksestä olisi odotettavissa riittävä määrä kaksoishaploideja

kasveja. Menetelmiä ei testattu rinnakkain, eivätkä havaitut parannukset välttämättä johdu yksinomaan menetelmän muutoksista.

Kokeissa saaduista regeneranteista n. 70 %:lla havaittiin juurenkärkipreparaatteja tarkastelemalla 2x-kromosomitaso. Tosin lähes kaikkien kasviyksilöiden juurenkärkinäytteistä löytyi myös haploideja soluja. Tulavaisuudessa on syytä varmistaa regeneranttien homotsygotia. Tosin miksoplodia viittaa siihen, etteivät kasvit ole peräisin restitutiogameeteista, vaan ne ovat spontaanin kromosomiston kahdentumisen kautta syntyneitä kaksoishaploideja. Koska meillä on käytössä ponsiviljelyvasteeltaan poikkeuksellinen ruislinja 'Jo 02', voimme jatkossa siirtyä eristettyjen mikrosporien tutkimuksiin, mikä toivottavasti nopeuttaa ja tehostaa työtämme.

# Kirjallisuus

- Chu, C. C., Wang, C. C. & Sun, C. S.** 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica* 28: 695–668.
- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A. M. & Romagosa, I.** 1994. Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports* 13: 709–712.
- Deimling, S., Flehinghaus-Roux, T., Röber, F., Schechert, A., Roux, S. R. & Geiger, H. H.** 1994. Doubled haploid production - now reproducible in rye. In: Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, Italy, June 12–17, 1994. Firenze: International Association for Plant Tissue Culture. p. 95: S3–58.
- Daniel, G.** 1993. Anther culture in rye: improved plant regeneration using modified MS-media. *Plant Breeding* 110: 259–261.
- Flehinghaus, T., Deimling, S. & Geiger, H. H.** 1991. Methodological improvements in rye anther culture. *Plant Cell Reports* 10: 397–400.
- Flehinghaus-Roux, T., Deimling, S. & Geiger, H. H.** 1995. Anther-culture ability in *Secale cereale* L. *Plant Breeding* 114: 259–261.
- Friedt, W., Lind, V., Walther, H., Boroghi-Wehr, B., Züchner, S. & Wenzel, G.** 1983. The value of inbred lines derived from *Secale cereale* x *S. vavilovii* via classical inbreeding and androgenetic haploids. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 91: 89–103.
- Immonen, S. & Anttila, H.** 1996. Success in anther culture of rye. Vorträge für Pflanzenzüchtung. Proceedings of the International Symposium on Rye Breeding & Genetics, Stuttgart, Germany, June 27–29, 1996. EUCARPIA, Cereal Section. Volume 35: 237–244. (ISSN 0723-7812)
- Korzun, V., Melz, G. & Börner, A.** 1996. RFLP mapping of the dwarfing (*Ddw1*) and hairy peduncle (*Hp*) genes of chromosome 5 of rye (*Secale cereale* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 1073–1077.
- Laurie, D. A., O'Donoghue, L. S. & Bennet, M. D.** 1990. Wheat x maize and other sexual hybrids: their potential for genetic manipulation and crop improvement. In: Gustafson, J.P. (ed.). *Gene manipulation in plant improvement II. Proceedings of the 19th Stadler Genetics Symposium*, Columbia, Missouri, USA, March 13–15 1989. New York: Plenum Press, p. 95–125. ISBN 0-306-43595-0
- Murashige, T & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Müller, A. J. & Grafe, R.** 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Molecular and General Genetics* 161: 67–76.
- Ouyang, J. W., Jia, S. E., Zhang, C., Chen, X. & Feng, G.** 1989. A new synthetic (W14) medium for wheat anther culture. *Annual Report Angst. Genetica Sinica, Beijing*, p. 91–92.
- Polsoni, L.** 1991. The induction of microspore embryogenesis in anther culture of oats (*Avena sativa* L.). The University of Guelph, Canada. 130 p. (M.Sc. Thesis).
- SAS Institute Inc.** 1993. SAS Technical Report P-243. SAS/STAT Software: The GENMOD Procedure, Release 6.09, Cary, NC. USA: SAS Institute Inc. 88 p. ISBN 1-55544-547-0
- Thomas, E., Hoffmann, F. & Wenzel, G.** 1975. Haploid plantlets from microspores of rye. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 75: 106–113.
- Thompson, J. A., Abdullah, R. & Cocking, E. C.** 1986. Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose. *Plant Science* 47: 123–133.
- Wang, X. & Hu, H.** 1984. The effect of potato II medium for triticales anther culture. *Plant Science Letters* 36: 237–239.
- Wenzel, G., Hoffmann, F., Potkyrus, I. & Thomas, E.** 1975. The separation of viable rye microspores from mixed populations and their

development in culture. *Molecular and General Genetics* 138: 293–297.

**Wenzel, G. & Thomas, E.** 1974. Observations on the growth in culture of anthers of *Secale cereale*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 72: 89–94.

**Wilde, P.** 1996. Multi-stage selection for combining ability among pollen parent lines in hybrid rye

breeding. In: *Vorträge für Pflanzenzüchtung. Proceedings of the International Symposium on Rye Breeding & Genetics*, Stuttgart, Germany, June 27–29, 1996. EUCARPIA, Cereal Section. Volume 35: 15–25. (ISSN 0723-7812)

**Zenkteler, M. & Nitzsche, W.** 1984. Wide hybridization experiments in cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 68: 311–315.

# Vehnän mikrosporiviljely: vahvuudet ja heikkoudet

---

Matti Puolimatka<sup>1</sup>, Sisko Laine<sup>1</sup> & Janos Pauk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MTT, Kasvintuotannon tutkimuslaitos, Kasvinjalostuksen tutkimusala, 31600 Jokioinen

<sup>2</sup> Cereal Research Institute, Wheat Genetics and Breeding Department,

P. O. BOX 391, Szeged H-6701, Hungary

e-mail: matti.puolimatka@mtt.fi

Vehnän (*Triticum aestivum* L.) mikrosporiviljelykokeissa on kehitetty tekniikka, jonka avulla voidaan tuottaa vehnästä kaksoishaploideja kasveja lajikkeen jalostuksen apuvälineeksi. Mikrosporit vapautetaan homogenisaattorilla suoraan vehnän kukinnoista, puhdistetaan mannitolipesujen ja sentrifugoinnin avulla ja viljellään nestemäisellä alustalla yhdessä emien kanssa. Viljelyssä syntyy alkion kaltaisia rakenteita, joista regeneroituvista vihreistä versoista suurin osa kahdentaa spontaanisti kromosomistonsa ja muodostaa normaalisti siementä. Emien vaikutus menetelmän onnistumiselle on ratkaiseva: ilman emejä mikrosporit aloittavat jakautumisen, mutta kehitys pysähtyy eikä alkioita muodostu. Kokeissa, joissa tutkittiin emien yhteisviljelyn keston vaikutusta alkioiden kehittymiseen, muodostui alkioita sitä enemmän mitä pidempi yhteisviljelyn kesto oli. Kun emejä lisättiin alustaan viiden vuorokauden kuluttua, saatiin parempi tulos kuin poistettaessa emit viiden päivän kuluttua. Nämä tulokset osoittavat, että emien suotuisa vaikutus ei kohdistu solunjakautumisten alkamiseen vaan niiden jatkumiseen ja alkioiden kehittymiseen. Menetelmän heikkouksia ovat toistaiseksi alkioiden alhainen regeneraatioaste ja albiinoiden suuri osuus. Vahvuuksia puolestaan ovat hyvä toistettavuus, ajansäästö työssä ja vihreiden versojen korkea spontaani kromosomiston kahdentumisaste.

*Avainsanat:* albiino, embryogeneesi, emi, haploidi, kaksoishaploidi, regeneraatio, *Triticum aestivum*, yhteisviljely

# Abstract

## Isolated wheat microspore culture: advantages and problems

Matti Puolimatka<sup>1</sup>, Sisko Laine<sup>1</sup> & Janos Pauk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Crop and Soil Science,  
Plant Breeding Section, FIN-31600 Jokioinen*

<sup>2</sup> *Cereal Research Institute, Wheat Genetics and Breeding Department,  
P. O. BOX 391, Szeged H-6701, Hungary  
e-mail: matti.puolimatka@mtt.fi*

A culture technique to regenerate haploids from directly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores was optimized. Microspores at the late uninucleate/early binucleate stage were isolated with a micro blender from cold pretreated spikelets. The isolates were cleaned by sieving and centrifuging and cultured in six different liquid media, all including 1.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin and 62 g/l maltose. Immature ovaries were dissected from spikes at the same developmental stage and placed on the cultures. Cultures were kept in the dark at 28 °C. Embryo-like structures larger than 1 mm in diameter were transferred to 190-2 medium in the light for regeneration. Plantlets were then transferred to soil and to the greenhouse. Embryogenesis was induced in all the studied induction media. The best medium in terms of number of embryos was N<sub>6</sub>-modified TR. In general, less than half of the embryos regenerated into plants and most of the regenerants were albinos. However, most of the green regenerants were spontaneous doubled haploids and set seed. Ovary co-cultivation was essential for microspore embryogenesis. Without ovaries cells divided but divisions stopped after two weeks and embryo-like structures did not develop. In contrast, ovary co-cultivation repeatedly resulted in the formation of embryo-like structures which regenerated plants. These results indicate that ovaries were not necessary for triggering the cell divisions but were for maintaining the embryogenic development.

*Key words:* albino, doubled haploids, embryogenesis, ovary co-cultivation, regeneration, *Triticum aestivum*

## Johdanto

Kaksoishaploideilla voidaan itsepölytteisen viljan, kuten vehnän (*Triticum aestivum* L.), homotsygotian saavuttamiseen tarvittavaa aikaa lyhentää ja parantaa jalostajan tekemän valinnan tehokkuutta (Snape 1989). Vehnällä kaksoishaploideja lajikkeita on tähän mennessä tuotettu ponsiviljelymenetelmän avulla (Hu *et al.* 1986, de Buyser *et al.* 1987, Pauk *et al.* 1995). Ponsiviljelyssä heteen ponnet nypitään kokonaisina viljelyalustalle, ja ponsien sisältämistä mikrosporeista kehittyvät haploideja alkioita, joista edelleen regeneroituu kokonaisia versoja. Mikrosporiviljelyssä mikrosporit vapautetaan ponsien sisältä ja niitä viljellään sellaisenaan. Mikrosporien vapauttamiseen käytetään erilaisia menetelmiä, joissa mikrosporit eristetään joko suoraan ilman ponsien esikäsitteilyä tai ponsien esikäsitteilyn jälkeen. Suorassa eristämässä kukinnot murskataan kokonaisina, ponsien esikäsitteilyssä ponnet taas nypitään ensin lyhyeksi aikaa esikäsitteilyluokseen tai kasvatusalustalle, ja vasta sen jälkeen mikrosporit vapautetaan joko vortexoimalla tai esimerkiksi lasisauvan avulla. Suoran eristämisen etu on ajan säästö verrattuna työlääseen ponsien nypintään. Ohralle (*Hordeum vulgare* L.) on kehitetty suoraan eristämiseen perustuva mikrosporien viljelymenetelmä, jossa veitsihomogenisaattorilla voidaan vapauttaa murskatusta tähkästä alkionmuodostukseen kykeneviä mikrosporeja (Olsen 1991). Sen sijaan vehnälle vastaavan menetelmän kehittäminen on ollut vaikeampaa. Datta & Wenzel (1987) ja Tuveson & Öhlund (1993) eristivät mikrosporit esinypityistä ponsista. Mejza *et al.* (1993) ja Gustafsson *et al.* (1995) käyttivät mikrosporien eristämässä Waring-homogenisaattoria. Eristettyjen mikrosporien viljely sellaisenaan ei tuottanut tulosta, mutta Mejza *et al.* (1993) havaitsivat, että vehnän ja ohran emit viljeltyinä yhdessä mikrosporien kanssa edistivät alki-  
onkehitystä.

Osana vehnän bioteknistä tutkimusprojektiä olemme tähän mennessä kehittäneet vehnän ponsiviljelymenetelmän, joka toimii luotettavasti suomalaisella kevät- ja syysvehnällä (Puolimatka *et al.* 1995). Tämän tutkimuksen

tavoitteena on kehittää suoraan eristämiseen perustuva mikrosporiviljelymenetelmä vehnän jalostuksen apuvälineeksi. Suora mikrosporieristys vähentäisi ponsiviljelyyn verrattuna työtä jalostusmateriaalin tuottamiseksi. Tutkimuksessa on tähän mennessä kehitetty veitsihomogenisaattorin käyttöön perustuva vehnän mikrosporiviljelymenetelmä, jota on jo testattu kevät- ja syysvehnällä. Menetelmä perustuu emien yhteisviljelyyn ja se toimii toistettavasti.

## Aineisto ja menetelmät

Koeaineistona mikrosporiviljelykokeissa käytettiin Mahti-kevätvehnälajiketta ja Hja 24201-jalostuslinjaa, joiden ponsiviljelyvaste tiedetään aiempien tulosten perusteella hyväksi. Mikrosporien eristys- ja viljelymenetelmä on selostettu yksityiskohtaisesti aiemmin (Puolimatka *et al.* 1996a). Emokasvit kasvatettiin kasvihuoneessa, ja tähkät leikattiin mikrosporien ollessa myöhäisessä yksitumavaiheessa. Käytännössä tähkät olivat jo osin ulkona näkyvissä lehtitupesta. Esikäsitteilynä tähkät pidettiin kylmässä (+4 °C) kaksi viikkoa ennen eristystä. Ennen homogenisointia Waring-homogenisaattorilla tähkät otettiin esiin lehtitupesta ja steriloitiin natriumhypokloriitilla. Kahdeksasta tähkästä tähkyvät nypittiin sekoittimen 100 ml:n säiliöön ja homogenisointi tehtiin kahdesti viiden sekunnin jaksoissa 0,3 M mannitolissa. Murskattu aines suodatettiin 100 µm:n nylonsuodattimen läpi. Suodattimelle jäänyt kasviaines palautettiin säiliöön ja homogenisointi ja suodatus uusittiin. Mikrosporisuspensio sentrifugoitiin 10 ml:n putkissa 5 min 55 g. Pohjaan pelletteituneet mikrosporit resuspentoitiin 0,3 M mannitoliin. Suspensio siirrettiin varovasti 21 % maltoosiliuoksen päälle ja sentrifugoitiin 5 min 55 g. Maltoosimannitoli-interfaasiin jääneet mikrosporit (Kuva 1a) siirrettiin pipetillä uuteen putkeen ja pestiin vielä kerran 0,3 M mannitolilla ja sentrifugoitiin kuten edellä. Mikrosporit resuspentoitiin vielä kerran 0,3 M mannitoliin ja jaettiin varsinaista viljelystä varten siten, että viljelytyhe-  
deksi tuli noin  $8 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ . Mikrosporit sentrifugoitiin pelletiksi vielä kerran, minkä jälkeen

ne resuspenoitettiin tutkittuihin nestemäisiin viljelyalustoihin. Viljelyssä käytettiin halkaisijaltaan 3 cm:n maljoja. Alustakokeissa testattiin seuraavia alustoja: W14 (Jia *et al.* 1994), 190-2 (Wang & Hu 1984), FHG (Patent Application 1987), TA (Jia *et al.* 1994), TR (Tiwari & Rahimbaev 1992) ja N<sub>6</sub> (Chu 1978). Jokainen alusta sisälsi 1,5 mg/l 2,4-dikloorifenoksietikkahappoa (2,4-D), 0,5 mg/l kinetiiniä ja 62 g/l maltoosia. pH säädettiin 5,8:aan. Emien yhteisviljelyssä emit nypittiin pinseteillä samassa kehitysvaiheessa olevista tähkistä. Emit sijoitettiin kasvatusliuoksen pinnalle, kaksikymmentä emiä maljaa kohden (Kuva 1b). Yhteisviljelyn keston vaikutusta selvittävissä kokeissa testattiin kuutta eri käsittelyä siten, että emit poistettiin tai lisättiin 5, 10 ja 15 vuorokauden kuluttua. Viljelmät sijoitettiin pimeään +28 °C:seen. Mikrosporien kehitystä seurattiin käänteisvalomikroskoopin avulla (Kuva 1c). Kun alkiot 4-6 viikon kuluttua saavuttivat noin 2 mm pituuden (Kuva 1d), ne siirrettiin 190-2 regeneraatioalustalle, joka oli kiinteytetty Phytigelillä (0,3 %). Regeneraatiovaihe tapahtui +25 °C:ssa valossa ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Kuva 1f). Taimien annettiin juurtua MS-alustalla (Murashige & Skoog 1962) ilman hormoneja. Juurtuneet versot siirrettiin multaan kasvihuoneelle.

## Tulokset

Välittömästi eristyksen jälkeen ilman emejä ja emien kanssa viljellyissä mikrosporeissa ei näkynyt huomattavia eroja: molemmissa tapauksissa elävien mikrosporien osuus putosi nopeasti muutaman ensimmäisen vuorokauden kuluessa. Molemmissa viljelmissä tapahtui solunjakautumista ja syntyi selvästi muutaman solunmuodostamia rakenteita. Kahden viikon jälkeen alkoi näkyä emien vaikutus. Ilman emejä kasvaneissa viljelmissä solunjakautumiset pysähtyivät ja rakenteiden kasvu pysähtyi (Kuva 1e). Sen sijaan emejä sisältäneissä viljelmissä solunjakautuminen jatkui ja alkiomaiset rakenteet tulivat silmin nähtäviksi noin neljän viikon kuluttua aloituksesta (Kuvat 1d ja 1e). Ensimmäiset alkiot kehittyivät nopeimmin, ja vain

suurimmat, noin 2 mm:n alkiot siirrettiin regeneraatioalustalle. Kuten kuvassa 1e näkyy, maljoissa kasvoi runsaasti myös pienempää embryogeenistä solukkoa, jota ei siirretty regeneraatioalustalle. Alustakokeissa alkioita muodostui kaikilla tutkituilla alustoilla, mutta alkioiden saannossa oli eroja alustojen välillä (Kuva 2).

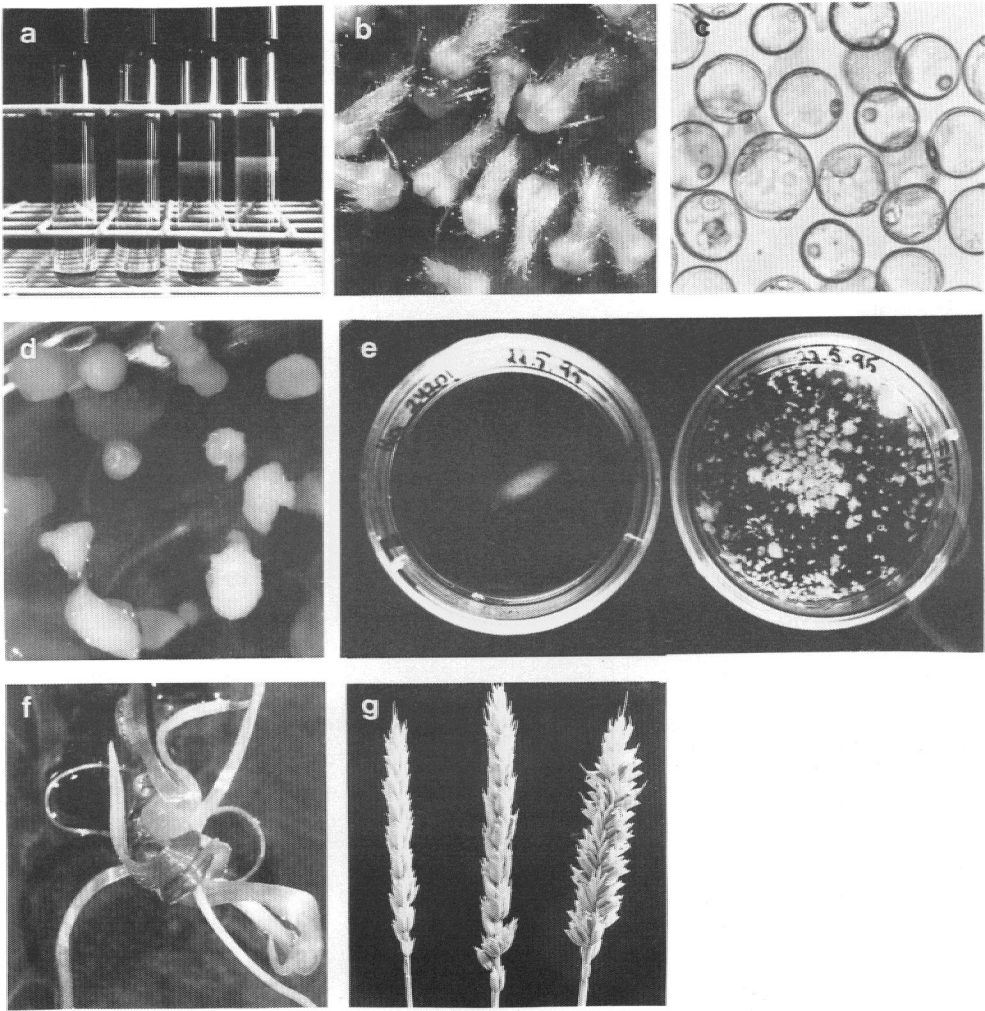
Mitä kauemmin mikrosporeja viljeltiin yhdessä emien kanssa, sitä enemmän syntyi alkioita (Kuvat 3 ja 4). Emien lisäys viiden vuorokauden kuluttua tuotti enemmän alkioita ja versoja kuin käsittely, jossa emit poistettiin viiden vuorokauden kuluttua. Emien lisäys 10 vuorokauden kohdalla pudotti alkioiden määrää jo merkittävästi, ja viljelmissä, joissa emit lisättiin vasta 15 vuorokauden kuluttua, enää muutama alkio kehittyi.

Alkioiden regeneraatiokyky oli yleisesti heikko, ja suuri osa versoista oli albinvoja (Kuva 2). Kasvihuoneelle multaan siirretyt versot näyttivät normaaleilta ja niistä n. 80 % muodosti siementä (Kuva 1g).

## Tulosten tarkastelu

Kehitetyn vehnän mikrosporiviljelytekniikan avulla tuotettiin alkioita ja niistä regeneroitiin vihreitä kasveja, joista suurin osa oli siementä tuottavia spontaaneja kaksoishaploideja. Embryogeneesin indusointi suoraan kukinnoista eristettyjen vehnän mikrosporien viljelyssä onnistui usealla erilaisella nestekasvatusalustalla. Olennaista onnistumiselle oli mikrosporien eristäminen myöhäisessä kehitysvaiheessa (myöhäinen yksitumavaihe/aikainen kaksitumavaihe) ja viljely yhdessä epäkypsien emien kanssa.

Tämän tutkimuksen tulokset ovat sopu-soinnussa aiempien havaintojen kanssa (Mejza *et al.* 1993, Gustafsson *et al.* 1995), joissa vehnän mikrosporien eristys Waring-sekoittajalla tuotti alkiomuodostukseen kykeneviä mikrosporeja. Eristys suoraan kukinnoista nopeuttaa lajikejalostuksessa käytettävien kaksoishaploidien tuottamista verrattuna sellaisiin eristys- ja kasvatusmenetelmiin, joissa ponnet ensin nypitään esikäsitteilyyn (Datta & Wenzel 1987,



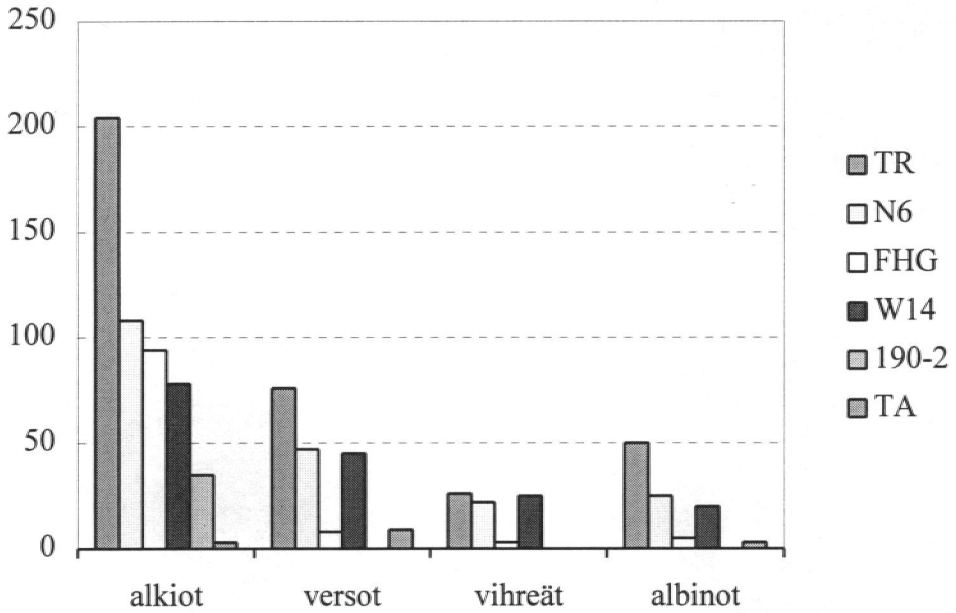
**Kuva 1.** a) Maltoosi-mannitoli -interfaasissa olevat mikrosporit näkyvät vaaleana vyöhykkeenä. b) Tuoreita emejä nestemäisen induktioalustan pinnalla. c) Jakautumaan lähteviä mikrosoreja mannitolipesujen ja sentrifugointien jälkeen induktioalustassa heti eristyksen jälkeen. d) Mikrosoreista kehittyviä alkioita. e) Vasemmalla mikrosporiviljelmä ilman emejä ja oikealla emien kanssa noin 6 viikon kuluttua viljelyn aloituksesta. Vasemmalla ei kehittyneitä rakenteita, oikealla runsaasti alkioita. Emit poistettu ennen valokuvausta. f) Alkiosta regeneroituva taimi 190-2-alustalla. f) Valmiita mikrosporiperäisiä vehniä kasvihuoneella: vasemmalla steriili tähkä, keskellä osittain fertiili ja oikealla täysin fertiili tähkä.

Turesson & Öhlund 1993, Touraev *et al.* 1996). Waring-sekoittajan käyttökelpoisuudesta mikrosporiviljelyssä on raportoitu myös riisillä (Cho & Zapata 1988), maissilla (Coumans *et al.* 1989) ja ohralla (Olsen 1991).

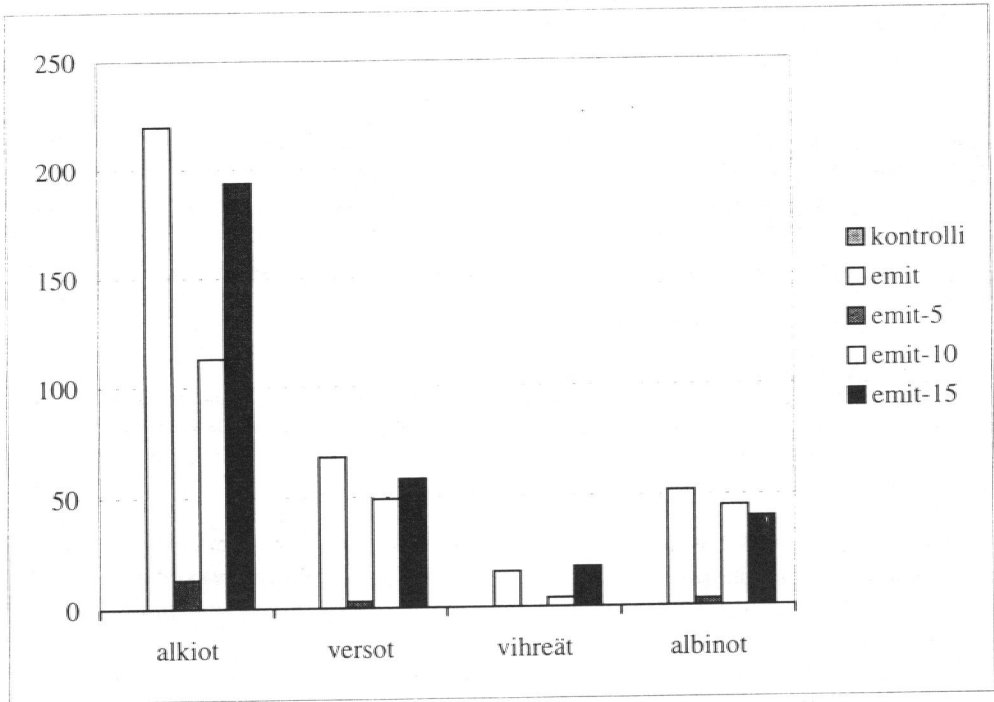
Mejza *et al.* (1993) havaitsivat, että vehnän ja ohran emit vaikuttavat positiivisesti suoraan eristettyihin vehnän mikrosoreihin. Köhler & Wenzel (1985) raportoivat emien positiivisesta vaikutuksesta ohran mikrosporien kehittämiselle ja oletivat vaikuttaviksi aineiksi emeistä peräisin olevat auksiininkaltaiset yhdisteet. Myöhemmin Mordhorst & Lörz (1993) osoittivat, että ohran mikrosporiviljely onnistuu hyvin myös suoraan ilman tukisolukkoakin. Turesson & Öhlund (1993) raportoivat saavuttaneensa vehnällä alkionmuodostuksen eristettyään lasisauvalla mikrosporit esi-

visestä vaikutuksesta ohran mikrosporien kehittämiselle ja oletivat vaikuttaviksi aineiksi emeistä peräisin olevat auksiininkaltaiset yhdisteet. Myöhemmin Mordhorst & Lörz (1993) osoittivat, että ohran mikrosporiviljely onnistuu hyvin myös suoraan ilman tukisolukkoakin. Turesson & Öhlund (1993) raportoivat saavuttaneensa vehnällä alkionmuodostuksen eristettyään lasisauvalla mikrosporit esi-

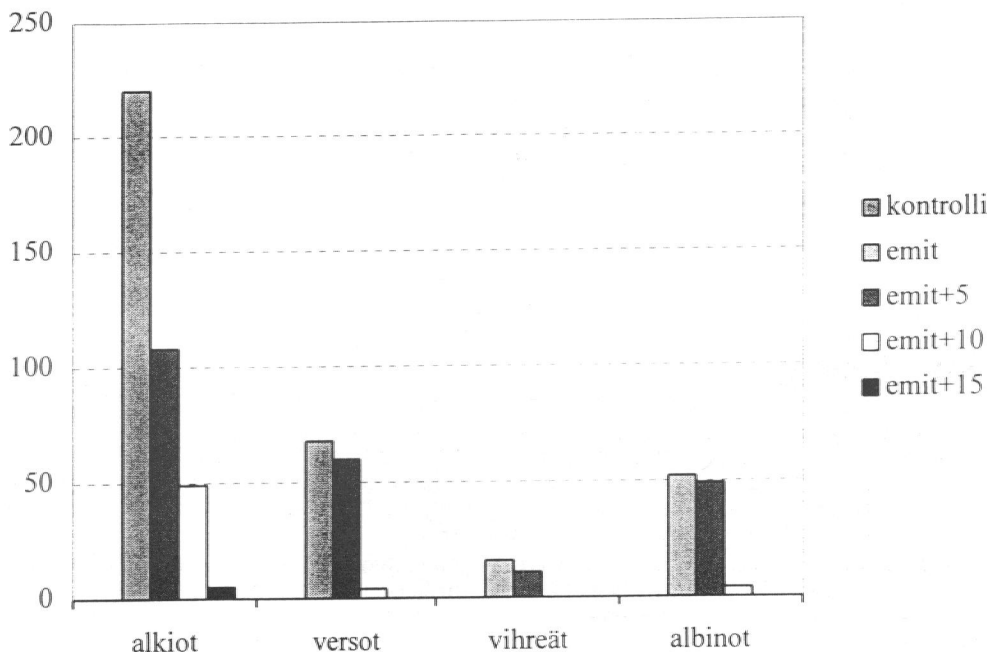




**Kuva 2.** Eri alustojen vaikutus alkioiden ja versojen lukumäärään mikrosporiviljelyssä Mahti-kevätehännällä (Puolimatka *et al.* 1996a).



**Kuva 3.** Vehnän mikrosporien ja emien yhteisviljelyn keston vaikutus saatujen alkioiden ja versojen lukumäärään Mahti-lajikkeella viidessä kokeessa (Puolimatka *et al.* 1996b). Kontrollina maljat, joissa ei ole emejä. Emit-käsittelyssä yhteisviljely kestänyt koko viljelmän ajan. Emit-5 = emit poistettu 5 vuorokauden kuluttua.



**Kuva 4.** Emien lisäämisen ajankohdan vaikutus alkioiden ja versojen lukumäärään vehnän mikrosporiviljelyssä Mahti-lajikkeella viidessä kokeessa (Puolimatka *et al.* 1996b). Kontrollina maljat, joissa ei ole emejä. Emit-käsittelyssä yhteisviljely kestänyt koko viljelmän ajan. Emit+5 = emit-lisäyksi 5 vuorokauden kuluttua viljelyn aloittamisesta.

viljellyistä ponsista. Tässä tutkimuksessa ilman emejä viljellyt mikrosporit aloittivat solunjakautumisen, mutta solukon kehittyminen pysähtyi noin kahden viikon kuluttua. Toisaalta mitä kauemmin mikrosporien ja emien yhteisviljely kesti, sitä enemmän muodostui alkioita (Puolimatka *et al.* 1996b). Kun emejä lisättiin viljelmään vasta viiden vuorokauden kuluttua aloituksesta, saatiin vielä aikaan alkioita, jotka pystyivät regeneroimaan kasveja. Jos yhteisviljely alkoi vasta 15 vuorokauden kuluttua eristyksestä, alkioiden saanto pieneni merkittävästi eivätkä ne tuottaneet enää versoja. Tästä voidaan päätellä, että emejä ei tarvita viljelyn alussa solunjakautumisen indusointiin vaan jakautumisten jatkumiseen ja alkiomaisten rakenteiden kehittymiseen (Puolimatka *et al.* 1996a).

Syytä vehnän suoraan eristetyissä ja ilman emejä viljellyissä mikrosporeissa tapahtuvien jakautumisten pysähtymiseen ja toisaalta emien alkionkehitystä edistävään vaikutukseen ei vielä tunneta. Vehnän ponsiviljelyssä, jossa kehittyvät alkioit tulevat vastaavasti näkyviin noin neljän viikon viljelyn jälkeen, ponnet ovat mukana koko viljelyn ajan ja ne saattavat vaikuttaa samalla tavalla kuin emit. Tämä saattaa selittää osaltaan Tuvešsonin & Öhlundin (1993) edellä mainitut tulokset. Tämän tutkimuksen mukaan yhteisviljelyn kesto ja yhteisviljelyn aloitusajankohta vaikuttavat alkioiden määrään. Vielä ei kuitenkaan voida päätellä, mikä aiheuttaa emien alkionkehitystä edistävän vaikutuksen. Jatkotutkimuksissa pyritään selvittämään, onko osoitettavissa jokin yhdiste, joka indusoi mikrosporeissa alkionkehityksen. Mikäli sellainen löytyy ja sitä voidaan synteettisesti lisätä alustaan, emien käyttö on mahdollista lopettaa.

## Kiitokset

Tekijät kiittävät Maatalouden tutkimuskeskusta, Cereal Research Institutea (Szeged, Unkari), Maa- ja metsätalousministeriötä, Kansainvälisen henkilöväihdon keskusta ja OMFb:tä

(Budapest, Unkari) tutkimustyön rahoittamisesta.

## Kirjallisuus

- Buyser, J. de, Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R. & Hespel, A.** 1987. 'Florin': a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding* 98: 53–56.
- Cho, M. S. & Zapata, F. J.** 1988. Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Taipei 309). *Plant Science* 58: 239–244.
- Chu, C. C.** 1978. The N<sub>6</sub> medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, Peking, May 25–30, 1978. p. 43–50.
- Coumans, M. P., Sohota, S. & Swanson, E. B.** 1989. Plant development from microspores of *Zea mays* L. *Plant Cell Reports* 7: 618–621.
- Datta, S. K. & Wenzel, G.** 1987. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis of *Triticum aestivum* L. *Plant Science* 48: 49–54.
- Gustafsson, V. D., Baenziger, P. S., Wright, M. S., Stroup, W. W. & Yen, Y.** 1995. Isolated wheat microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 207–213.
- Hu, D. F., Yuan, J. Y., Tang, Y. L. & Liu, J. P.** 1986. Jinghua No. 1, a winter wheat variety derived from pollen sporophyte. *Scientia Sinica Serie B* 29: 733–745.
- Jia, X., Zhuang, J., Hu, S., Ye, C. & Nie, D.** 1994. Establishment and application of the medium of anther culture of intergeneric hybrids of *Triticum aestivum* x *Triticum-Agropyron*. *Scientia Agricultura Sinica* 27: 83–87.
- Köhler, F. & Wenzel, G.** 1985. Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials to characterize the responsible factor. *Journal of Plant Physiology* 121: 181–191.
- Mejza, S. J., Morgant, V. J., DiBona, D. E. & Wong, J. R.** 1993. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports* 12: 149–153.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Mordhorst, A. & Lörz, H.** 1993. Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture. *Journal of Plant Physiology* 142: 485–492.
- Olsen, F. L.** 1991. Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* 115: 255–266.
- Pauk, J., Kertész, Z., Beke, B., Bóna, L., Csösz, M. & Matuz, J.** 1995. New winter wheat variety: 'GK Délibáb' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. *Cereal Research Communications* 23: 251–256.
- Patent Application No. 87200773.7.** 1987. Plant Regeneration Method. Hunter, C. P. European Patent Application No. 87200773.7.
- Puolimatka, M., Laine, S. & Pauk, J.** 1996a. Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat. *Cereal Research Communications* 24: 393–400.
- Puolimatka, M., Laine, S. & Pauk, J.** 1996b. Use of ovary co-cultivation in the induction of embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. In: *From single cell to plant - progress towards understanding zygotic, androgenic and somatic embryogenesis*. Plant Embryogenesis Workshop, Hamburg, Germany, September 12–14, 1996. Hamburg: Centre for

Applied Plant Molecular Biology, University of Hamburg, p. 98.

**Puolimatka, M., Pauk, J., Juuti, T., Hömmö, L. & Pulli, S.** 1995. Efficient wheat anther culture system for improving winter hardiness and yield potential in Finnish winter wheats. In: Raatikainen, M. (ed.). Abstracts, Adaptation in plant breeding. XIV EUCARPIA Congress, Jyväskylä, Finland, July 31 - August 4, 1996. Jyväskylä: University of Jyväskylä. p. 67. ISBN 951-34-0570-2

**Snape, J. W.** 1989. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. In: Mujeeb-Kazi, A. & Sitch, L. A. (eds). Review of advances in plant biotechnology, 1985-88: 2nd International Symposium on Genetic Manipulation in Crops. Mexico, D.F., Mexico and Manila, Philippines: CIMMYT and IRRI. p. 19-30. ISBN 968-6127-34-8

**Tiwari, S. & Rahimbaev, I.** 1992. Comparison of glucose, sucrose and maltose for *Hordeum vulgare* L. isolated microspore culture using different methods. Indian Journal of Experimental Biology 30: 624-627.

**Touraev, A., Indriato, A., Wratschko, I., Vicente, O. & Heberle-Bors, E.** 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sexual Plant Reproduction 9: 209-215.

**Turesson, I. K. D. & Öhlund, R. C. V.** 1993. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 163-167.

**Wang, X. & Hu, H.** 1984. The effect of potato II medium for triticales anther culture. Plant Science Letters 36: 237-239.

# Somaklooninen muuntelu ja mutageneesi kasvinjalostuksessa

---

Shri Mohan Jain

*Kasvintuotantotieteen laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto*

*e-mail: jain@ladybird.helsinki.fi*

Solukkoviljely tarjoaa jalostajalle paljon mahdollisuuksia apuvälineenä viljeltyjen kasvien ominaisuuksien parantamisessa. Somakloonisen muuntelun ja indusoitujen mutaatioiden avulla on saatu aikaan uusia genotyyppejä tuottamalla pieniä muutoksia alkuperäiseen genomiin. Muuntelun lähteenä somaklooninen muuntelu muistuttaa indusoitua mutageneesiä. *In vitro* -valinnan avulla voidaan nopeasti kehittää kasveja, joilla on resistenssiä ympäristön abioottisia ja bioottisia stressitekijöitä vastaan. Valittujen somakloonien geneettinen pysyvyys on kuitenkin testattava ennenkuin tällainen materiaali otetaan jalostusohjelmaan, sillä epigeneettisen muuntelun seurauksena syntyneet somakloonit palautuvat alkuperäiseen muotoonsa seuraavassa suvullisessa sukupolvessa. Molekyyliimerkit, esim. RFLP-, AFLP-, ja RAPD-merkit, olisivat erinomaisia välineitä pysyvän muuntelun erottamiseksi epigeneettisestä muuntelusta. Joillakin kasviryhmillä, kuten viljoilla, somakloonista muuntelua on vain vähän, joten sen hyödyntäminen kasvinjalostuksessa on vaikeaa. Ennen kuin geeniteknikka hallitaan luotettavasti kasvinjalostuksen apuvälineenä, olisi runsaan muuntelun tuottamiseksi suotavaa yhdistää solukkoviljely ja mutageneesi, jotta kasvinjalostajalla olisi keinoja lisätä satoja ja sitä kautta ravinnon tuotantoa.

*Avainsanat:* gamma-säteilytys, *in vitro* -valinta, indusoitu mutaatio, koristekasvit, kuivuudenkestävyys, taudinkestävyys, somakloonit, solukkoviljely

# Abstract

## Somaclonal variation and mutagenesis for crop improvement

Shri Mohan Jain

*Department of Plant Production, P. O. BOX 27, FIN-00014 University of Helsinki*

*e-mail: jain@ladybird.helsinki.fi*

Application of plant tissue culture has great potential for plant breeders to improve cultivated plants. Somaclonal variation (SCV) and induced mutation have resulted in the production of new genotypes with a limited change in the original genome. As a source of variation, SCV mimics induced mutations. *In vitro* selection is a quick approach to produce plants with resistance to environmental, abiotic and biotic, stresses. However, it is essential to test the genetic stability of the selected somaclones before they are incorporated in plant breeding programmes. Otherwise, somaclones which arise as result of epigenetic changes will revert to the normal condition in the subsequent sexual generations. The use of molecular markers, such as RFLPs, AFLPs, and RAPDs, would be ideal for identifying genetically stable vs. epigenetic somaclones. In certain crops, eg. cereals, the frequency of somaclonal variation is comparatively low, making it difficult to exploit in crop improvement. Therefore, it is desirable to combine tissue culture and mutagenesis for creating a wide range of variability and ward off pressure on plant breeders to produce more food before genetic engineering becomes a reliable plant breeding tool.

*Key words:* drought resistance, disease resistance, gamma rays, genetic fidelity, *in vitro* selection, induced mutants, ornamental plants, somaclones, tissue culture

## Johdanto

Kasvinjalostajilla on suuri globaalinen haaste lisätä ravinnon tuotantoa alati kasvavan väestön tarpeisiin olosuhteissa, joissa ympäristöstä johtuvat abioottiset ja bioottiset stressitekijät yleistyvät ja uhkaavat kasvintuotantoa. Viljeltävää maa-alaa ei enää voi lisätä. Nopea teollistuminen ja väestönkasvu rasittavat luontoa edistämällä otsonikerroksen häviämistä, happamia sateita, sääolojen arvaamattomia muutoksia, tuholaisongelmia, kasvitauteja, ilmaston lämpenemistä ja ultravioletti-B (UV-B) -säteilyn määrää maapallolla (Jain 1997a, b). Haitalliset ympäristövaikutukset johtavat kasvintuotannon vähittäiseen alenemiseen ja asettavat jatkuvan haasteen kasvinjalostajille ravinnon tuotannon ylläpitämiseksi. Toistaiseksi tuotantoa on edistetty käyttämällä perinteisiä kasvinjalostusmenetelmiä yhdessä mutageneesin ja käytännön viljelytekniikan kanssa. Uusia lähestymistapoja ja menetelmiä tarvitaan takaamaan edistymistä. Biotekniikka yhdistettynä perinteisiin teknologioihin voisi olla keino päästä kestävään maatalouteen (Jain 1997b). Tämä artikkeli keskittyy tarkastelemaan solukoviljelyn keinoin aikaansaadun muuntelun ja indusoidun mutageneesin käyttöä kasvinjalostuksessa.

## Somaklooninen muuntelu verrattuna mutageneesiin

Geneettinen muuntelu on oleellista uusien lajikkeiden jalostuksessa. Yksi tapa tuottaa uutta muuntelua on ollut indusoitu mutageneesi, jonka käyttökelpoisuus oli aluksi epävarmaa, mutta josta tuli varsin tehokas keino kasvinjalostuksessa. Kemiallista ja fysikaalista mutageneesiä käytettiin yleisesti muuntelun lisäämiseksi kasveissa. Sittemmin edistys solu- ja molekyylibiologiassa on tuonut tutkijoiden käyttöön uuden tavan lisätä geneettistä muuntelua.

## Somaklooninen muuntelu

Useimpia kasveja voidaan lisätä solu- ja solukoviljelmistä, mikä on edistänyt solukoviljelyn käyttöä geeniteknologiassa ja maataloustutkimuksessa. Solukoviljelyn aiheuttama somaklooninen muuntelu ja indusoitu mutageneesi voivat tuottaa runsaasti geneettisesti pysyvää ja hyödyllistä muuntelua kasvinjalostuksen käyttöön (Hammerschlag & Litz 1992, Skirvin *et al.* 1993, Maluszynski *et al.* 1995, Jain 1997c, d, Jain *et al.* 1997). Useita termejä, kuten fenomutantit (Sibi 1976), kalliklooninen muuntelu (Skirvin & Janick 1976) ja protoklooninen muuntelu (Shepard 1981), harkittiin kuvaamaan solukoviljelyn tuottamaa muuntelua, ennen kuin päädyttiin termiin somaklooninen muuntelu (Larkin & Scowcroft 1981). Jain (1996c, d) havaitsi somakloonisen muuntelun jäljittelevän indusoitua mutageneesiä. Somaklooniseen muunteluun liittyvät muutokset ovat pistemutaatioita, DNA-metylaatiota, toistuvajaksoisen DNA:n kopiolukujen muutoksia, transposoneihin liittyviä muutoksia, yhden geenin mutaatioita ja kromosomimuutoksia, joihin vaikuttavat genotyyppi, viljeltävä kasvinosa, kasvatusalusta ja kasvinikä (Jain 1997c, d). Somakloonisella muuntelulla on sekä ongelmia että etuja (Taulukko 1). Se on vaikeasti ennustettavaa ja joko periytyvää (geneettistä) tai periytymätöntä (epigeneettistä) regeneroiduissa kasveissa (Taulukko 2). Regeneroitumiskyvyn heikkeneminen tai täydellinen katoaminen on yleinen ilmiö, joka havaitaan erilaistumattomien solujen viljelyssä. Nehra *et al.* (1990) osoittivat mansikan kallusviljelmillä, että *in vitro*-viljellyistä lehdistä syntynyt kallus oli 24 viikon kasvatuksen jälkeen menettänyt täydellisesti regeneroitumiskyvynsä, koska järjestäytymättömän solukon kasvun aikana oli syntynyt DNA-määrältään epänormaaleja soluja. Infante *et al.* (1996) saivat ensimmäisinä diploidilla *Fragaria vesca monophylla* -lajilla aikaan pysyvän solususpensioviljelmän ja kasvien regeneroitumisen viljeltyään kaksi vuotta järjestäytymättömiä soluja. Versojen regeneroituminen oli vaihtelevaa. Rietveld *et al.*

**Taulukko 1.** Somakloonisen muuntelun etuja ja haittoja kasvinjalostuksessa.

Ongelmia	Etuja
<ul style="list-style-type: none"><li>- kaikki ominaisuudet eivät muuntele</li><li>- muutokset ovat usein haitallisia</li><li>- kaikki muuntelu ei ole ainutlaatuista</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- hyödyllinen muuntelu on mahdollista</li><li>- muuntelu on runsasta</li><li>- osa muuntelusta on ainutlaatuista, eikä ole saavutettavissa perinteisin keinoin</li><li>- <i>in vitro</i> -valinnan avulla voidaan löytää abioottista ja bioottista stressiä kestäviä linjoja</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>- kenttäkokeita tarvitaan edelleen</li></ul>	

(1991) havaitsivat, että jotkut somaklooneista, jotka oli tuotettu perunan mukulakiekoista lisätyistä populaatioista, paranivat sadon, elinvoimaisuuden sekä mukuloiden määrän ja muodon suhteen. Muutokset olivat myös pysyviä yli kahden kasvullisen sukupolven ajan, mistä on hyötyä jalostajalle. Stephens *et al.* (1991) eivät havainneet suuria eroja soijapavun solukkoviljelystä syntyneissä ja organogeenisin kautta regeneroiduissa homotsygooteissa jälkeläistöissä. Tilastollisesti merkitseviä eroja ( $p < 0,05$ ) verrattuna vanhempaiskasveihin havaittiin aikaisuudessa, lakoonumisessa, pituudessa, ja siemenvalkuaisen sekä -öljyn pitoisuuksissa, mutta ei siemenen laadussa, painossa eikä sadossa. Sytokiniiniintuottokyky ja kylmänkestävyys ovat esimerkkejä epigeenisestä muuntelusta (Hammerschlag 1992). Gonzalez *et al.* (1996) arvelivat, että ohralla viljeltävän kasvinosan alkuperä oli viljelmien kromosomistabiileetin kannalta kasvatusajan pidentessä tärkeämpi kuin genotyyppi (lajike) ja kalluksen laatu (morfogeeninen vs. ei-morfogeeninen). Somaklooninen muuntelu voidaan ottaa osaksi kasvinjalostusta, jos muuntelu on pysyvää ja periytyvää. Bebeli *et al.* (1993) osoittivat rukiilla epäkypsiä alkioiden *in vitro* -viljelmissä syntyneen periytyvää muuntelua, joka oli yleisempää linjoilla, joiden kromosomeista puuttui telomeeristä heterokromatiinia.

### ***In vitro* -valinta**

Solukkoviljelmistä regeneroiduissa kasveissa esiintyy geneettistä muuntelua, joka on seurausta *in vitro* -mutaatioista solukoissa ja viljelyssä soluissa. Nämä mutaatiot eivät kuitenkaan aina tule ilmi, ja vain harvat ilmenevät fenotyyppisinä tai sytogeneettisinä muutoksina kallussolukosta regeneroiduissa kasveissa (Remotti 1997). Somaattisen embryogeneesin kautta regeneroidut kasvit ovat usein alkupe räisen kaltaisia ja muuntelu on vähäistä (Jain *et al.* 1995). Solukkoviljelyolosuhteilla on merkitystä tuman destabilisaatiossa muuntelun aikaansaamiseksi. Muutokset solukkoviljelyolosuhteissa voivat vaikuttaa mutaatioiden yleisyyteen ja joko vähentää tai lisätä muuntelun määrää (Remotti 1997). Tuloksena saattaa olla kasvinjalostajien käyttöön uutta ja ennennäkemätöntä muuntelua, jolla voidaan korjata useilla viljelykasveilla havaittua geneettisen pohjan kapeutumista. *In vitro* -valintaa voidaan hyödyntää maksimaalisesti lisäämällä valintapainetta, kuten kuivuusvaikutusta tai taudinaiheuttajan vaikutusta laboratorio-olosuhteissa. Tavoitteena on päästä valitsemaan viljelyllisesti halutunlaisia somaklooneja. Tällainen valintamenettely on nopeaa ja helppoa ja säästää useita vuosia verrattuna perinteiseen menetel-



**Taulukko 2.** Somakloonisen muuntelun ja epigeenisen muuntelun välisiä eroja.

Somaklooninen muuntelu	Epigeeninen muuntelu
- siirtyy meioosissa	- ei periödy
- ei palaudu	- palautuu
- ei voida ennustaa	- ennustettavissa
- satunnaista	- yhdensuuntaista, mutageenin määrän suhteen lineaarista, fysiologista

**Taulukko 3.** Esimerkkejä viljelyllisesti hyödyllisten somakloonien *in vitro* -valinnasta.

Ominaisuuksia	Lajit <sup>a</sup>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kukan väri					+	+	+		
Lehden morfologia	+	+	+	+	+		+		+
Kasvin morfologia	+	+	+	+	+	+	+		
Kukan muoto	+	+		+		+	+	+	+
Kukkien lkm	+	+							

<sup>a</sup> 1 = begonia      6 = neilikka  
 2 = paavalinkukka      7 = krysanteemi  
 3 = ruusu      8 = joulutähti  
 4 = rododendron      9 = petunia  
 5 = gerbera      + = muuntelua esiintyy

mään. Lisäksi se minimoi ympäristön vaikutukset, ja valintaa voidaan edelleen tehostaa tarpeista riippuen. Vaikka *in vitro* -valinta on nopeaa, on kuitenkin tärkeää testata regeneroidut kasvit pelto-olosuhteissa geneettisen pysyvyyden varmistamiseksi. Taulukossa 3 on lueteltu joitakin *in vitro* -valinnan kautta saatuja somaklooneja, joilla on todettu viljelyllistä arvoa.

## Mutageneesi

Pelto-, hedelmä- ja koristekasvien jalostuksessa on käytetty gamma-säteilytyksellä ja kemiallisilla mutageeneilla aikaansaatuja mutantteja,

joissa on havaittu hyödyllisiä satoon, kukan väriin, tautiresistenssiin, aikaisuuteen ym. ominaisuuksiin vaikuttavia geneettisiä muutoksia (Micke *et al.* 1990, Crino *et al.* 1994). Kansainvälisen Atomienergian Laitoksen vuosiraportissa (IAEA 1995) todettiin, että vuoteen 1995 mennessä oli lähes sata mutanttilajiketta hyväksytty kauppaan yhteensä 52 maassa. Korkeasatonen, kuoreton ohralajike oli valittu gamma-säteilytetystä siemenmateriaalista ja otettu myyntiin Perun Altiplanolla. Alueella, joka sijaitsee yli 3600 metriä meren pinnan yläpuolella, kasvintuotantoa rajoittaa lyhyt kasvukausi. Lajikkeelle on ominaista hyvä sopeutumiskyky ja se on myös kuluttajien suosi-

**Taulukko 4.** Esimerkkejä viljelyllisesti hyödyllisistä indusoiduista mutanteista

Laji	Ominaisuus/resistenssi	Kirjallisuusviite
tomaatti	<i>Fusarium lycopersici</i>	Shahin & Spivey 1986, Evans 1989
peruna	<i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium oxysporium</i> <i>Phytophthora infestans</i>	Behnke 1980a Behnke 1980b Behnke 1979
ohra	<i>Fusarium</i> ssp.	Chawla & Wenzel 1987a
tupakka	herbisidiresistenssi	Chaleff & Parsons 1978, Chaleff 1980
<i>Brassica</i> sp.	herbisidiresistenssi suolankestävyys	Jain & Newton 1988 Kirti <i>et al.</i> 1991
vehnä	kylmänkestävyys <i>Helminthosporium sativum</i> suolankestävyys	Dorffling <i>et al.</i> 1993 Chawla & Wenzel 1987b, 1989 Barakat & Abdel-Latif 1996
viljahirssi	kuivuudenkestävyys	Nabors 1983
sinimailainen	suolankestävyys	Winicov 1991
riisi	suolankestävyys lysiinipitoisuus	Winicov 1996 Sharpe & Shaeffer 1993
sokeriruoko	tyvilaikunkestävyys	Ramos Leal <i>et al.</i> 1996

katso myös Remotti 1997

ma. Maluszynski *et al.* (1995) tähdensivät, että vaikka suurin osa indusoiduista mutaatioista on jalostajan kannalta hyödyttömiä tai vahingollisia, indusoidut mutaatiot ovat maailmanlaajuisesti vaikuttaneet merkittävästi kasvinjalostukseen. Esimerkkejä kauppaan tulleista lajikkeista ovat suolankestävä riisi Kiinassa, korkeasatoinen puuvilla Pakistanissa ja kuumuutta kestävä vehnä Intiassa (Jain 1997b).

Ahloowalia (1986) totesi, että somaklooninen muuntelu oli useilla kasvilajeilla vähäistä ja luonteeltaan haitallista erityisesti viljoilla, mikä esti menetelmän yleistymistä kasvinjalostuksessa. Maddock (1986) totesi vehnällä vain vähäistä somakloonista muuntelua. Tämän vuoksi oli tärkeää lisätä geneettistä muuntelua kasvinjalostajien hyödynnettäväksi yhdistämällä mutageneesi ja solukkoviljely. Jain (1996c) säteilytti *in vitro* -viljelyistä mansikantaimista eristettyjä auksiliaarisilmuja gamma-säteillä ja havaitsi, että 5 % kasveista oli kestäviä, kun *Phytophthora cactorum* -taudinaiheuttajan raakautetta käytettiin valintapaineen li-

säämiseksi. Samat kasvit kestivät lisäksi 5-6 päivän kuivuuskäsittelyä. Vaikutti siltä, että taudinkestävyyden kannalta tärkeillä proteiineilla (pathogen-related proteins) on merkitystä myös kuivuudenkestävyydessä. Eddo Rugini (henkilökohtainen tiedonanto) osoitti endogeenisten fenolien lisääntyneen mansikantaimissa, jotka oli valittu *in vitro* *Rhizoctonia fragariae* -toksiinia kestäviksi, ja samat versot olivat kestäviä myös *Botrytis cinerea* -taudinaiheuttajaa vastaan.

Banerjee & Kalloo (1989) havaitsivat kasvitauteja ja tuholaisia kestävän villitomaatin (*Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*) kokonaisfenolipitoisuuden korkeaksi verrattuna taudinaiheuttajille herkkään viljeltyyn tomaattiin (*Lycopersicon esculentum*). He ehdottivat fenolipitoisuutta yhdeksi parametriksi viljellyllä tomaatilla valittaessa tautia ja tuholaisia kestäviä linjoja. Gavazzi *et al.* (1987) havaitsivat tomaatilla ja Jain & Newton (1988, 1989) rapsilla (*Brassica napus*), että somakloonisen muuntelun ja indusoidun mutageneesin aiheuttamat muutokset periytyivät eri tavoin, mikä näkyi eri-

laisissa segregaatiosuhteissa. Cheng *et al.* (1990) käyttivät mutageeneina gamma-säteilytystä, natriumatsidia ja etyylimetaanisulfonaattia ja osoittivat, että mutageenien aiheuttamat haittavaikutukset, kuten korren lyheneminen, fertiiliyden heikentyminen ja tähkän lyheneminen, eivät olleet huomattavia regeneroiduissa kasveissa verrattuna käsittelemättömiin kasveihin. Lisäksi mutageenin jälkeen tuotetuissa somaklooneissa muuntelu voi olla luonteeltaan synergististä ja tuottaa siten enemmän valinnan mahdollisuuksia kasvien ominaisuuksien parantamiseksi. Huolimatta hyödyllisistä tuloksista tarvitaan lisää panostusta *in vitro* -mutageenin menetelmän kehittämiseksi, jotta voidaan luoda yhä enemmän hyödyllistä muuntelua yhdessä somakloonisen muuntelun kanssa. Taulukossa 4 on esitetty indusoidun mutaation tuloksena valittuja viljeltyjen kasvien mutantteja, joilla on viljelyllisesti tärkeitä ominaisuuksia. Metsäpuilla tiedot mutageenisistä ovat vähäisiä.

## Somaklooninen muuntelu koristekasveilla

Koristekasvien solukkoviljelyn seurauksena on havaittu somakloonista muuntelua kasvin ja lehden morfologian, kukan värin ja muodon sekä lehtien värityksen suhteen (Taulukko 5). Jain (1993a, b) osoitti pauliinabegonialla (*Begonia x elatior*), että regeneranteissa, jotka oli tuotettu lehtilavasta indusoidusta kalluksesta, oli somakloonista muuntelua useissa ominaisuuksissa, kuten kukan koossa, kasvin korkeudessa, kasvin morfologiassa ja kukkien lukumäärässä. Samanlaista muuntelua havaittiin paavalinkukan (*Saintpaulia ionantha* L.) lehtilavasta suoraan, ilman kallusvaihetta regeneroiduissa kasveissa. Kummallakaan lajilla ei havaittu muuntelua kukan värissä (Jain 1993a, b). Kukan värin muuntelua on havaittu solukkoviljelmistä regeneroiduissa kasveissa neilikalla (Silvy & Mitteau 1986), krysanteemilla (Khalid *et al.*

1989) ja gerberalla (Buiatti & Gimelli 1993). Valittuja somaklooneja voitiin seuraavissa sukupolvissa mikrolisätä muutosten häviämättä. Jain (1993a, b) ei havainnut pauliinabegonialla ja paavalinkukalla muuntelua kukkien lukumäärässä kokeessa, jossa somaklooneja oli mikrolisätty kaksi sukupolvea. Koristekasveilla somakloonista muuntelua voidaan hyödyntää kaupallisesti.

## Geneettinen yhdenmukaisuus ja somaklooninen muuntelu

Somaklooninen muuntelu ei ole toivottavaa massalisäyksessä eikä pyrittäessä lisäämään geneettisesti alkuperäisen kaltaisia puuvartisia ja koristekasveja (Heinze & Schmidt 1995). Muuntelusta seuraavat taloudelliset tappiot voivat olla erittäin suuria, kun kyseessä ovat metsäpuut tai muut puuvartiset kasvit, joiden kasvu jatkuu vuosia. On erittäin tärkeää säilyttää geneettinen pysyvyys tuotettaessa solukkoviljelyn avulla lisäsmateriaalia metsitykseen. Geneettiset muutokset eivät aina ilmene morfologisina tai fysiologisina muutoksina, koska geenituotteiden rakennemuutokset eivät välttämättä vaikuta niiden biologiseen aktiiviteettiin niin paljon, että muutokset näkyisivät fenotyypissä. ”Hiljaiset mutaatiot” morfologisella ja fysiologisella tasolla ovat tärkeitä, koska niiden avulla voidaan arvioida *in vitro* -viljelyn seurauksena syntyneiden genomimuutosten määrää (Sabir *et al.* 1992). Isoentsyymit ovat osoittautuneet käyttökelpoisiksi merkeiksi arvioitaessa somakloonista muuntelua omenan juurivesojen lehtisolukosta tuotetuissa regeneranteissa (Martelli *et al.* 1992). Shenoy & Vasil (1992) analysoivat somaattisista alkioista regeneroituja elefanttiheinä (*Pennisetum purpureum* K. Schum). He käyttivät useita isoentsyymejä löytämättä muuntelua, mikä viittasi regeneranttien yhdenmukaisuuteen ja lisäsi niiden arvoa kloonauksessa ja geneettisessä transformaatiossa. Somaattisen embryogeneenin kaut-

**Taulukko 5.** Esimerkkejä somakloonisesta muuntelusta koristekasveissa

Laji	Mutageenikäsittely	Parantunut ominaisuus
kaura*	gamma-säteilytys	ruosteenkestävyys
sareptansinappi*	gamma-säteilytys	aikaisuus
<i>Chrysanthemum</i> sp.*	gamma-säteilytys	kukan väri
soijapapu*	gamma-säteilytys	aikaisuus, siemenen väri, taudinkestävyys
<i>Gossypium</i> sp.*	gamma-säteilytys	puolikääpiö kasvutapa
riisi*	gamma-säteilytys	aikaisuus, taudinkestävyys, laonkestävyys, suolankestävyys, kylmänkestävyys, jyvän laatu
<i>Rosa</i> sp.*	gamma-säteilytys	kukan väri
seesami*	gamma-säteilytys	öljyn laatu ja saanto, proteiini
lehmänpapu*	gamma-säteilytys	sato, suolan ja happamuuden kestävyys
vehnä	gamma-säteilytys	kuumuuden kestävyys (Behl <i>et al.</i> 1993)
rapsi	etyylimetaanisulfonaatti	keltainen siemen (Jain & Newton 1988)
puutarhamansikka	gamma-säteilytys	taudinkestävyys, kuivuuden kestävyys (Jain 1997c)

\* Mutation breeding newsletter, 1996, Volume 42

ta regeneroidut kuusen (*Picea abies*) (Heinze & Schmidt 1995), mustakuusen (*Picea mariana*) (Isabel *et al.* 1993) ja muiden puuvartisten kasvien taimet on samoin osoitettu identtisiksi klooniksi (Haque *et al.* 1992) käyttämällä RAPD- ja RFLP-merkkejä (Merkle *et al.* 1988). Taylor *et al.* (1995) havaitsivat embryogeenistä viljelmistä regeneroiduissa sokeriuo' on taimissa hyvin vähän RAPD-polymorfismia, mikä viittaa siihen, että geneettiset kokonaisuudet ovat solukkoiljelyssä vähäisiä. Rani *et al.* (1995) identifioivat somaklooneja amerikanmustapoppelilla (*Populus deltoides*) käyttäen RAPD-merkkejä. Kahdestakymmenestä kolmesta kasvusta, jotka oli lisätty yhdestä ainoasta kloonista, kuusi poikkesi lopuista kuten myös kentällä kasvatetuista kasveista kolmentoista polymorfismin verran, kun käytettiin viittä aluketta. Tämä tulos paljasti yhden ainoan somaattisen mutaation, joka edelsi so-

lunjakautumista ja johti kuuteen identtiseen mutantiin. On olemassa monentyyppistä DNA-muuntelua, jota ei voi osoittaa RAPD-analyysillä, kuten harvinaisia pistemutaatioita ja geenien tai kromosomien moninkertaistumisia. Jotkut kyseisistä muutoksista ovat tuskin havaittavissa millään nykyisistä DNA-analyysimenetelmistä. AFLP (amplified fragment length polymorphism) -tekniikka parantaa geneettisen muuntelun analysointimahdollisuuksia. Kyseinen menetelmä tuottaa runsaasti geneettisiä merkkejä ja saattaa soveltua suhteellisen vähäisten somakloonisten muutosten toteuttamiseen (Thomas *et al.* 1995).

Morfologisina muutoksina ilmenevää somakloonista muuntelua havaittiin runsaasti santelipuun (*Santalum album*) taimissa, jotka oli regeneroitu varren palasista indusoidusta embryogeenisestä kalluksesta syntyneistä somaattisista alkioista (Rao *et al.* 1984). Somakloo-

nisen muuntelun määrä ilmeisesti lisääntyy *in vitro* -viljelyn keston myötä erityisesti, kun solukot ovat kallis- tai suspensiomuodossa (Deverno 1995). Somaattisia embryogeenisiä viljelmiä voidaan kryosäilyttää. Tällöin geneettistä materiaalia ei tarvitse säilyttää säännöllisesti uudistettavissa solukkoviljelmissä. Geneettisen alkuperän pysyvyys solukkoviljelmistä regeneroiduissa kasveissa on erittäin tärkeää, jotta voidaan säilyttää arvokkaan kasvimateriaalin geneettinen muuttumattomuus.

## Johtopäätökset

Somaklooninen muuntelu ja mutageneesi ovat ideaalisia tapoja tuottaa laajalti geneettistä muuntelua kasvinjalostuksessa hyödynnettäväksi. Viljoilla somaklooninen muuntelu on ilmeisesti vähäisempää kuin muilla kasveilla,

mikä saattaa johtua tapahtuneesta karsiutumuksesta. *In vitro* -mutageneesi saattaisi osoittautua erinomaiseksi mahdollisuudeksi luoda runsaasti muuntelua. Viljelyllisesti hyödyllisiä somaklooneja ja mutantteja voitaisiin käyttää geenien identifioimiseen, eristykseen ja transformointiin. Fysikaalisten tai kemiallisten mutageenien avulla tuotettujen indusoitujen mutaatioiden etuna saattaa olla, että DNA-metylaatio-ongelma voidaan välttää, koska geneettiset muutokset eivät ole seurausta vieraiden geenien tuomisesta kasviin. On todennäköistä, että kasvin omat suojautumismekanismit vierastavat minkä tahansa vieraan geenin tuontia ja voivat aiheuttaa siirtogeenin "hiljentymisen". Valittujen somakloonien geneettinen pysyvyys on erittäin tärkeää, jotta DNA-metylaatio ei aiheuta geneettistä epävakautta.

## Kirjallisuus

**Ahloowalia, B. S.** 1986. Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. In: Semal, L. (ed.). Somaclonal variation and crop improvement. Proceedings of a seminar, Glebloux, Belgium, September 3–5, 1985. Advances in agricultural biotechnology. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. p. 14–27. ISBN 90-247-3301-4

**Banerjee, M. K. & Kalloo,** 1989. Role of phenols in resistance to tomato leaf curl virus, Fusarium wilt and fruit borer in *Lycopersicon*. Current Science 58: 575–576.

**Barakat, M. N. & Abdel-Latif, T. H.** 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. Euphytica 91: 127–140.

**Bebeli, P. J., Kaltsikes, P. J. & Karp, A.** 1993. Field evaluation of somaclonal variation in rye lines differing in telomeric heterochromatin. Journal of Genetics and Breeding 47: 15–22.

**Behl, R. K., Nainawatee, H. S. & Singh, K. P.** 1993. High temperature tolerance in wheat. In: International crop science 1. Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin. p. 349–355. ISBN 0-89118-538-0

**Behnke, M.** 1979. Selection of potato callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora*

*infestans* and regeneration of resistant plants. Theoretical and Applied Genetics 55: 69–71.

**Behnke, M.** 1980a. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrate of *Phytophthora infestans*. Theoretical and Applied Genetics 56: 151–152.

**Behnke, M.** 1980b. Selection of dihaploid potato callus for resistance to culture filtrate of *Fusarium oxysporium*. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung 85: 254–258.

**Buiatti, M. & Gimelli, F.** 1993. Somaclonal variation in ornamentals. In: Schiva, T. & Mercuri, A. (eds). Creating genetic variation in ornamentals. Istituto Sperimentale per la Floricoltura, Sanremo, Italy. p 5–24. ISBN 99-900024-0-9

**Chaleff, R. F.** 1980. Further characterization of picloram-tolerant mutants of *Nicotiana tabacum*. Theoretical and Applied Genetics 58: 91–95.

**Chaleff, R. F. & Parsons, M. F.** 1978. Direct selection *in vitro* for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75: 5104–5107.

- Chawla, H. S. & Wenzel, G.** 1987a. *In vitro* selection for fusaric acid resistant barley plants. *Plant Breeding* 99: 159–163.
- Chawla, H. S. & Wenzel, G.** 1987b. *In vitro* selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 841–845.
- Chawla, H. S. & Wenzel, G.** 1989. Resistant wheat plants against *Helminthosporium sativum* from embryo-derived callus cultures. *Wheat Information Service* 69: 8–12.
- Cheng, X. Y., Gao, M. W., Liand, Z. Q & Liu, A. Z.** 1990. Effect of mutagenic treatments on somaclonal variation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding* 105: 47–52.
- Crino, P., Lai, A., Bonito, R. D. & Veronese, P.** 1994. Genetic variability in tomato plants regenerated from irradiated cotyledons. *Journal of Genetics and Breeding* 48: 281–290.
- Deverno, L. L.** 1995. An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis. In: Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J. (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Volume 1: 361–377. ISBN 0-7923-3035-8
- Dorffling, K., Dorffling, H. & Lesselich, G.** 1993. *In vitro* selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. *Journal of Plant Physiology* 142: 222–225.
- Evans, D. A.** 1989. Somaclonal variation - genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics* 5: 46–50.
- Gavazzi, G., Tonelli, C., Todesco, G., Arreghini, E., Raffalid, F., Vecchio, F., Barbuzzi, G., Biasini, M. G. & Sala, F.** 1987. Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 74: 733–738.
- Gonzalez, A. I., Pelaez, M. I. & Ruiz, M. L.** 1996. Cytogenetic variation in somatic tissue cultures and regenerated plants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* 91: 37–43.
- Hammerschlag, F. A.** 1992. Somaclonal variation. In: Hammerschlag, F. A. & Litz, R. E. (eds). *Biotechnology of perennial fruit crops*. Wallington: C A B International. p. 35–55. ISBN 0-85198-708-7
- Haque, N. S., Fish, N. W. & Kiel, M.** 1992. Assessment of somaclonal variation in Eucalyptus using random amplified polymorphic DNA markers. *Proceedings of the Fifth Workshop. IUFRO WK. Party S2.04.06. Carcans-Maubisson, INRA, France, June 15–18.*
- Heinze, B. & Schmidt, J.** 1995. Monitoring genetic fidelity vs. somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica* 85: 341–345.
- Infante, R., Gonelli, S., Rosati, P. & Mazzara, M.** 1996. Long-term cell suspension culture and regeneration of the single-leafed strawberry *Fragaria vesca monophylla*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 196–200.
- International Atomic Energy Agency,** 1995. Annual report, Vienna, Austria. 25 p.
- Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay, E. F. M. & Bousquet, J.** 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill). *BSP. Theoretical and Applied Genetics* 86: 81–87.
- Jain, S. M.** 1993a. Somaclonal variation in *Begonia x elatior* and *Saintpaulia ionantha* L. *Scientia Horticulturae* 54: 221–231.
- Jain, S. M.** 1993b. Growth hormonal influence on somaclonal variation in ornamental plants. In: Schiva, T. & Mercuri, A. (eds). *Creating genetic variation in ornamentals*. Istituto Sperimentale per la Floricoltura, Sanremo, Italy. p 93 103. ISBN 99-900024-0-9
- Jain, S. M.** 1997a. Biotechnology of industrially important tree species in developing countries. (in press)
- Jain, S. M.** 1997b. Plant biotechnology and mutagenesis for sustainable crop improvement. (in press)
- Jain, S. M.** 1997c. Creation of variability by mutation and tissue culture in improving plants. (in press)
- Jain, S. M.** 1997d. Plant tissue culture and *in vitro* mutagenesis in plant improvement. (in press)
- Jain, S. M. & Newton, R. J.** 1988. Proto-variation in protoplast derived *Brassica napus* plants. In: Puite, K. J., Dons, J. J. M., Huizing, H. J., Kool, A. J., Koornneef, M. & Krens, A. F. (eds). *Progress in plant protoplast research*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 403–404. ISBN: 90-247-3688-9
- Jain, S. M. & Newton, R. J.** 1989. Evaluation of protoclonal variation versus chemically induced

- mutagenesis in *Brassica napus*. *Current Science* 58: 176–180.
- Jain, S. M., Gupta, P. K. & Newton, R. J.** (eds) 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Volumes 1–3. ISBN 0-7923-3035-8, ISBN 0-7923-3070-6, ISBN 0-7923-2939-2
- Jain, S. M., Brar, D. S. & Ahloowalia, B. S.** (eds) 1997. Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. (in press)
- Khalid, N., Davey, M. R. & Power, J. B.** 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of commercial value. *Scientia Horticulturae* 38: 287–294.
- Kirti, P. B., Hadi, S., Kumar, P. A. & Chopra, V. L.** 1991. Production of sodium chloride tolerant *Brassica juncea* plants by *in vitro* selection at the somatic embryo level. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 233–237.
- Larkin, P. J. & Scowcroft, S. C.** 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197–214.
- Maddock, S. E.** 1986. Somaclonal variation in wheat. In: Semal, L. (ed.). Somaclonal variation and crop improvement. Proceedings of a seminar, Glebloux, Belgium, September 3-5, 1985. *Advances in agricultural biotechnology*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. p. 127–137. ISBN 90-247-3301-4
- Maluszynski, M., Ahloowalia, B. S. & Sigurbjörnsson, B.** 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85: 303–315.
- Martelli, G., Greco, I., Mezzetti, B. & Rosati, P.** 1993. Isozymic analysis of somaclonal variation among regenerants from apple root stock leaf tissue. *Acta Horticulturae* 336: 381–387.
- Merkle, S. A., Chou, P. L. & Sommer, H. E.** 1988. Stability of highly repeated sequences in the DNA of embryogenic cultures of yellow poplar. In: Cheliak, W. M. & Yapa, A. C. (eds). *Molecular genetics of forest trees*. Petawawa National Forestry Institute Information Report PI-X-80. p. 85–88.
- Micke, A., Donini, B. & Maluszynski, M.** 1990. Induced mutations for crop improvement. *Mutation Breeding Review No. 7*. 41 p.
- Nabors, M. W.**, 1983. Increasing the salt and drought tolerance of crop plants. In: Randall, D. D., Blevins, D. G., Larson, R. L. & Rapp, B. J. (ed.). *Current topics in plant biochemistry and physiology*. Columbia: University of Missouri Press. Volume 2: 165–184.
- Nehra, S. N., Chibber, R. N., Kartha, K. K., Datla, R. S. S., Crosby, W. L. & Stushnoff, C.** 1990. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Reports* 9: 293–298.
- Ramos Leal, R., Maribona, R. H., Ruiz, A., Korneva A.** 1996. Somaclonal variation as source of resistance to eyespot disease of sugarcane. *Plant Breeding* 115: 3–42.
- Rani, V., Parida, A. & Raina, S. N.** 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Reports* 14: 459–462.
- Rao, P. S., Bapat, V. A. & Mhatre, M.** 1984. Regulatory factors for *in vitro* multiplication of sandalwood tree (*Santalum album*) 2. Plant regeneration in nodal and internodal stem explants and occurrence of somaclonal variations in tissue culture raised plants. *Proceedings of the Indian National Academy of Sciences* 50: 196–202.
- Remotti, P. C.** 1997. Somaclonal variation and *in vitro* selection for crop improvement. In: Jain, S. M., Brar, D. S. & Ahloowalia, B. S. (eds). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. (in press)
- Rietveld, R. C., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A.** 1991. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. I. Evidence of genetic stability across tuber generations and diverse locations. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 430–440.
- Sabir, A., Newbury, H. J., Todd, G., Catty, J. & Ford-Llyod, B. V.** 1992. Determination of genetic stability using isozymes and RFLPs in beet plants regenerated *in vitro*. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 113–117.
- Shahin, E. A. & Spivey, R.** 1986. A single dominant gene for *Fusarium* wilt resistance in protoplast-derived tomato plants. *Theoretical and Applied Genetics* 73:164–169.
- Sharpe, F. T. & Schaffer, G. W.** 1993. Distribution of amino acids in bran, embryo and milled endosperm and shifts in storage protein subunits

of *in vitro* -selected and lysine-enhanced mutant and wild type rice. *Plant Science* 90: 145–154.

**Shenoy, V. B. & Vasil, I. K.** 1992. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theoretical and Applied Genetics* 83: 947–955.

**Shepard, J. F.** 1981. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 19: 145–166.

**Sibi, M.** 1976. La notion de programme genetique chez les vegetaux superieurs.II.Aspect experimental. Obtention de variants de vigueur chez les croisements. *Annales de l'amelioration des plantes* 26: 523–547.

**Silvy, A. & Mitteau, Y.** 1986. Diversification des varietes d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) par traitement mutagene. In: *Proceedings of the International Symposium on Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement*. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 1985. Vienna: IAEA. p. 385–407. ISBN 92-0-010086-4

**Skirvin, R. M. & Janick, J.** 1976. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 101: 281–290.

**Skirvin, R. M., Norton, M. & McPheeters, K. D.** 1993. Somaclonal variation: Has it proved useful for plant improvement? *Acta Horticulturae* 336: 333–340.

**Stephens, P. A., Nickell, C. D. & Widholm, J. M.** 1991. Agronomic evaluation of tissue-culture-derived soybean plants. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 633–635.

**Taylor, P. W. J., Geijskes, J. R., Ko, H. L., Fraser, T. A., Henry, T. J. & Birch, R. G.** 1995. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1169–73.

**Thomas, C. M., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D. A., Norcott, K. A., Chadwick, B. P. & Jones, J. D. G.** 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium luvum*. *Plant Journal* 8: 785–794.

**Winicov, I.** 1991. Characterization of salt tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants regenerated from salt tolerant cell lines. *Plant Cell Reports* 10: 561–564.

**Winicov, I.** 1996. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. *Plant Science* 13: 105–111.



# Perunan dihaploidituotanto ja protoplastifuusio

---

Veli-Matti Rokka<sup>1</sup>, Leena Pietilä<sup>2</sup> & Eija Pehu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MTT, Kasvintuotannon tutkimuslaitos, Kasvinjalostuksen tutkimusala,  
31600 Jokioinen

<sup>2</sup> Boreal Suomen Kasvinjalostus, 31600 Jokioinen

<sup>3</sup> Kasvintuotantotieteen laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto

e-mail: [veli-matti.rokka@mtt.fi](mailto:veli-matti.rokka@mtt.fi)

Perunan (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) lajikejalostus on hankalaa johtuen perunan tautien monimuotoisuudesta ja kasvin polyploidista ( $2n=4x=48$ ) genomista. Jokioisissa, MTT:n Kasvinjalostuksen tutkimusosalalla, on selvitetty yhteistyössä Helsingin yliopiston ja Boreal Suomen Kasvinjalostuksen kanssa erilaisten solukkoviljelymenetelmien soveltamista perunanjalostukseen. Uusien lajikkeiden tuottoa pyritään nopeuttamaan ja tehostamaan käyttämällä jalostuksessa ponsiviljelmiä ja protoplastifuusioita. Ponsiviljelyllä on tuotettu dihaploideja ( $2n=2x=24$ ) perunalinjoja useista viljellyistä lajikkeistamme. Dihaploideja kasveja on käytetty protoplastifuusioihin, sillä somaattisessa hybridisaatiossa eri ominaisuuksien yhdistely on tehokkaampaa kuin suvullisin pölytyksin. Lisäksi dihaploideja *S. tuberosum* -linjoja on käytetty lajienvälisessä hybridisaatiossa fuusioimalla niitä *S. brevidens* -lajin kanssa viruskestävyyden siirtämiseksi viljeltyyn perunaan. Tutkimuksessa on tuotettu sekä somatohaploideja että takaisin fuusioituja hybridejä, joita on tutkittu virtausytometrian ja kromosomien *in situ* -hybridisaation avulla. Tutkimus jatkuu *S. acaule* -lajin haploidien tuotolla.

*Avainsanat:* *Solanum tuberosum*, solukkoviljely, somaattiset hybridit, taudinkestävyys

# Abstract

## Dihaploid production and protoplast fusion of potato

Veli-Matti Rokka<sup>1</sup>, Leena Pietilä<sup>2</sup> & Eija Pehu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Agricultural Research Centre of Finland, Institute of Crop and Soil Science,  
Plant Breeding Section, FIN-31600 Jokioinen*

<sup>2</sup> *Boreal Plant Breeding, FIN-31600 Jokioinen*

<sup>3</sup> *Department of Plant Production, P. O. BOX 27, FIN-00014 University of Helsinki  
e-mail: veli-matti.rokka@mtt.fi*

Breeding new potato varieties (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) is difficult because of heterogeneous diseases and the polyploid ( $2n=4x=48$ ) genome of potato. In Jokioinen, at the Plant Breeding Section of MTT, there has been an ongoing research programme, in co-operation with the University of Helsinki and Boreal Plant Breeding, on application of tissue culture methods to potato breeding. The aim is to enhance breeding new varieties using anther culture and protoplast fusion. Dihaploid ( $2n=2x=24$ ) potatoes from a number of cultivated varieties have been produced via anther culture. Dihaploids have been used in protoplast fusion to combine more effectively different agronomic traits using somatic hybridization instead of sexual combination. Dihaploid *S. tuberosum* lines have also been used in interspecific hybridization by fusion with *S. brevidens*, a wild potato species, to transfer virus resistance characters to cultivated potato. Out of this material we have produced both somatohaploids and backfused hybrids that have been researched using flow cytometry and *in situ* hybridization on chromosomes. The research work is continuing with production of haploids from *S. acule*.

*Key words:* disease resistance, *Solanum tuberosum*, somatic hybrids, tissue culture

# Johdanto

Peruna (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) on luokiteltu maailman neljänneksi tärkeimmäksi ravintokasviksi (Hawkes 1994). Myös Suomessa peruna on merkittävä, perinteiseen ruokavalioomme kuuluva viljelykasvi. Suomesta perunaa viedään hieman ulkomaille, mm. Norjaan, Ruotsiin ja Venäjälle. Viime aikoina myös siemenperunan tuotanto ja vientimahdollisuudet ovat lisääntyneet, koska Pohjois-Pohjanmaan kolmen kunnan alue (Tyrvävä, Liminka, Temmes) on ollut vuodesta 1994 yksi EU:n siemenperunatuotannon erityisalueista.

Uusien, entistä parempien perunalajikkeiden jalostus on tarpeellista, sillä perunaa vaivaavat monet kasvitaudit, jotka heikentävät sekä satoa että mukuloiden laatua. Perunalajikkeita on jalostettu Suomessa intensiivisesti vasta 1980-luvun puolivälistä alkaen, kun peruna sai oman jalostajan. Nykyisin perunaa jalostetaan Boreal Suomen Kasvinjalostuksessa, Jokioisissa.

Perinteinen perunanjalostus perustuu suvullisiin risteytyksiin. Tetraploideja ( $2n=4x=48$ ) lajikkeita tai jalostuslinjoja, joilla on mielenkiintoisia taudinkestävyyttä tai laatuominaisuuksia, risteytetään keskenään, mutta lajin polyploidisuus ja suuri kromosomiluku aiheuttavat ongelmia. Kromosomien segregaa-tion ja rekombinaatioiden johdosta haluttujen ominaisuuksien yhdistäminen samaan lajikkeeseen on vaikeaa. Jalostus vaatii useita pölytyksiä ja runsaan siemenmateriaalin, josta saadut jälkeläiset testataan kenttäkokein, taudinkestävyydestein ja laatuanalyysin. Jalostus, jossa työskennellään suurilla aineistoilla, on kallista ja vaatii aikaa. Uuden lajikkeen aikaansaaminen on 10-15 vuoden työn tulos.

Koska perunanjalostus on hidasta, on pyritty kehittämään uusia jalostusmenetelmiä, jotka perustuvat mm. biotekniikan hyväksikäyttöön (Wenzel *et al.* 1979). Lajikejalostusta pyritään siirtämään tetraploidilta diploidille ( $2n=2x=24$ ) tasolle. Dihaploideja linjoja tuotetaan partenogeneesiin (Hougas & Peloquin 1957) tai androgeneesiin (Dunwell & Sunderland 1973) avulla. Käsitykset partenogeneesi-

sistä (pseudogamiasta), joka perustuu tetraploidien *S. tuberosum* -linjojen pölytykseen *S. phureja* -lajilla, ovat ristiriitaisia. *Solanum phureja* -lajista siirtyy yksittäisiä kromosomeja tai DNA-fragmentteja dihaploideihin kasveihin (Clulow *et al.* 1991), mikä saattaa vaikeuttaa niiden käyttöä jalostuksessa tai taudinkestävyysominaisuuksien geneettisessä tutkimuksessa. Ponsiviljely (androgeneesi) vaatii kuitenkin enemmän teknistä työtä. Ponsiviljelmisessä harvat genotyypit muodostavat alkioita ja erityisesti tetraploidi *S. tuberosum* on osoittautunut hankalaksi kasviksi (Wenzel 1994).

Dihaploideja perunalinjoja voidaan risteyttää suvullisesti, jolloin jalostus tehostuu dihaploidien tuottamien diplogameettien (redusoitumattomien gameettien) avulla (Chase 1963). Tehokkaampi menetelmä saattaa olla protoplastifuusio (Power *et al.* 1970). Dihaploideista perunoista eristetään protoplasteja, joita fuusoidaan joko kemiallisesti tai sähköisen fuusion (elektrofuusion) avulla (lajinsisäinen hybridisaatio). Protoplastifuusion etuna on meioosin segregaa-tion puuttuminen. Monet tetraploidit lajikkeet ovat myös steriilejä tai linjojen suvullinen risteyttäminen ei onnistu joutu- en muusta yhteensopimattomuudesta. Protoplastifuusion tuloksena saaduissa somaattisissa hybrideissä ilmenevät molempien dihaploidien vanhempien dominantit ominaisuudet (Wenzel *et al.* 1979). Myös muiden ominaisuuksien yhdistyminen hybrideissä tehostuu.

Somaattista hybridisaatiota käytetään myös eri lajien väliseen hybridisaation. Peruna on geneettiseltä taustaltaan melko kapea. Vaihtelua haetaan sen sukulaislajeista, joita ei pystytä suvullisesti risteyttämään *S. tuberosum*in kanssa. Perunan ensimmäinen lajien välinen somaattinen hybridi tehtiin vuonna 1978, kun peruna ja tomaatti hybridisoitiin ns. pomaatiksi (Melchers *et al.* 1978). Tuloksena ei syntynyt lajia, joka tuottaisi perunan mukuloiden ja tomaatin hedelmiä. Tällaiset hybridit ovat kuitenkin tuottaneet tietoa somaattisten hybridien sytologiasta (Jacobsen *et al.* 1995). Somaattisissa fuusioissa on myös käytetty sybridisaatiota (sytoplasman siirtoa) (Aviv *et al.* 1984) ja epäsymmetristä hybridisaatiota, jossa villilajin protoplastit säteilytetään, jolloin vain osa genomista siirtyy vastaanottajaprotoplastille

(Zelcer *et al.* 1978). Lisäksi mikroprotoplasteja ja niiden käyttöä perunanjalostuksessa on tutkittu (Ramulu *et al.* 1996).

Jokioisissa perunan bioteknisiä menetelmiä on tutkittu vuodesta 1988 alkaen. Yhteistyö Helsingin yliopiston ja Boreal Suomen Kasvinjalostuksen kanssa on ollut tuloksellista. Näillä menetelmillä tuotettuja perunalajikkeita saamme kuitenkin odottaa vielä vuosia.

## Aineisto ja menetelmät

### Tetraploidin perunan (*S. tuberosum*) ponsiviljely

Tetraploidien perunoiden ponsiviljelyssä käytettiin materiaalina sekä kasvihuoneessa että kentällä kasvatettujen perunoiden nappuja. Menetelmät kasvihuoneolosuhteiden, nappujen steriloinnin, ponsien eristyksen, kasvatusalustojen ja ponsien inkubointiolosuhteiden suhteen on aiemmin julkaistu (Tiainen 1992, Rokka *et al.* 1996a). Vuosien 1991-94 aikana testattiin 48 tetraploidin perunan genotyypin ponsiviljelykyky. Regeneroituneiden versojen ploidiataso tutkittiin kromosomianalyysin (Rokka *et al.* 1996a) ja virtausytometrialla (FacsSort, Becton-Dickinson, USA) (Rokka *et al.* 1995).

### *S. tuberosum* -lajin dihaploidien protoplastifuusiot

Ensimmäiset kahden eri dihaploidin *S. tuberosum* -linjan väliset protoplastifuusiot tehtiin vuosina 1992-94 Rokan työryhmän menetelmän mukaan (Rokka *et al.* 1996b). Hybridisyyden määrittäminen regeneroituneista versoista tehtiin RAPD-menetelmällä, jossa vertailtiin vanhempaislinjojen sekä fuusioregeneranttien DNA-kuvioita. Vuoden 1996 aikana on fuusioitu perunanjalostajan valitsemissa dihaploideja. Tavoitteena on tuottaa aikaisia tarkkelysperunahybridejä.

### Lajienväliset protoplastifuusiot, somatohaploidit, takaisinifuusiot ja *in situ* -hybridisaatio

Kaksi eri perunalajia (diploidi *S. brevidens* ja dihaploidi *S. tuberosum*) fuusioitiin vuonna 1992 (Rokka *et al.* 1994). *Solanum brevidens* on villi perunalaji, jolla on äärimmäinen kierrelehtiviruksen sekä Y- ja A-virusten kestävyys (Valkonen *et al.* 1992). Somaattiset hybridit karakterisoitiin RAPD-merkeillä, kromosomianalyysin ja viruskestävyydestein (Rokka *et al.* 1994, Valkonen *et al.* 1994). Hybridit olivat takaisinristeytyksissä (Rokka *et al.* 1994) sekä ponsiviljelmissä somatohaploidien tuottamiseksi (Rokka *et al.* 1995, Rokka *et al.* 1997). Ponsiviljelyllä tuotetut somatohaploidit testattiin virustestein ja virtausytometrialla. Kierrelehtivirukselle kestävä somatohaploidi fuusioitiin uudelleen dihaploidin *S. tuberosum* -linjan kanssa (takaisinifuusio).

*In situ* -hybridisaatiota käytettiin *S. brevidens* -lajin kromosomien tutkimuksessa. Työ tehtiin Colorado State Universityssä, Fort Collinsissa, USA:ssa. Siinä käytettiin *Solanum brevidens* -lajista eristettyä toistuvajaksoista DNA:ta, joka on lajispesifistä ja eroaa *S. tuberosum* -lajin DNA:sta (Pehu *et al.* 1990). *In situ* -hybridisaatiossa käytettiin muunnellen Lapitanin työryhmän julkaisemaa ohjetta (Lapitan *et al.* 1989). Kaksi *S. brevidens* -lajin koetinta (pSB1 ja pSB7) leimattiin biotiini-14-dATP:lla ja digoksigeniini-11-dUTP:lla ja hybridisoitiin *S. brevidens* -lajin, somaattisten hybridien ja somatohaploidien kasvien somaattisiin metafaasivaiheessa oleviin kromosomeihin. Fluoresenssireaktio detektoitiin avidiini-DN:lla (vihreä reaktio) ja rodamiini-antidigoksigeniinilla (punainen reaktio) digitaalikuvausta käyttäen (Brown *et al.* 1995).

### *Solanum acaule* -lajin solukkoviljelytutkimus

*Solanum acaule* on segmentaalisesti allotetraploidi perunalaji, jota ei voida risteyttää tetraploidin *S. tuberosum* -perunan kanssa. *Solanum acaule* -lajilla on useita resistenssiominaisuuksia.

sia, mm. hallankestävyys ja kylmänkestävyys, useiden virustautien kestävyys, peruna-anke-roisten kestävyys (Hawkes 1994) sekä vaalean rengasmädän kestävyys (Ishimaru *et al.* 1994). *Solanum acaule* -lajia käytettiin Jokioisissa ponsiviljelykokeissa.

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

### Tetraploidin perunan ponsiviljely ja dihaploidien tuotto

Perunan ponsiviljelykokeet ovat tuottaneet Jokioisissa noin 1000 regenerantia. Kokeissa testatut eri genotyypit voitiin luokitella ponsiviljelykyvyiltään hyvin embryogeenisiin, embryogeenisyydeltään keskitasoisiin ja alkioita tuottamattomiin linjoihin. Hyvin embryogeenisiä perunalajikkeita olivat Calgary (Alankomaat), Kardal (Saksa), Nicola (Saksa), Petra (Saksa), Pito (Suomi), Satu (Suomi), Torridon (Britannia), Van Gogh (Alankomaat) ja White Lady (Unkari). Noin 90 % regeneranteista on tuotettu näistä lajikkeista. Kenttäkokeissa on viime vuosina ollut yli 500 dihaploidia. Aikaisemmin ei viljellyistä perunalajikkeista ole missään tuotettu ponsiviljelyllä yhtä runsaasti dihaploideja jälkeläisiä.

Perunan ponsiviljelyssä saatiin dihaploidien (2x) kasvien lisäksi myös tetraploideja (4x), oktoploideja (8x) ja miksuploideja jälkeläisiä (Rokka *et al.* 1996a). Tietyillä lajikkeilla (esim. Torridon ja Pito) muodostui lähes yksinomaan 4x-ponsiviljelyjälkeläisiä, mutta toisilla lajikkeilla (esim. White Lady, Calgary ja Satu) lähes yksinomaan 2x-linjoja. Todennäköisesti synyi ei ole yksinomaan solukkoviljelyn aiheuttama kromosomiston polyploidisoituminen, vaan tietyillä lajikkeilla esiintyvä redusoitumattominen gameettien runsas osuus (Rokka *et al.* 1996a). Saatujen tulosten avulla jalostaja voi valita ponsiviljelyyn sellaisia linjoja, joiden risteytysvanhempina on käytetty hyvin androgeenisii genotyyppiä. Perunan androgeenesi

ja versojen regeneroituminen ovat todennäköisesti toisistaan riippumattomia periytyviä geneettisiä ominaisuuksia (Singsit & Veilleux 1989).

### Dihaploidien perunoiden protoplastifuusio

Somaattisia hybridejä, jotka oli tuotettu dihaploideja kasveja fuusioimalla (2x + 2x), saatiin kuudesta yhdistelmästä (Rokka *et al.* 1996b). Useimmat somaattiset hybridit olivat odotetusti tetraploideja, mutta neljästä kombinaatiosta syntyi kasveja, joilla oli heksaploidinen, oktoploidinen tai miksuploidinen genomi. Useiden tetraploidien ja heksaploidien somaattisten hybridien DNA-pitoisuudet (2C-arvot) olivat pienempiä kuin dihaploidien vanhempaislinjojen summat tai alkuperäisten tetraploidien lajikkeiden DNA-pitoisuudet (Rokka *et al.* 1996b). Tämä saattaa johtua pitkän solukkoviljelyn aiheuttamasta aneuploidiasta (hypoploidiasta). Somaattiset hybridit ovat olleet kenttäkokeissa.

Dihaploidi-dihaploidifuusiointimme jatkuvat aikaisten tärkkelysperunahybridien tuotannolla. Lähitulevaisuudessa hybridien valintaan kehitellään virtausytometristä sovellutusta. Tällöin hybridisoituneet solut voidaan valita protoplastivaiheessa, jolloin kaikkien fuusiossa olleiden solujen kasvatusta ei ole tarpeen. Menetelmää tehostaa myös tuotettavien dihaploidien sadontuottokyvyn ja taudinkestävyyden tunteminen. Tällöin fuusioihin voidaan valita parempia genotyyppiä.

### *Solanum brevidens* -tutkimukset

*Solanum brevidens* -lajin ja dihaploidin Pito-lajikkeen protoplastifuusio tuotti useita satoja somaattisia hybridejä (Rokka *et al.* 1994). Useimmat hybridit olivat kimeerisiä tetra- tai heksaploidisia aneuploideja (Rokka *et al.* 1994, Rokka *et al.* 1995). Hybridit olivat äärimmäisen kestäviä PVY<sup>N</sup>- (Rokka *et al.* 1994) ja PVY<sup>O</sup>-viruksille sekä kierrelehtivirukselle (Valkonen *et al.* 1994), mutta eivät tuottaneet mululoita.

Kasvien takaisinristeytysohjelma ei onnistunut, mutta hybrideistä tuotettiin ponsiviljelyn avulla triploideja somatohaploideja kasveja (Rokka *et al.* 1995, Rokka *et al.* 1997). Somatohaploidit olivat äärimmäisen kestäviä kierrelehtivirukselle. Kasvit fuusioitiin uudelleen dihaploidin Van Gogh -lajikkeen kanssa, jotta mukuloiden tuotto lisääntyisi ja viruskestävyyden ilmeneminen *S. tuberosum* -lajin genomissa selviäisi. Takaisinfuusioituidut kasvit olivat edelleen kestäviä kierrelehtivirukselle, mutta eivät yhtä kestäviä kuin *S. brevidens* ja alkuperäiset somaattiset hybridit. Niiden mukuloiden tuotokyky oli parantunut.

*In situ* -hybridisaatiolla todettiin kummankin DNA-kloonin olleen peräkkäisjaksoista DNA:ta (tandemly repeated DNA), joka hybridisoitui *S. brevidens* -lajin kaikkien 24 kromosomin telomeeripäihin. Tietyissä ankaruusolosuhteissa koettimet eivät hybridisoituneet *S. tuberosum* -perunan kromosomeihin. Somaattisten hybridien ja somatohaploidien sytologisessa analyysissä todettiin, että heksaploidit hybridit, jotka olivat ponsiviljelyssä embryogeenisiä, olivat saaneet suurimman osan genomistaan *S. brevidens* -lajilta. Noin 80 % somatohaploidien kromosomeista sisälsi *S. brevidens* -lajin DNA:ta. Tarkka perunan sytologinen analyysi oli hankalaa johtuen kromosomien pienestä koosta ja suuresta lukumäärästä sekä kasvisolumateriaalista, jossa solunseinä ja sytoplasma aiheuttavat taustavärjäytymistä. Lisäksi hybridien sisäiset solujen väliset kromosomimäärien vaihtelut sekä mahdolliset translokaatiot aiheuttavat ongelmia *in*

*situ* -hybridisaatioissa. Tarkempi sytologinen analyysi voisi onnistua genomisella *in situ* -hybridisaatiolla (GISH:llä) (Jacobsen *et al.* 1995).

## ***Solanum acaule* -tutkimukset**

*Solanum acaule* -lajilla olemme tuottaneet ponsiviljelyllä yli 200 haploidia. Aikaisemmin on samalla lajilla julkaistu työ *S. phureja* -pölytyksellä tuotetusta kahdesta haploidista (Camadro *et al.* 1992). *Solanum acaule* -lajin haploidit ovat mielenkiintoisia sekä lajin segmenttaalisien allopolyploidien tutkimiseksi että lajin taudinkestävyyssominaisuuksien periytymisen selvittämiseksi. Haploideja voidaan käyttää protoplastifuusioihin *S. tuberosum* -lajin kanssa. Aiheesta ollaan luomassa kansainvälistä tutkimusohjelmaa.

## **Yhteenveto**

Perunan solukkoviljelymenetelmät alkavat olla jalostuksen käytettävissä. Edistyksestä huolimatta esim. ponsiviljelyn ongelmia ovat eri genotyyppien välinen vaihtelu alkionmuodotuksessa ja versojen regeneraatioissa. Protoplastifuusio vaatii eri linjojen kombinoitumiskyvyn ja pitkän kalluskasvatuksen aiheuttaman somaklonaalisen muuntelun tutkimista. Menetelmiä voidaan kuitenkin jo käyttää perunan tiettyjen ominaisuuksien yhdistelyssä.

# Kirjallisuus

- Aviv, D., Arzee-Gonen, P., Bleichman, S. & Galun, E.** 1984. Novel alloplasmic *Nicotiana* plants by Donor-Recipient protoplast fusion: cybrids having *N. tabacum* or *N. sylvestris* nuclear genomes and either or both plastomes and chondriomes from alien species. *Molecular and General Genetics* 196: 244–253.
- Brown, S. E., Menninger, J., Difillipantonio, M., Beaty, B. J., Ward, D. C. & Knudson, D. L.** 1995. Toward a physical map of *Aedes aegyptii*. *Insect Molecular Biology* 4: 161–167.
- Camadro, E. L., Masuelli, R. W. & Cortés, M. C.** 1992. Haploids of the wild tetraploid potato *Solanum acaule* ssp. *acaule*: generation, meiotic behavior, and electrophoretic pattern for the aspartate aminotransferase system. *Genome* 35: 431–435.
- Chase, S. S.** 1963. Analytical breeding in *Solanum tuberosum* L. - A scheme utilizing parthenotes and other diploid stocks. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 5: 359–363.
- Clulow, S. A., Wilkinson, M. J., Waugh, R., Baird, E. de, Maine, M. J. & Powell, W.** 1991. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja* -induced dihaploid potatoes. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 545–441.
- Dunwell, J. M. & Sunderland, N.** 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica* 22: 317–323.
- Hawkes, J. G.** 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: Bradshaw, J. E. & Mackay, G. R. (eds). *Potato genetics*. Cambridge: CAB International University Press p. 3–42. ISBN 0-85198-869-5
- Hougas, R. W. & Peloquin, S. J.** 1957. A haploid plant of the potato variety Katahdin. *Nature* 180: 1209–1210.
- Ishimaru, C. A., Lapitan, N. L. V., VanBuren, A., Fenwick, A. & Pedas, K.** 1994. Identification of parents suitable for molecular mapping of immunity and resistance genes in *Solanum* species. *American Potato Journal* 71: 517–533.
- Jacobsen, E., Jong, J. H. de, Kamstra, S. A., Bergh, P. M. M. van der & Ramanna, K. S.** 1995. Genomic *in situ* hybridization (GISH) and RFLP analysis for the identification of alien chromosomes in the backcross progeny of potato(+)tomato fusion hybrids. *Heredity* 74: 250–257.
- Lapitan, N. L. V., Ganal, M. W. & Tanksley, S. D.** 1989. Somatic chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridization of the TGRI satellite repeat. *Genome* 32: 992–998.
- Melchers, G., Sacristán, M. D. & Holder, A. A.** 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Research Communications* 43: 203–218.
- Pehu, E., Thomas, M., Poutala, T., Karp, A. & Jones, M. G. K.** 1990. Species-specific sequences in the genus *Solanum*: identification, characterization, and application to study somatic hybrids of *S. brevidens* and *S. tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 693–698.
- Power, J. B., Cummins, S. E. & Cocking, E. C.** 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature* 225: 1016–1018.
- Ramulu, K. S., Dijkhuis, P., Rutgers, E., Blaas, J., Krens, F. A., Verbeek, W. H. J., Colijn-Hooymas, C. M. & Verhoeven, H. A.** 1996. Intergeneric transfer of a partial genome and direct production of monosomic addition plants by microprotoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 316–325.
- Rokka, V.-M., Pietilä, L. & Pehu, E.** 1996a. Enhanced production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) clones. *American Potato Journal* 73: 1–12.
- Rokka, V.-M., Valkonen, J. P. T. & Pehu, E.** 1995. Production and characterization of haploids from somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum* through anther culture. *Plant Science* 112: 85–95.
- Rokka, V.-M., Valkonen, J. P. T. & Pehu, E.** 1997. Somatohaploid production by anther culture of interspecific somatic hybrids and their prospects in potato breeding. In: Jain, S. M., Sopory, S. K. & Veilleux, R. E. (eds). *In vitro* haploid production in higher plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Volume 5: 233–243. ISBN 0-7923-3979-7
- Rokka, V.-M., Xu, Y.-S., Kankila, J., Kuusela, A., Pulli, S. & Pehu, E.** 1994. Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. *Euphytica* 80: 207–217.

- Rokka, V.-M., Xu, Y.-S., Tanhuanpää, P., Pietilä, L. & Pehu, E.** 1996b. Electrofusion of protoplasts of anther-derived dihaploid lines of commercial potato cultivars. *Agricultural and Food Science in Finland* 5: 449–460.
- Singsit, C. & Veilleux, R. E.** 1989. Intra- and interspecific transmission of androgenetic competence in diploid potato species. *Euphytica* 43: 105–112.
- Tiainen, T.** 1992. The influence of culture conditions on anther culture response of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 211–219.
- Valkonen, J. P. T., Brigneti, G., Salazar, L. F., Pehu, E. & Gibson, R. W.** 1992. Interactions of the *Solanum* spp. of the *Etuberosa* group and nine potato-infecting viruses and a viroid. *Annals of Applied Biology* 120: 301–313.
- Valkonen, J. P. T., Xu, Y.-S., Rokka, V.-M., Pulli, S. & Pehu, E.** 1994. Transfer of resistance to potato leafroll virus, potato virus Y and potato virus X from *Solanum brevidens* to *S. tuberosum* through designed asymmetric somatic hybridization. *Annals of Applied Biology* 124: 351–362.
- Wenzel, G.** 1994. Tissue culture. In: Bradshaw, J. E. & Mackay, G.R. (eds). *Potato genetics*. Cambridge: CAB International University Press. p. 173–195. ISBN 0-85198-869-5
- Wenzel, G., Schieder, O., Przewozny, T., Sopory, S. K. & Melchers, G.** 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. *Theoretical and Applied Genetics* 55: 49–55.
- Zelcer, A., Aviv, D. & Galun, E.** 1978. Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and X-irradiated protoplasts of male-sterile *N. tabacum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 90: 397–407.



# Uuden geneettisen muuntelun tuottaminen perunan pakkasen- kestävyyden tutkimiseksi

---

Mervi Seppänen & Eija Pehu

*Kasvintuotantotieteen laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto*

*e-mail: mervi.habtonen@helsinki.fi*

Viljelyssä olevat perunan (*Solanum tuberosum* L.) lajikkeet poikkeavat pakkasenkestävyydeltään hyvin vähän toisistaan. Laboratoriokokeissa on perunan pakkasenkestävyyttä arvioitu käyttämällä ioninvuotomenetelmää, joka on ns. epäsuora mittaussuunnitelma ja perustuu solukalvojen säilymiseen rikkoutumattomina kylmäkäsiteltyä ajan. Kokeissa mukana olleet perunalajikkeet, kuten Pito, Hja Tanu ja Hja Timo, eivät eronneet toisistaan pakkasenkestävyytensä suhteen. *Solanum tuberosum* ei ole ainoastaan hallanarka, vaan siltä puuttuu myös karaistumiskyky. Sen pakkasenkestävyys on  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Andeilla kasvavista villiperunoista on löydetty lajeja kuten *S. commersonii*, jonka pakkasenkestävyys on  $-4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tämän lisäksi *S. commersonii* kykenee karaistumaan. Geneettistä muuntelua pakkasenkestävyyden suhteen on aikaansaatu risteyttämällä pakkasherkkä ja pakkasenkestävä laji keskenään; kahdesta luontaisesti risteytymättömästä lajista (*S. commersonii* x *S. tuberosum*) on tuotettu somaattinen hybridi (Cardi *et al.* 1993). Somaattisesta hybridistä tuotetun itsesiitospopulaation pakkasenkestävyyttä mitattiin ioninvuototestillä. Populaation havaittiin segregoivan siten, että 50 tutkittavasta kasvista pystyttiin löytämään yksilöitä, joiden kestävyys oli lähellä jompaa kumpaa risteytysvanhempaa. Suurin osa kuitenkin edusti vanhempien keskiarvoa. Kasvien karaistumisominaisuudet olivat riippumattomia ei-karaistuneen kasvin pakkasenkestävyydestä. Tulos antaa lisätodistusta sille, että kyseiset ominaisuudet ovat eri geeniryhmien kontrolloimia. Hyväksikäyttämällä pakkasherkkä ja pakkasenkestävän perunalajin välistä somaattista hybridiä pystyttiin rässä tutkimuksessa tuottamaan populaatio, jota jatkossa voidaan käyttää perunan pakkasenkestävyys- tai karaistumismekanismien tutkimiseen.

*Avainsanat:* karaistuminen, kylmänkestävyys, *Solanum tuberosum*, somaattiset hybridit

# Abstract

## New genetic variability for studying freezing tolerance of potato

Mervi Seppänen & Eija Pehu

Department of Plant Production, P. O. BOX 27, FIN-00014 University of Helsinki  
e-mail: mervi.habtonen@helsinki.fi

There is little variation in freezing tolerance between potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. In laboratory experiments the ion leakage test, an indirect method based on the survival of membrane integrity at low temperature treatments, has been used to evaluate the freezing tolerance of potato. Tested potato cultivars, e.g. Pito, Hja Timo and Hja Tanu, did not differ in their freezing tolerance. *S. tuberosum* is not only frost sensitive but it also lacks the capacity to acclimate. However, wild potato species are frost tolerant, -4.5 °C in *S. commersonii* versus -3.0 °C in *S. tuberosum*, and able to cold acclimate. Genetic variation in freezing tolerance of potato has been identified in interspecific somatic hybrids of *S. commersonii* x *S. tuberosum* (Cardi *et al.* 1993). The freezing tolerance of the selfed progenies derived from the somatic hybrid was measured using the ion leakage method. Out of 50 progenies studied we were able to find individuals with freezing tolerance close to that of the hybrid parents. The freezing tolerance in most of the progenies was nearer the parental mean. In our observations the acclimation capacity of the progenies was independent of the measured freezing tolerance. The result supports the hypothesis that freezing tolerance and acclimation capacity are separate traits and are possibly controlled by different genes or gene families. In this study we created a population which segregates according to tolerance to low temperatures and which could be used in further studies on the mechanisms of freezing tolerance and acclimation capacity.

*Key words:* acclimation, frost tolerance, *Solanum tuberosum*, somatic hybrids

## Johdanto

Suomessa esiintyy perunan (*Solanum tuberosum* L.) kasvukauden aikana halloja, jolloin yölämpötila laskee nollan alapuolelle. Viljelyssä oleva peruna on pakkasherkkä kasvi, jonka lehtimateriaali kestää laboratorio-olosuhteissa testattuna n. -2 - -3 °C. Hallan vioitukset aiheuttavat keväisin yhteyttävän lehtipinta-alan menetystä ja syksyllä kasvukauden päättymisen. Perunan pakkasvauriot vähentyisivät merkittävästi mikäli jalostuksessa onnistuttaisiin kehittämään muutaman asteen enemmän pakkasta kestäviä lajikkeita. Tämä tavoite on kuitenkin perinteisellä risteytysjalostuksella vaikea toteuttaa, sillä *S. tuberosum* lajikkeiden joukosta ei juurikaan löydy vaihtelua pakkaskestävyyden suhteen.

Kasvien pakkaskestävyys ja karaistumis-kyky eli kyky lisätä kylmänkestävyyttä ovat molemmat useiden perintötekijöiden ohjailemia ominaisuuksia ja siten vaikeita tutkia. Perunan pakkaskestävyyteen vaikuttaa pienehkö joukko toistaiseksi tuntemattomia geenejä. 1990-luvun alussa uskottiin kylmässä indusoituvien geenien (geenin ilmeneminen on alhaisista lampotiloista riippuvaa) eristämisen lisäävän kasvien karaistumismekanismien ymmärtämistä eikä niiden periytymisen tutkimiseen panostettu. Näiden geenien merkitystä kylmänkestävyyden kehittymiselle tutkittiin yliekspressoimalla niitä siirtogeenisissä kasveissa. Lähes poikkeuksetta yhden geenin ilmenemisen lisääminen ei merkittävästi lisännyt siirtogeenisen kasvin kylmänkestävyyttä, eikä karaistumistapahtuman tutkiminen kokonaisuutena ollut mahdollista. Pyrkimyksissä selvittää kylmässä indusoituvien geenien segregaaation yhteyttä kylmänkestävyyden kanssa, on geneettistä muuntelua tuotettu lajin välisin ristytyksin. *S. cardiophyllum* × *S. commersonii* takaisinristeytysjälkeläisillä tehdyissä kylmänkestävyyden periytyvyyttä koskeissa tutkimuksissa on hallankestävyyden ja karaistumi-

sominaisuuden arveltu olevan eri geeniperheiden ohjailemaa (Stone *et al.* 1993).

Perunan jalostamiselle hallaa paremmin kestäväksi on tärkeää sitä ohjailevien geenien tunnistaminen. Pakkasherkkästä *S. tuberosum*ista poiketen kuuluu *Solanum*-perheeseen useita villiperunoita, joiden kestävyys on viljeltävää perunaa huomattavasti parempi, ja niiden karaistumisominaisuuksissa löytyy vaihtelua (Taulukko 1). Nämä pakkaskestävät villiperunalajit, kuten *S. commersonii*, ovat satoisuudeltaan ja mukuloiden laatuominaisuuksiltaan selvästi *S. tuberosum*ia huonompia, eikä niitä voida käyttää sellaisenaan jalostusmateriaalina. Ne ovat kuitenkin erinomaista tutkimusmateriaalia selvitetessä perunan pakkaskestävyydsmekanismia eli mitä kasvien rakenteellisia tai elintoimintojen sopeuttamiseen alhaisiin lämpötiloihin liittyviä ominaisuuksia tarvitaan kestävyuden parantamiseksi.

Yksi tapa saada selville taustalla olevia perintötekijöitä on tutkia perimältään mahdollisimman samanlaisia kasveja, jotka kuitenkin poikkeavat toisistaan halutun ominaisuuden eli tässä tapauksessa pakkaskestävyytensä suhteen. Kasvimateriaali pakkaskestävyyden mekaniismien tutkimiseen aikaansaatiin risteyttämällä pakkasherkkä (*S. tuberosum*) ja pakkaskestävä (*S. commersonii*) perunalaji keskenään ja tuottamalla siitä itsepölytyksen kautta jälkeläistö, jonka pakkaskestävyys vaihteli. Jälkeläisistä jokainen kasviyksilö on suvullisen lisääntymisen takia geneettiseltä taustaltaan ainutlaatuinen ja täten myös pakkaskestävyydeltään jälkeläiset edustavat erilaisia yhdistelmiä vanhemmistaan. Meneillään olevissa tutkimuksissa selvitetään, miten kasviyksilöt reagoivat pakkaslämpötiloihin, mitä eroja on kasvien yhteyttämistehokkuuden säilymisessä ja kylmyysstressin aikana muodostuvien haitallisten yhdisteiden detoksifikaatioissa. Näin päästään tarkastelemaan, miten pakkaskestävä kasvi (-5,25 °C) eroaa herkemmästä kasvusta (-2,75 °C) näiden ominaisuuksien sekä alhaisessa lämpötilassa säädelyjen geenien ilmenemisen suhteen.

**Taulukko 1.** Perunan (*Solanum* sp.) pakkasenkestävyys ja karaistuminen (Chen & Li 1980).

Ryhmä	Pakkasenkestävyys- ja karaistumisominaisuus	<i>Solanum</i> sp.	Kestävyys (°C)	
			ei karaistu	karaistu
I	pakkasenkestävät ja	<i>S. acaule</i>	-6,0	-9,0
	karaistumiskykyiset	<i>S. commersonii</i>	-4,5	-11,5
II	pakkasenkestävät ja	<i>S. boliviense</i>	-4,5	-4,5
	ei-karaistumiskykyiset	<i>S. sanctae-rosae</i>	-5,5	-5,5
III	pakkashervät ja	<i>S. oplocanese</i>	-3,0	-8,0
	karaistumiskykyiset	<i>S. polytrichon</i>	-3,0	-6,0
IV	pakkashervät ja	<i>S. cardiophyllum</i>	-3,0	-3,0
	ei-karaistumiskykyiset	<i>S. tuberosum</i>	-3,0	-3,0
V	hallanarat	<i>S. trifidum</i>	-3,5	kuollut

## Aineisto ja menetelmät

Kasvimateriaalina käytettiin *S. commersonii* (PI 243503) x *S. tuberosum* (SPV11) somaattista hybridiä (SH9A) sekä siitä tuotettua itsesiitospopulaatiota (S1) (Kuva 1). Perunat kasvatettiin pakkasenkestävyyden testausta varten kasvihuoneessa + 20 °C/+18 °C:ssa (päivä/yö) 16 tunnin päivänpituudessa. Karaistumiskapasiteetti mitattiin 7 vuorokautta karaistumisen jälkeen, jona aikana päivänpituus oli 12 h ja karaistumislämpötila +4/+2 °C.

Kylmänkestävyyttä mitattiin 1 cm<sup>2</sup> kokoisista lehtikiekoista ionivuototestiä käyttämällä. Pakkaskestävyyden perusteella seulottiin n. sadan itsesiitosjälkeläisen joukosta jatkoon 50 kasvia. Jokaisessa kylmätestissä oli mukana neljä toistoa, ja kylmätestejä toistettiin kunnes jälkeläiset oli saatu pakkasenkestävyytensä perusteella luotettavasti paremmuusjärjestykseen, tässä tapauksessa 4-5 kertaa. Karaistuneiden (KAR) ja karaistumattomien (EI-KAR) kasvien ionivuototestistä saaduista tuloksista laskettiin LT50-arvot (Lethal Temperature, Kuolettava lämpötila, jossa 50 % ionien ko-

konaismäärästä on vuotanut ulos solusta) (Janacek & Prasil 1991). Kasvien karaistumiskapasiteetti laskettiin karaistuneiden kasvien ja ei-karaistuneiden kasvien LT50-arvojen erotuksena (KAR - EI-KAR).

Tulokset käsiteltiin tilastollisesti käyttämällä EXCEL -ohjelman korrelaatioproseduuria.

## Tulokset

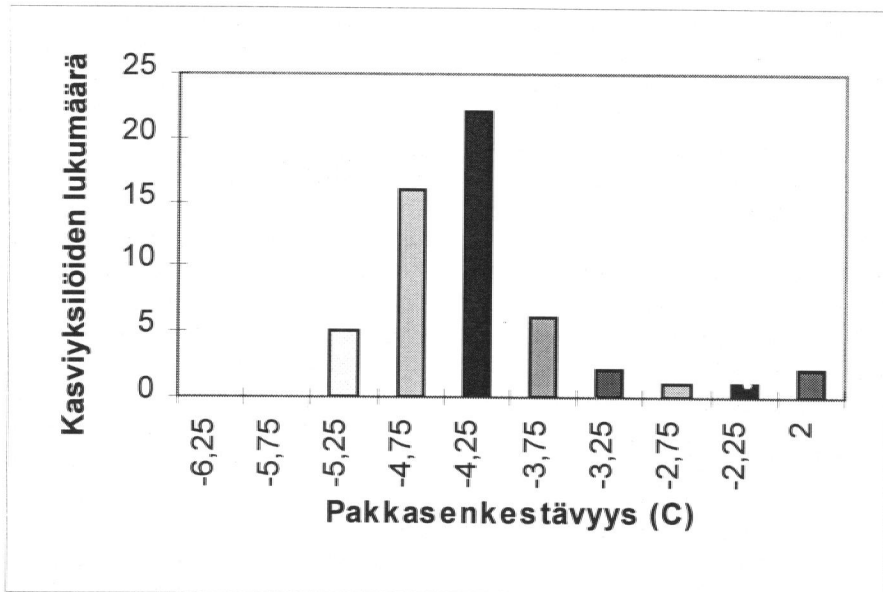
Itsesiitosjälkeläistön pakkasenkestävyyden havaittiin segregoivan risteytysvanhempien välillä. Viidestäkymmenestä testatusta kasvusta löydettiin yksilöitä, joiden pakkasenkestävyys oli samaa tasoa kuin *S. commersonii* tai *S. tuberosum* -lajilla, suurin osa kuitenkin käyttäytyi hybridin, SH9A:n, tapaan (Kuva 2). Pakkaskestävin jälkeläinen kesti -4,9 °C, herkin vaurioitui -3,0 °C:ssa, kun koko tutkittavan populaation kestävimmäksi mitattiin *S. commersonii* (-5,2 °C) ja herkimmäksi *S. tuberosum* (-2,5 °C). Somaattisen hybridin, SH9A, pakkasenkestävyys oli -4,3 °C, mikä on 0,46 astetta risteytysvanhempien keskiarvoa parempi.

<i>S. commersonii</i> (PI 243503)	x	<i>S. tuberosum</i> (SPV11)
2n=2x=24		2n=2x=24
EBN=1		EBN=2
EI-KAR -5,2 °C		EI-KAR -2,5 °C
KAR -7,6 °C		KAR -2,6 °C

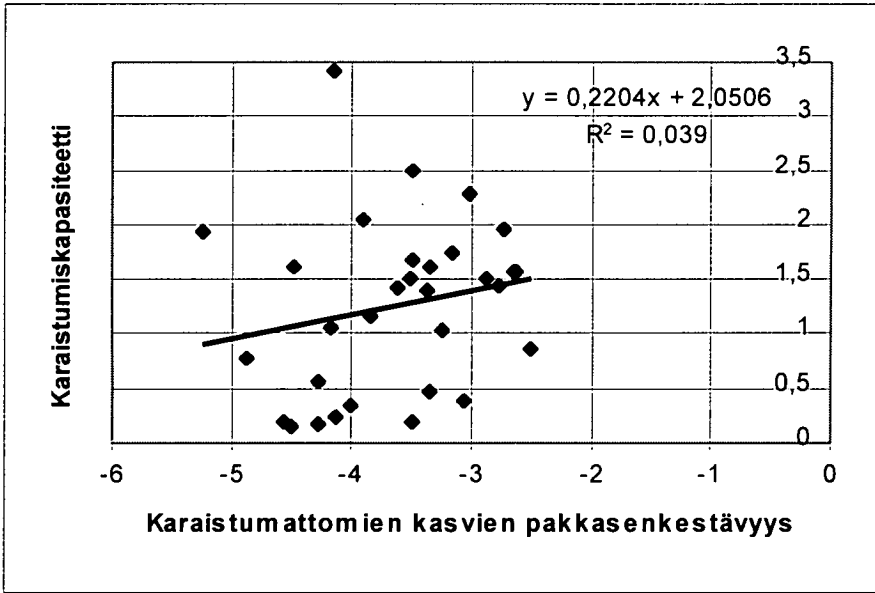


SH9A
Sn=4x=48
EI-KAR -4,3 °C
KAR -5,5 °C
⊕
S1
2n=4x=48
EI-KAR -3,0 - -4,9 °C
KAR -3,3 - -7,5 °C

**Kuva 1.** Risteytysvanhempien, hybridin ja itsesiitosjälkeläistön ploidiatasot sekä pakkasenkestävyys ennen karaistumista (EI-KAR) ja karaistumisen jälkeen (KAR).



**Kuva 2.** Perinnöllinen vaihtelu itsesiitosjälkeläistön pakkasenkestävyydessä. Pylväät osoittavat pakkasenkestävyydeltään erilaisten kasviyksilöiden lukumäärän kussakin lämpötilaluokassa. Risteytysvanhemmat: pakkasenkestävä *S. commersonii* (-5,25 °C) ja viljelty peruna *S. tuberosum* (-2,0 °C).



Kuva 3. S1 populaation pakkasenkestävyyden ja karaistumiskapasiteetin korrelaatio.

Karaistumiskapasiteetin laskemista varten perunat karaistiin  $+4/+2$  °C:ssa 7 vuorokauden ajan. Samojen kasvien pakkasenkestävyys määritettiin ennen karaistumiskäsittelyä ja kapasiteetti ilmoitettiin LT50-arvon muutoksena (KAR - EI-KAR). *S. tuberosum* ei parantanut pakkasenkestävyyttään karaistumiskäsittelyssä, kun taas *S. commersonii* kestävyyden parani  $-5,25$  °C:sta  $-7,6$  °C:een eli 2,4 astetta. Jälkeläistön pakkasenkestävyys lisääntyi vastaavasti 0,2-2,3 astetta. Pakkaskestävät yksilöt eivät karaistuneet herkkiä paremmin, vaan karaistumiskapasiteetin suuruus oli ei-karaistuneiden kasvien pakkasenkestävyydestä riippumaton ( $R^2 = 0,039$ ) (Kuva 3). Kasviyksilön pakkasenkestävyyden perusteella ei siis voida ennustaa karaistumiskykyä.

## Tulosten tarkastelu

Esteenä perunan jalostamisessa pakkasta paremmin kestäväksi on ollut vaihtelun puuttuminen *S. tuberosum* -lajikkeiden välillä. Toisaalta *Solanum*-lajeista löytyy useita villiperunoita, joiden pakkasenkestävyys on huomattavasti parempi kuin *S. tuberosum* -lajilla. Tässä tutki-

muksessa luotiin pakkasenkestävyydeltään heterogeeninen perunapopulaatio, jonka kestävyys segregoi risteytysvanhempien välillä. Hybridin itsesiitosjälkeläistön 50 kasvista pystyttiin löytämään pakkasenkestävyydeltään risteytysvanhempia lähellä olevia yksilöitä. Nämä yksilöt ovat arvokasta tutkimusmateriaalia selvittäessä perunan pakkasenkestävyyteen vaikuttavia tekijöitä.

*S. commersonii* x *S. cardiophyllum* hybridin takaisinristeytysjälkeläistöllä tehdyissä kokeissa todettiin sekä perunan pakkasenkestävyyden että karaistumiskyvyn olevan kvantitatiivisia ja siten usean geenin ohjailmia ominaisuuksia. On todennäköistä, että eri geeniperheet säätelevät näitä kahta eri ominaisuutta (Stone *et al.* 1993). Stone *et al.* (1993) päätyivät teoriaan kahdesta erillisestä ominaisuudesta havaitsemalla korrelaation puuttumisen em. ominaisuuksien väliltä. Oman kokeemme *S. commersonii* x *S. tuberosum* somaattisen hybridin itsesiitospopulaatiosta mitatut tulokset tukevat tätä teoriaa. Pakkaskestävyydeltään segregoiva populaatio (S1) segregoi riippumattomasti myös karaistumiskyvyn suhteen. Jatkossa populaatiota voidaan siten käyttää sekä pakkasenkestävyyden että karaistumiskapasiteetin tutkimiseen perunalla.

# Kirjallisuus

---

**Cardi, T., Ambrosio, F. D., Consoli, D., Puite, K. J. & Ramula, K. S.** 1993. Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 193–200.

**Chen, H.-H. & Li, P.** 1980. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology* 65: 1146–1148.

**Janacek, J. & Prasil, I.** 1991. Quantification of plant frost injury by nonlinear fitting and S-shaped function. *Cryo-Letters* 12: 42–42.

**Stone, J. M., Palta, J. P., Bamberg, J. B., Weiss, L. S. & Harbage, J. F.** 1993. Inheritance of freezing resistance in tuber-bearing *Solanum* species: Evidence for independent genetic control of nonacclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 7869–7873.

# Transgeeniset kasvit ja niiden viljelyn riskien arviointi

János Pauk

*Cereal Research Institute, Wheat Genetics and Breeding Department,*

*P. O. BOX 391, H-6701 Szeged, Hungary*

*e-mail: b10151pau@ella.hu*

Tutkimuslaitoksemme genetiikan tutkimusohjelmassa siirrettiin geenejä rapsiin (*Brassica napus* L.), riisiin (*Oryza sativa* L.) ja vehnään (*Triticum aestivum* L.) erilaisin menetelmin. *Agrobacterium*-välitteinen geeninsiirto onnistui rapsilla hyvin. Siirtogeeniset riisi ja vehnä saatiin aikaa pommittamalla embryogeenistä suspensiota (riisi) ja kehittymättömiä alkioita (vehnä) mikroammuksilla. Kultahiukkaset, joiden pinnalle oli saostettu plasmidi-DNA:ta ammuttiin suurella nopeudella käyttäen erityistä partikkelinsiirtomenetelmää (PDS-1000). Geenien siirtyminen ja ilmeneminen R<sub>0</sub>-kasveissa ja niiden jälkeläisissä varmistettiin NPTII-testein, Southern-tekniikalla ja fluorometrisillä GUS-testeillä. Merkkigeenit periytyivät itsepölytys- ja risteytysjälkeläisiin. Kasvihuoneessa testattiin siirtogeenin siirtymistä muihin rapsilajikkeisiin ja rapsin sukulaislajeihin (mm. *Brassica rapa* ja *Diplotaxus muralis*) risteytysten kautta. Kenttäkokeissa arvioitiin etäisyyksiä, joilla geenin vielä siirtyy merkittävässä määrin pölytyksen kautta. Käsintehdyissä risteytyksissä merkkigeeni siirtyi eri rapsilajikkeisiin. Peltokokeissa risteytyminen yhden metrin etäisyydellä siitepölylähteestä oli suhteellisen yleistä (10<sup>-3</sup>). Antibiootinkestäviä rapsiyksilöitä löytyi 16 ja 32 metrin etäisyydellä siitepölylähteestä, mutta alhaisella frekvenssillä (10<sup>-5</sup>).

*Avainsanat:* *Agrobacterium*, antibiootinkestävyys, herbisidinkestävyys, partikkelipommitus, rapsi, riisi, vehnä



# Abstract

## Transgenic crop plants and risk assessment of their field use

János Pauk

*Cereal research Institute, Wheat Genetics and Breeding Department,*

*P. O. BOX 391, H-6701 Szeged, Hungary*

*e-mail: b10151pauk@ella.hu*

In our genetics programme, transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.), rice (*Oryza sativa* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) were produced using different methods. In rapeseed the *Agrobacterium*-mediated method was used successfully. For rice and wheat the transgenic plants were obtained via bombardment of embryogenic suspensions and young embryos, respectively. The gold microcarriers coated with plasmid DNA (rice: pGSGLOC1, pRT99GUS; wheat: pAHC20 and 25) were accelerated at high velocity using PDS-1000. The presence and expression of the introduced genes for transformation in  $R_0$  plants and their offspring were confirmed by NPTII test, Southern analysis and fluorometric GUS assay. The marker genes are inherited in progeny plants. The introduced marker genes were transferred to the next generation by crossing. The ability of pollen to transfer the introduced genes to other varieties and related species (e.g. *Brassica rapa* and *Diploaxus muralis*) by cross-pollination was studied in greenhouse experiments, and field trials were carried out to estimate the distance for biologically relevant gene dispersal. In artificial crossing, the introduced marker gene was transferable into other varieties of *Brassica napus*. In field trials, at a distance of 1 metre from the source of transgenic plants, the frequency of an outcrossing event was relatively high ( $10^{-3}$ ). Resistant individuals were found 16 and 32 metres from the transgenic pollen donors, but the frequency of an outcrossing event dropped to  $10^{-5}$ . The biological risk associated with using transgenic crop plants in the field will be discussed.

*Key words:* *Agrobacterium*, antibiotics resistance, herbicide resistance, particle bombardment, particle delivery system, rapeseed, rice, wheat

## Johdanto

Käytännöllisesti suuntautuneessa tutkimuslaitoksessa bioteknologian tärkein tehtävä on auttaa ja tukea kasvinjalostusta. Myös Szegedin tutkimuslaitoksessa tehtävämme on parantaa ja tehostaa jalostusmenetelmiä. Nykyisissä tutkimusohjelmissa uudet solu- ja solukkoviljelymenetelmät yhdistetään perinteisiin jalostusmenetelmiin. Tämä artikkeli keskittyy uusiin menetelmiin, joilla jalostustutkimusta edistetään tulevaisuudessa.

## Rapsin, riisin ja vehnän geeninsiirrot

### Agrobakteerivälitteinen geeninsiirto rapsilla

Agrobakteerivälitteisessä geeninsiirtokokeessa onnistuttiin siirtämään antibiootinkestävyyden aiheuttava neomyosiinifosfotransferaasi-geeni (NPTII) rapsiin (*Brassica napus* L.) (Pauk *et al.* 1991, Stefanov *et al.* 1994). Transgeenisää, kanamysiinikestäviä rapsioksidioita käytettiin riskinarvioinnissa, jotta voitaisiin selvittää tulevaisuuden maataloudessa geneettisesti muokattujen lajikkeiden käytännön viljelyyn liittyviä seikkoja (Pauk *et al.* 1995, Pauk *et al.* 1997).

### Riisin embryogeenisen suspension partikkelipommitus

'Unggi 9', *japocina*-tyyppinen riisin (*Oryza sativa* L.) genotyyppi valittiin sen embryogeenisten ominaisuuksien vuoksi. Epäkypsistä alkiosta indusoitua, huolellisesti valittua embryogeenistä kallusta käytettiin suspensioviljelmän aloitukseen. Transformaatiokokeessa mikroammukset, joissa NPTII- ja  $\beta$ -glukuronidaasi-

(GUS) geenit sisältävää plasmidi-DNA:ta (pGSGLUC1, pRT99GUS) oli saostettu kultahiuksien pinnalle, ammuttiin suurella nopeudella biolistista partikkelipommitusmenetelmää (particle delivery system, PDS-1000) käyttäen solukkoviljelmiin. Pommituksen jälkeinen valinta NPTII-geenin suhteen tehtiin joka vaiheessa agar-alustalla, johon oli lisätty 75-100 mg/l G-418. Yksisirkkaisilla G-418 on tehokkaampaa kuin kanamysiini. Ainoastaan NPTII-geenin suhteen positiivisen reaktion antaneet kallukset käytettiin regeneraatiokokeissa. Viisikymmentäkahdeksan NPTII-positiivista kasvia kasvatettiin kasvihuoneella ja 15 niistä oli fertiilejä. Siirrettyjen geenien läsnäolo ja ilmeneminen  $R_0$ -kasveissa varmistettiin NPTII-testillä, Southern-tekniikalla ja fluorometrisellä GUS-testillä. Merkkigeenit periytyivät  $R_1$ - ja  $R_2$ -jälkeläistön kasveihin. Merkkigeenit siirtyivät myös risteytysten kautta.

### Nuorten vehnänalkioiden partikkelipommitus

Eri-ikäisiä kypsymättömiä vehnänalkioita ja alkiosta tuotettuja mikrokalluksia pommitettiin transgeenisten, herbisidiresistenttien vehnien (*Triticum aestivum* L.) tuottamiseksi. Viljelmät, joihin oli siirretty *bar*- ja GUS-geeniä (pAHC 20 ja pAHC 25), seulottiin viikon ikäisinä alustalla, johon oli laitettu 1 mg/l ppt:tä (herbisidin vaikuttava molekyyli) ja valinta uusittiin seuraavien 2-3 alaviljelmän aikana. Suurin suhteellinen määrä ppt-resistenttejä kalluksia saatiin 3 viikon ikäisiä mikrokalluksia pommitettaessa. Ppt-valinnan jälkeen embryogeeninen kallus saatiin aikaan lisäämällä abskisiinihappoa (ABA) kasvatusalustalle. Embryogeeninen kallus siirrettiin alustalle, johon ei ollut lisätty hormoneja, ja regenerantteja saatiin 27 kpl. Oletetut siirtogeeniset kasvit analysoitiin. Löytyi 17 kasvia, jotka tuottivat herbisidin tuhoavaa entsyymiä (PAT). Nämä siirtogeeniset kasvit istutettiin suojattuun fytotronikkammiin kasvamaan. Ne osoittautuivat kasvutavaltaan normaaleiksi ja fertiileiksi.

# Johtopäätelmät

## geeninsiirtokokeista

Saamamme tulokset ja muut julkaistut tulokset osoittavat, että viljelykasvien geneettiseen transformaatioon on nykyään runsaasti vaihtoehtoisia tapoja ja menetelmiä. Geeninsiirto onnistuu teknisesti, mikä on selvästi osoitettu. Siirtogeenit ilmenevät kasvissa ja periytyvät normaalisti jälkeläisille. Kuitenkin tämä uusi tilanne asettaa uusia käytännöllisiä kysymyksiä ja ongelmia, mm.: kuinka uutta geneettistä materiaalia tulee käsitellä jalostuksessa sekä siemen- ja elintarvikekaupassa ja miten sitä koskevat eettiset kysymykset ratkaistaan.

### Riskien arviointi transgeenisellä rapsilla

On tarpeellista arvioida uusiin kasvinjalostusmenetelmiin liittyvien riskien merkitystä.

### Risteytyskoe

Rapsilla tehtiin risteytyksiä kasvihuoneella, jotta voitaisiin selvittää missä määrin NPTII-merkkigeenin sisältävät rapsit risteytyvät muiden lajien, kuten rapsille sukua olevien rikkakasvien, kanssa. Kokeessa olivat mm. *Brassica rapa* ja *Diplotaxcus muralis*, jonka kanssa risteytys vaati onnistuakseen alkionpelastuksen. Inkompatibiliteettiä ei havaittu pölyttäjikasveina olleiden siirtogeenisten 'Arabella' ja 'Santana'-rapsien ja tavallisten rapsilajikkeiden välillä. Pölytetyistä kukista (85) 83,5 % tuotti normaalin hedelmän. Hybridijälkeläisissä (4220) siirretty antibioottiresistenssiä ilmentävä merkkigeeni esiintyi pölyttäjästä riippuen suhteessa 3:1 ('Arabella') ja 1:4 ('Santana') verrattuna antibiootille herkkien yksilöiden määrään. Jälkimmäisessä tapauksessa (1:4) merkkigeeni ei siis siirtynyt kovin tehokkaasti. Merkkigeenin siirtymistä rapsista toisiin lajeihin ei voitu osoittaa.

### Kenttäkokeet

Kenttäkokeiden tarkoituksena oli havainnoida siirtogeenistä kasvia oikeassa viljely-ympäristössä. Yhden hehtaarin suuruisella peltolohkolla kasvatettiin kuusi siirtogeenistä kasvia normaalin rapsikasvuston keskellä. Siitepöly levisi luonnonmukaisesti mehiläisten välityksellä. Merkkigeenin (NPTII) leviämistä arvioitiin havainnoimalla normaalien rapsien jälkeläistössä geenin aiheuttaman ominaisuuden yleisyyttä. *In vitro*-versoviljelmät altistettiin kanamysiinille (Kan<sup>R</sup>) kahdesti (nestealustalla ja agar-kiinteytetyllä alustalla) ja valittujen yksilöiden resistenssiys varmistettiin NPTII-testauksin. Lähinnä eli yhden metrin säteellä siirtogeenisistä kasveista sijainneelta alueelta löytyi resistenttejä kasveja  $10^{-3}$  frekvenssillä. Kauppana, 16 ja 32 metrin etäisyydellä pölynlähteestä, siirtogeenisiä kasveja löytyi huomattavasti vähemmän, frekvenssillä  $10^{-5}$ . Kokeen jälkeen peltolohkolta kerätty sato poltettiin.

# Johtopäätelmät

## Geeninsiirtotekniikat

Vieraiden geenien siirto eri viljelykasveihin onnistuu teknisesti. Siirrettyjen merkkigeenin kokeellinen testaus on osoittanut niiden siirtävän osaksi vastaanottajakasvin genomia ja ilmenevän siellä.

## Siirtogeenisten viljelykasvien riskien arviointi

Siirtogeenisten kasvilajikkeiden kaupallistamiseen liittyy seuraavia mahdollisia ongelmia:

- siirtogeeniset kasvit muuttuvat itse rikkakasveiksi
- siirtogeeni siirtyy muihin, lähellä kasvaviin viljeltyihin tai villoihin lajeihin risteytymisen seurauksena
- siirtogeenisillä kasveilla on joitain haittavaiikutuksia ihmisiin, eläimiin ja/tai muihin kasveihin

Kansainvälisellä tasolla pyritään harmonisoimaan säädöksiä, joilla kontrolloidaan uusin bioteknisiin menetelmin tuotettujen geneettisesti modifioitujen kasvien käyttöä. Jokaisen jalostajan on varauduttava ottamaan huomioon seuraavat säädetyt vaatimukset ennen uuden, geneettisesti modifoidun kasvilajikkeen kaupanlaskemista:

- bioturvallisuuskomitean ehdotukset
  - kansallinen ja kansainvälinen riskien arviointi
  - tapauskohtaiset päätökset
  - julkinen mielikuva: arvoperusteiset käsitykset
  - siirtogeenisyyden osoittaminen merkinnöin
- Riskien arviointiin liittyvät tutkimuksemme samoin kuin muualla tehdyt kokeet tuovat

esille uusia eettisiä, jalostuksellisia ja oikeudellisia kysymyksiä, joihin on syytä ottaa kantaa ennenkuin transgeenisia kasvilajikkeita tuodaan kauppalliseen levitykseen.

## Kiitokset

Olemme kiitollisia professori, akateemikko Dénes Duditsille (Szeged, Unkari) ja professori R. R. Mendelille ja tri J. Schulzelle (Braunschweig, Saksa), jotka ovat tukeneet tätä tutkimusta osallistumalla yhteistyöhön useissa projekteissa.

## Kirjallisuus

---

**Pauk, J., Stefanov, I., Fekete, S., Börge, L., Karsai, I., Fehér, A. & Dudits, D.** 1995. A study of different (CaMV 35S and mas) promoter activities and risk assessment of field use in transgenic rapeseed plants. *Euphytica* 85: 411–416.

**Stefanov, I., Fekete, S., Börge, L., Pauk, J., Fehér, A. & Dudits, D.** 1994. Differential activity of the mannopine synthase and the CaMV 35S

promoters during development of transgenic rapeseed plants. *Plant Science* 95: 175–186.

**Pauk, J., Nerlich, A., Pawelczyk, H., Schledzewski, K., Matuz, J., Simon, I. K. & Mendel, R. R.** 1997. Transgenic fertile rice plants by biolistic transformation using reporter genes and the TR promoter. In: *Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, Manila.* (in press)

# Siirtogeeninen ohra

---

Anneli Ritala

VTT Bio- ja elintarviketekniikka, PL 1505, 02044 VTT

e-mail: anneli.ritala@vtt.fi

Geeninsiirto on uusi työväline ohran (*Hordeum vulgare* L.) jalostuksessa. Projektimme tavoitteena on muokata suomalaisen eliittimallasohran entsyymikoostumusta täydentämällä sitä lämpöstabiililla endo- $\beta$ -glukanaasilla, jonka odotetaan parantavan mallasohran panimokäyttötymistä. Homeen endo- $\beta$ -glukanaasia koodaava geeni siirrettiin ohran solukko- ja elintarviketutkimukseen. Vierteen suodatuvuus parani ja uutesaanto nousi ohra- ja elintarviketutkimuksissa. Ensimmäinen siirtogeeninen ohra saatiin aikaan pommittamalla antibioottiresistenssiä koodaava merkkigeeni epäkypsien alkioiden apikaalisen meristeemin puolelle. Alkiot idätettiin kasveiksi ilman selektiopainetta ja entsyymiaktiivisuus analysoitiin pienistä taimista. Antibioottiresistenssigeeni on periytynyt ja ilmennyt stabiilisti ohralinjassamme kuuden sukupolven ajan. Siirtogeeniset kasvit ovat ulkonäöltään normaaleja ja niiden agronomiset ominaisuudet on todettu peltokokeissa vähintään yhtä hyväksi kuin normaalilla ohralilla. Siirtogeenisen ohran viljelyn riskien arviointi on aloitettu. Jatkotutkimuksissa pommitettiin endo- $\beta$ -glukanaasia koodaavan geenin cDNA:ta ohran alkiokilpeen. Samanaikaisesti siirrettiin herbisidiresistenssiä koodaava merkkigeeni. Alkioista kasvatettiin embryogeenistä kallusta herbisidiselektiolla. Selektiopaine säilytettiin sekä viljelmien regenerointi- että versojen juurrutusvaiheissa. Siirretty geeni on periytynyt seuraavaan ohrasukupolven ja idätetyistä ohranjyvistä on voitu osoittaa  $\beta$ -glukanaasiaktiivisuus. Siirtogeenisen mallasohran monistaminen kasvihuoneessa ja siirtogeenisen endo- $\beta$ -glukanaasin karakterisointi on tekeillä. Kesäksi 1997 on suunnitteilla uudella hyötygeenillä varustetun mallasohran kenttäkokeet.

*Avainsanat:* endo- $\beta$ -glukanaasi, geenin siirto, *Hordeum vulgare*, mallastus, partikkelipommitus

# Abstract

## Transgenic barley

Anneli Ritala

VTT, Biotechnology and Food Research,  
P. O. BOX 1505, FIN-02044 VTT  
e-mail: [anneli.ritala@vtt.fi](mailto:anneli.ritala@vtt.fi)

Gene transfer is a new tool for barley (*Hordeum vulgare* L.) breeding. The aim of our project is to alter the enzyme composition of elite Finnish malting barley by complementing it with a heat stable endo- $\beta$ -glucanase. This yeast enzyme is expected to improve the brewing characteristics of malting barley. The gene coding for yeast endo- $\beta$ -glucanase was transferred to a barley tissue culture. In mashing experiment the endo- $\beta$ -glucanase produced by the transgenic cell line improved the filterability of the wort and increased the extract yield. The first transgenic barley plant was obtained by bombarding a marker gene coding for antibiotic resistance into the apical meristem of immature embryos. The embryos were allowed to germinate without selection pressure and enzyme activity was analysed from small plantlets. The transferred antibiotic resistance is heritable and has been shown to be stable in our barley line for six generations. The transgenic plants are normal in appearance and were found in field tests to be agronomically at least as good as untransformed barley. Risk assessment for cultivating transgenic barley has been started. In further studies, a gene coding for endo- $\beta$ -glucanase was transferred to barley scutellum. At the same time a marker gene coding for herbicide resistance was transferred. Embryogenic callus was proliferated from the embryos under herbicide selection. Selection pressure was maintained during both regeneration and rooting phases. The transferred gene was inherited in the next generation and  $\beta$ -glucanase activity has been demonstrated in germinated barley grains. Multiplication of the transgenic malting barley and characterisation of the transgenic endo- $\beta$ -glucanase is proceeding in the greenhouse. Field testing of malting barley containing the new beneficial gene is planned for the summer of 1997.

*Key words:* endo- $\beta$ -glucanase, genetic engineering, *Hordeum vulgare*, malting, particle bombardment

# Johdanto

Ohra (*Hordeum vulgare* L.) on Suomen tärkeimpiä viljakasveja. Jalostustoimin on tuotettu korketasoisia, erityisesti Suomen viljelyoloihin soveltuvia ohralajikkeita. Risteytysjalostuksen rinnalle on nousemassa uusi työväline, geeninsiirto. Tällöin puhutaan usein täsmäjalostuksesta, jolla pyritään kuvaamaan täsmällistä, tiettyjen ominaisuuksien siirtämistä. Vielä ei kuitenkaan pystytä määräämään vieraan geenin sijoituspaikkaa kohdegenomissa. Geeninsiirron etuna on, että siirrettävän geenin ei tarvitse olla peräisin lähisukuisesta kasvista, eikä edes kasvikunnasta, vaan se voi olla peräisin mistä tahansa elävästä organismista. Oman projektimme tavoitteena on muokata suomalaisen eliittimallasohran entsyymikoostumusta täydentämällä sitä lämpöäsietävällä endo- $\beta$ -glukanaasilla. Homeen lämpöäsietävän endo- $\beta$ -glukanaasin odotetaan parantavan mallasohran panimokäyttäytymistä. Mäskäyolosuhteissa endo- $\beta$ -glukanaasi hajottaa liukoiset  $\beta$ -glukaanit, ja syntyvän vierteen viskositeetti alenee alentaen samalla siivilöinti- ja suodatuskustannuksia.

## Siirtogeenistä endo- $\beta$ -glukanaasia tuottava solukkoviljelmä

Useat tutkimusryhmät ovat osoittaneet, että siirtogeenisten ohrakasvien tuottaminen on mahdollista (Jähne *et al.* 1994, Ritala *et al.* 1994, Wan & Lemaux 1994, Hagio *et al.* 1995, Salmenkallio-Marttila *et al.* 1995). Prosessi on kuitenkin edelleen hyvin hidas ja työläs. Selvitämme kuinka homeen endo- $\beta$ -glukanaasia koodaava geeni (*egl1*) käyttäytyy ohran genomissa, siirsimme sen ohran solukkoviljelmään (Mannonen 1993). Siirtogeenisen ohraviljelmän tuottaman endo- $\beta$ -glukanaasin (EGI) ominaisuudet olivat lähes alkuperäisen homeen tuottaman EGI:n kaltaiset. Lämpötilaoptimi oli laskenut 65 °C:sta 60 °C:een ja pH-optimi 5,5-6,0:sta 5,0-5,5:een. Huolimatta muutoksista opimiolosuhteissa siirtogeenisen solukkoviljelmän tuottama EGI alensi labora-

toriomittakaavan mäskäyskokeissa liukoisten  $\beta$ -glukaanien määrää samoin kuin alkuperäinen homeen tuottama EGI. Molemmissa tapauksissa lisätyt entsyymit paransivat vierteen suodattavuutta ja nostivat uutesaantoa.

## Siirtogeenisiä kasveja ilman selektiopainetta

Ensimmäinen siirtogeeninen ohrakasvi saatiin aikaan pommittamalla neomysiinifosfotransferaasia koodaava merkkigeeni (*np1II*) epäkypsiä alkioiden apikaalisen meristeemin puolelle (Ritala *et al.* 1994). Alkiot idätettiin kasveiksi ilman selektiopainetta ja entsyymiaktiivisuus analysoitiin pienistä taimista. Siirtogeeniä ilmentävä T<sub>0</sub>-kasvi osoittautui kimeeriksi, mikä johtui alkion pitkälle edenneestä erilaistumisesta jo pommitusvaiheessa. Huomattavaa on, että ohra-alkio sisältää useita geeninsiirron kohteeksi sopivia meristeemejä. Apikaalisesta meristeemistä kehittyi ainoastaan kasvin päätätkä ja loput tähkät ovat peräisin sivumeristeemistä, joita on yhdeksän tai poikkeusolosuhteissa jopa kuusitoista. Lisäksi kunkin meristeemin päätätkä kehittyi ennen niiden sivuversoja (Jacobsen 1966). Näitä ominaisuuksia voidaan hyödyntää suoraan sovellusgeeneillä tapahtuvassa transformaatiossa. Kasvien ensimmäiset tähkät analysoidaan esim. PCR-tekniikalla ja etsitään siirtogeenisiä sektoreita. Menetelmä asettaa kuitenkin suuret vaatimukset seulontamenetelmän luotettavuudelle. Toisaalta minimoidaan vieraan geenimateriaalin määrä siirtogeenisessä kasvissa.

Noin 10 % tähkistä oli siirtogeenisiä. Neljän tähkän (kasvujärjestyksessä 13., 30., 36. ja 50.) jälkeläistöä analysoitiin tarkemmin. Southern blot-hybridisaatiolla voitiin osoittaa, että kaikilla näillä ns. emotähkillä ja niiden jälkeläisillä oli samanlainen integraatiokuvaio, joten kaikki ovat peräisin yhdestä ja samasta integraatiotapahtumasta. Näin voidaankin olettaa, että transformaatio on tapahtunut yhdessä alkion sivumeristeemistä (Ritala 1995). Siirretty geeni on periytynyt ja ilmennyt stabiilisti ohralinjassamme. Siirtogeenisten kasvien ulkonäössä ei ollut poikkeavuuksia ja jyvät

itivät normaalisti (Ritala *et al.* 1995). Siirtogeenin periytymistä seurattiin kuuden sukupolven ajan.

## Siirtogeenistä ohraa peltokokeissa

Yhteistyössä Boreal Suomen Kasvinjalostuksen kanssa vietiin siirtogeenisiä jyviä peltokokeisiin kesinä 1994 ja 1996. Siirtogeeniset kasvit todettiin ulkonäöltään normaaleiksi. Niiden kasvu, kukinta ja tuleentuminen tapahtuivat samassa rytmissä kuin normaalilla ohralla. Lisäksi siirtogeenisen linjan agronomiset ominaisuudet olivat vähintään yhtä hyvät kuin normaalilla ohralla. Keskimääräinen korren pituus siirtogeenisellä ohralla oli vuoden 1994 kokeessa  $75 \pm 1,5$  cm ja normaalilla ohralla  $73 \pm 1,0$  cm. Saman vuoden tulosten perusteella jyväsaanto siirtogeenisellä ohralla oli jopa hieman parempi kuin normaalilla ohralla (siirtogeeninen linja  $14\ 000 \pm 1800$  kg/ha ja normaali ohra  $11\ 000 \pm 350$  kg/ha). Osittain ero selittyy siirtogeenisen linjan läpikäymistä solukkoviljelyvaiheista aikaisemmissa sukupolvissa, mikä varmistui vuoden 1996 toistokokeessa.

## Geeninsiirrot selektiopainetta hyväksikäyttäen

*Trichoderma reesei* -homeen endo- $\beta$ -glukanaasia koodaavan geenin cDNA:ta pommitettiin ohran alkiokilpeen  $\alpha$ -amylaasipromoottorin säätelyssä. Samanaikaisesti siirrettiin herbisidiresistenssiä koodaava merkkigeeni (*bar*) ja histologisesti värjättävissä oleva merkkigeeni (*uidA*). Molemmat merkkigeenit olivat konstitutiivisen promoottorin säätelyssä. Alkioista kasvatettiin embryogeenistä kallusta bialafosfosselektiolla ja kallukset seulottiin GUS-värjäyksellä (Ritala 1995).  $\beta$ -Glukuronidaasia ilmentävät kallukset siirrostettiin regeneraatioalustoille. Selektiopaine säilytettiin sekä viljelmien regenerointi- että versojen juurrutusvaiheissa. Yksi T<sub>0</sub>-kasvi sisälsi *egl1*-geenin ja se on periytynyt seuraavaan ohrasukupolveen. Idätetyistä ohranjyvistä on voitu osoittaa  $\beta$ -glukanaasiaktiivisuus. Siirtogeenisen mallasohran monistaminen kasvihuoneessa ja siirtogeenisen endo- $\beta$ -glukanaasin karakterisointi on tekeillä. Kesäksi 1997 on suunnitteilla uudella hyötygeenillä varustetun mallasohran kenttäkokeet.

"Siirtogeeninen ohra"-työryhmä, VTT: Veli Kauppinen, Ulrika Kurtén, Leena Mannonen, Anna Maria Nuutila, Riitta Puupponen-Pimä, Anneli Ritala, Marjatta Salmenkallio-Marttila



# Kirjallisuus

---

- Hagio, T., Hirabayashi, T., Machii, H. & Tomotsune, H.** 1995. Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Reports* 14: 329–334.
- Jacobsen, P.** 1966. Demarcation of mutant-carrying regions in barley plants after ethylmethane-sulfonate seed treatment. *Radiation Botany* 6: 313–328.
- Jähne, A., Becker, D., Brettschneider, R. & Lörz, H.** 1994. Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 525–533.
- Mannonen, L.** 1993. Barley cell culture as a producer of heterologous protein. VTT Publications 138, Espoo: VTT. 72 p. + app. 2 p. ISBN 951-38-4356-8
- Ritala, A.** 1995. Transgenic barley by particle bombardment. VTT Publications 250, Espoo: VTT. 92 p. + app. 33 p. ISBN 951-38-4788-8
- Ritala, A., Aspegren, K., Kurtén, U., Salmenkallio-Marttila, M., Mannonen, L., Hannus, R., Kauppinen, V., Teeri, T. H. & Enari, T. M.** 1994. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Molecular Biology* 24: 317–325.
- Ritala, A., Aikasalo, R., Aspegren, K., Salmenkallio-Marttila, M., Åkerman, S., Mannonen, L., Kurtén, U., Puupponen-Pimiä, R., Teeri, T. H. & Kauppinen, V.** 1995. Transgenic barley by particle bombardment. Inheritance of the transferred gene and characteristics of transgenic barley plants. *Euphytica* 85: 81–88.
- Salmenkallio-Marttila, M., Aspegren, K., Åkerman, S., Kurtén, U., Mannonen, L., Ritala, A., Teeri, T. H. & Kauppinen, V.** 1995. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports* 15: 301–304.
- Wan, Y. & Lemaux, P. G.** 1994. Generation of large number of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104: 37–48.

# Ohran epäkypsistä alkioista indusoidun polyembryogeneenin hyödyntäminen geeninsiirrossa

---

Anna Maria Nuutila

VTT Bio- ja elintarviketekniikka, PL 1505, 02044 VTT

e-mail: [anna-maria.nuutila@vtt.fi](mailto:anna-maria.nuutila@vtt.fi)

Partikkelipommitus on viime vuosina vakiintunut käytetyimmäksi geeninsiirtomenetelmäksi ohralla ja muille viljoilla. Tämän menetelmän tehokkuus on suuresti riippuvainen käytetyn kohdemateriaalin kyvystä regeneroitua takaisin vihreäksi kasviksi. Ohralla (*Hordeum vulgare* L.) pommituksen kohteena on usein käytetty epäkypsiä alkioita tai niistä indusoitua polyembryogeenistä solumassaa. Ongelmana on kuitenkin ollut albinismi soluviljelmistä regeneroituissa kasveissa. Kasvatusalustalla voidaan vaikuttaa paitsi regeneraatiotehokkuuteen myös vihreiden kasvien osuuteen regeneroituvista kasveista. Erityisesti kasvatusalustan typpitasapaino vaikuttaa ohran soluviljelmien regeneraatioon. Optimoimalla kasvatusalustojen ammonium- ja nitraattipitoisuuksia sekä orgaanisen typen määrää onnistuimme parantamaan ohran (cv. Kymppi) polyembryogeenisten viljelmien regeneraatiotehokkuutta. Myös vihreiden kasvien osuus regeneroituneista kasveista nousi. Lisäksi regeneraatiota voitiin tehostaa muuttamalla alustan sisältämää kuparimäärää.

*Avainsanat:* albiino, kasvatusalusta, partikkelipommitus, regeneraatio, solukkoviljely

# Abstract

## Utilisation of polyembryogenesis induced from immature barley embryos in gene transfer

Anna Maria Nuutila  
VTT, Biotechnology and Food Research,  
P. O. BOX 1505, FIN-02044 VTT  
e-mail: [anna-maria.nuutila@vtt.fi](mailto:anna-maria.nuutila@vtt.fi)

In recent years particle bombardment has become the most frequently used method for gene transfer to barley (*Hordeum vulgare* L.) and other cereals. The transformation efficiency depends greatly on the ability of the target plant material to regenerate into green plants. Immature embryos and polyembryogenic cell mass of barley have often been used as target material for bombardment. Although acceptable regeneration efficiencies have been achieved, albinism has been a problem. The choice of culture medium affects regeneration efficiency and the proportion of green plants obtained. Nitrogen balance of the medium, especially, has an effect on regeneration of barley cell cultures. We have improved the regeneration efficiency of polyembryogenic cultures of barley (cv. Kymppi) and the proportion of green plants by optimising ammonium and nitrate concentrations and the amount of organic nitrogen in the media. We were able to further improve regeneration by modifying the copper content of the medium.

*Key words:* albino, culture medium, particle bombardment, regeneration, tissue culture

**Taulukko 1.** Toistokokeilla ja tähtipisteillä täydennetty 2<sup>n</sup>-faktorikoe: koodatut arvot.

Kokeen numero	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,682	0	0
10	1,682	0	0
11	0	-1,682	0
12	0	1,682	0
13	0	0	-1,682
14	0	0	1,682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

## Johdanto

Partikkelipommitus on viime vuosina vakiintunut käytetyimmäksi geeninsiirtomenetelmäksi ohralla (*Hordeum vulgare* L.) ja muilla viljoilla. Partikkelipommituksessa geeninsiirtomenetelmän tehokkuus on suuresti riippuvainen käytetyn kohdemateriaalin kyvystä regeneroitua takaisin vihreäksi kasviksi. Ohralla pommituksen kohteena on usein käytetty epäkypsiä alkioita tai niistä indusoitua polyembryogeenistä solumassaa (Ritala *et al.* 1994, Wan & Lemaux 1995). Ongelmana on kuitenkin jossain määrin ollut albinismi, jota esiintyy ohran soluviljelmistä regeneroituissa kasveissa. Kasvualustalla voidaan vaikuttaa paitsi regeneraatiotehokkuuteen, myös vihreiden kasvien osuuteen regeneroituvista kasveista. Erittäin kasvatusalustan tyypitasapaino vaikuttaa ohran soluviljelmien regeneraatioon. Yllättävää onkin, että kirjallisuudesta ei löydy

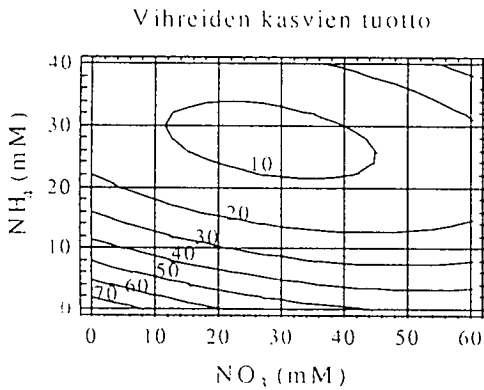
raportteja ohran epäkypsistä alkiosta indusoidun polyembryogeenisen solumassan kasvatustalustojen tyypitasapainon parantamisesta.

## Aineisto ja menetelmät

Viljelmien lähtömateriaalina käytettiin ohran (Kymppi-lajike) epäkypsiä alkioita. Epäkypsistä alkiosta eristettiin alkiokilpi eli skutellum, josta polyembryogeneesi indusoitui. Polyembryogeenistä massaa tuotettiin polyembryogeenialustalla kahden viikon ajan, jonka jälkeen massa siirrettiin regeneraatioalustalle.

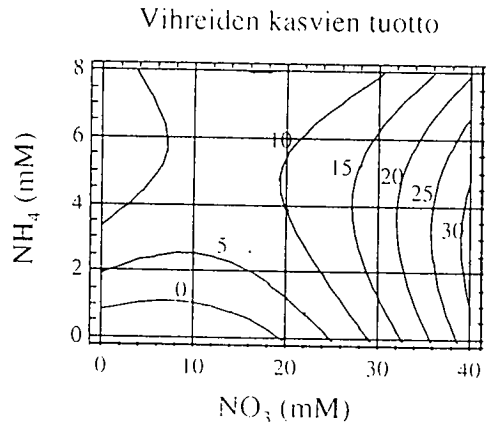
## Typitasapainon vaikutus

Alustojen tyypitasapainoa optimoitiin tilastollisen koesuunnittelun avulla. Muuttujina käytettiin ammonium- ja nitraattipitoisuutta sekä



Orgaaninen typpi = 24,8 mM

**Kuva 1.** Polyembryogeneesialustan optimointi: vihreiden kasvien tuotto ammoniummäärän, nitraattimäärän ja orgaanisen typen määrän funktiona.



Orgaaninen typpi = 0,7 mM

**Kuva 2.** Regeneraatioalustan optimointi: vihreiden kasvien tuotto ammoniummäärän, nitraattimäärän ja orgaanisen typen määrän funktiona.

orgaanisen typen määrää alustassa. Koesuunnitelmat olivat  $2^n$ -faktorikokeita, joita täydennettiin tähti- ja toistokokeilla (Cohran & Cox 1957) (Taulukko 1). Optimoitaessa polyembryogeneesialustaa regeneraatioalusta pidettiin vakiona ja optimoitaessa regeneraatioalustaa polyembryogeneesialusta pidettiin vakiona. Saadut tulokset analysoitiin Statgraphics Plus-ohjelmalla käyttäen regressio- ja varianssianalyysejä ja yhtälöt tulkittiin vastepintamenetelmällä. Optimalueet varmennettiin erilliskokeilla saatujen mallien pohjalta valituissa pisteissä.

### Kuparin vaikutus

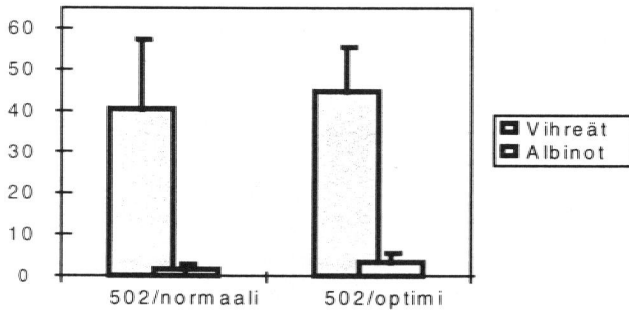
Kuparin vaikutusta regeneraatioon tutkittiin lisäämällä kasvualustoihin kuparia ( $\text{CuSO}_4$ ) 1 - 10  $\mu\text{mol/l}$ . Alkuperäisissä alustoissa kuparipitoisuus oli 0,1  $\mu\text{mol/l}$ .

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

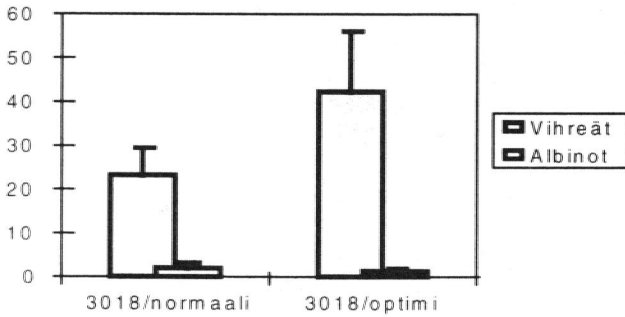
### Typpitasapaino

Typpitasapainoa optimoimalla voitiin parantaa Kymppi-ohran polyembryogeenisten viljelmien regeneraatiotehokkuutta. Lisäksi vihreiden kasvien osuus regeneroituneista kasveista saatiin nousemaan. Kuvassa 1 on vihreiden kasvien määrälle saatuun malliin perustuva vastepinta optimoitaessa polyembryogeneesialustaa. Mallin selitysaste oli 95 %\*\*\*. Kuvassa 2 on vihreiden kasvien määrälle saatuun malliin perustuva vastepinta optimoitaessa regeneraatioalustaa. Mallin selitysaste oli 85 %\*\*. Optimoitukokeiden varmistamiseksi tehtyjen pistekokeiden tulokset on esitetty kuvassa 3.

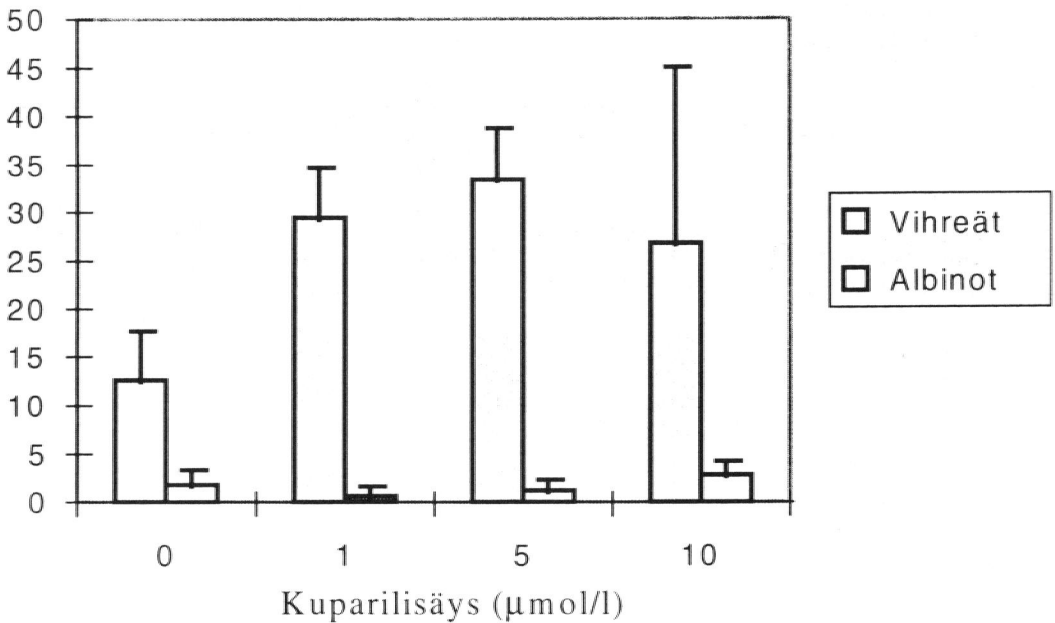
### Polyembryogeneesialusta



### Regeneraatioalusta



**Kuva 3.** Optimointikokeiden varmistaminen pistekokeilla: vihreiden ja albinokasvien tuotto.



**Kuva 4.** Kuparimäärän vaikutus vihreiden ja albinokasvien regeneraatioon.

Tehtyjen optimointikokeiden perusteella alustan tyypitasapainoa muuttamalla voidaan vaikuttaa ohran soluviljelmistä regeneroituvien vihreiden kasvien määrään. Regeneraatioalustan optimoinnilla saavutettiin varsin huomattava parannus: regeneroituneiden vihreiden kasvien määrä voitiin kaksinkertaistaa.

## Kuparin vaikutus

Regeneraatiotehokkuutta voitiin tehostaa huomattavasti myös muuttamalla alustan sisältämää kuparimäärää (Kuva 4). Paras regeneraatiotehokkuus saavutettiin lisäämällä alustaan kuparia 5  $\mu\text{mol/l}$  kuparisulfaattina.

## Johtopäätökset

Optimoimalla kasvatusalustojen ammonium- ja nitraattipitoisuuksia sekä orgaanisen typen määrää onnistuimme parantamaan Kymppi-ohran polyembryogeenisten viljelmien regeneraatiotehokkuutta. Myös vihreiden kasvien osuus regeneroituneista kasveista nousi. Lisäksi regeneraatiota voitiin tehostaa muuttamalla alustan sisältämää kuparimäärää. Tuloksia regeneraatiosta voidaan jatkossa hyödyntää geeninsiirtojen yhteydessä.

## Kirjallisuus

Cochran, W. & Cox, G. 1957. *Experimental Designs*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc. p. 335–375. 471-16204-3

Ritala, A., Aspegren, K., Kurtén, U., Salmenkallio-Marttila, M., Mannonen, L., Hannus, R., Kauppinen, V., Teeri, T. H., & Enari,

T. M. 1994. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Molecular Biology* 24: 317–325.

Wan, Y. & Lemaux, P. G. 1994. Generation of large number of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104: 37–48.

# Geeninsiirrot metsäpuihin

---

Hely Häggman

*Metla, Punkaharjun tutkimusasema, Finlandiantie 18, 58450 Punkaharju*

*e-mail: hely.haggman@metla.fi*

Geeninsiirtojen historia metsäpuilla on lyhyt. Ensimmäinen raportti siirtogeenisestä lehtipuusta on vuodelta 1987. Geenien siirtämiseksi on olemassa lukuisia sekä suoria että vektorivälitteisiä menetelmiä. Lehtipuita transformoidaan kuitenkin useimmiten agrobakteerin välityksellä. Havupuihin, jotka eivät ole agrobakteerien luontaisia isäntäkasveja, geenit siirretään yleisimmin ns. mikroammusmenetelmällä. Siirrettävinä geeneinä ovat useimmiten olleet joko reportteri- tai selektoitavat merkkigeenit tai erilaiset kestävyysgeenit. Erityisen kiehtovaa tulevaisuuden kannalta on geeninsiirtojen mahdollistama täsmäjalostus metsäpuilla, joilla perinteinen jalostus on pitkän kiertoajan ja sukupolvenvälin vuoksi hidasta.

*Avainsanat:* agrobakteeri, geenitekniikka, havupuut, lehtipuut, mikroammukset, molekyylijalostus, riskien hallinta



# Abstract

## Gene transfers in forest trees

Hely Häggman

*The Finnish Forest Research Institute, Punkaharju Research Station,*

*Finlandiantie 18, FIN-58450 Punkaharju*

*e-mail: hely.haggman@metla.fi*

Genetransfer has been studied with woody plants since the mid-eighties and the first report of a stably transformed deciduous tree was published in 1987. At present there exist several genetic transformation techniques - both direct ones and vector-mediated ones. Genes have usually been transferred to deciduous species using *Agrobacterium*-vectors and to coniferous species using particle bombardment. The gene constructs used have in most cases been either reporter genes, selectable marker genes or resistance genes. In the future the application of molecular breeding to forest trees is especially interesting as they have long regeneration intervals, and progress has been slow via traditional breeding.

*Key words:* *Agrobacterium*, genetic engineering, conifers, deciduous trees, particle bombardment, molecular breeding, risk assessment

# Johdanto

Geenejä on siirretty kasveihin 1980-luvun alusta lähtien, jolloin useat tutkimusryhmät saivat bakteereista peräisin olevat geenit ilmenemään kasvisoluissa (Fraleley *et al.* 1983, Herrera-Estrella *et al.* 1983, Bevan 1984). Ensimmäisissä siirroissa käytettiin hyväksi agrobakteerien luontaista geeninsiirtokykyä ja neomyosiinifosfotransferaasigeeniä, joka saa aikaan solukoiden kestävyuden kanamysiini-antibiootille. Vielä nykyäänkin antibiootinkestävyuden aiheuttavat merkkigeenit ovat yleisesti käytössä. Ensimmäisiä kenttäkokeita siirtogeenisillä kasveilla tehtiin kymmenen vuotta sitten, vuonna 1986. Nykyään siirtogeenisien kasvien tuottaminen alkaa olla jo rutiinia monilla kasvilajeilla. Ravintokasvien ohella myös koristekasviteollisuudessa on alettu hyödyntää kasvien molekyylijalostusta.

## Geeninsiirtojen historia metsäpuilla

Metsäpuiden osalta geeninsiirtojen historia alkaa 1980-luvun lopulta, jolloin JoAnne Fillatti työryhmineen (1987) siirsi vesakontorjuntaine glyfosaatille kestävyuden antavan geenin (5-enoli-palorypälehappo-sikimaatti 3-fosfaattisyntaasi) hybridipoppeliin (*Populus alba* × *grandidentata*). Tämän jälkeen agrobakteerivälitteistä geeninsiirtoa on käytetty myös monille muille *Populus*-suvun lajeille (esim. de Block 1990, Brasileiro *et al.* 1991, Charest *et al.* 1992, Nilsson *et al.* 1992, Donahue *et al.* 1994, Kajita *et al.* 1994, Tsai *et al.* 1994, Tuominen *et al.* 1995). Näissä tutkimuksissa on siirretty yleensä reportterigeenejä, agrobakteerin T-DNA geenejä ja kestävyysgeenejä. *Populus*-suku onkin malliesimerkki agrobakteerivälitteisestä geeninsiirrosta lehtipuihin. Siirtogeenisillä *Populus*-lajeilla on myös perustettu kenttäkokeita, mikä on metsäpuita ajatellen vielä verrattain poikkeuksellista. Geeninsiirrot onnistuvat kuitenkin nykyisin jo muihinkin lehtipuihin, ja erityisen paljon työtä on tehty hedelmäpuilla.

Havupuilla geeninsiirtotutkimukset aloitettiin 1980-luvun loppupuolella, jolloin geeninsiirrosta käytettäviä, mikroammusmenetel-

mässä tarvittavia aseita alkoi olla saatavilla. Havupuuthan eivät ole agrobakteerin luontaisia isäntäkasveja, ja niinpä agrobakteerivälitteinen geeninsiirto onnistuukin havupuihin yleensä huonosti. Poikkeuksen muodostaa euroopan-lehtikuusi (*Larix decidua*), joka on transformoitu *Agrobacterium rhizogenes*-lajin avulla (Huang *et al.* 1991). Tähän mennessä mikroammusaseen avulla transformoitujen havupuiden lista on vielä lyhyt: valkokuusi (*Picea glauca*) (Ellis *et al.* 1993), mustakuusi (*Picea mariana*) (Charest *et al.* 1996), radiatämänty (*Pinus radiata*) (Walter 1994) ja lehtikuusi (*Larix* sp.) (Séguin *et al.* 1996).

## Tavoitteena metsäpuiden molekyylijalostus

Geeninsiirtojen avulla on useimmissa tapauksissa haluttu parantaa kasvien herbisidi-, virus- tai hyönteiskestävyyttä siirtämällä vastaavia kestävyysgeenejä alttiisiin lajeihin tai lajikkeisiin. Tämä on ymmärrettävää etenkin pelto- kasveilla. Maailmanlaajuisesta miljardien USA:n dollareiden arvoisesta pestisidikaupasta huolimatta menetetään hyönteisten tai tautien takia yhä 12-13 % vuotuisesta sadosta (Shah *et al.* 1995). Geeninsiirtotekniikoita kehitetään koko ajan myös muille kasviryhmille sopiviksi. Esimerkiksi koristekasvien jalostustavoitteina on kestävyysominaisuuksien parantamisen ohella yhtä lailla kaupalliselta kannalta sopivien värien ja muotojen kehittäminen. Tulevaisuudessa keskityttäneen viljelykasvien kohdalla yhä enenevässä määrin laatuominaisuuksien (esimerkiksi hiilihydraatti- ja lipidiominaisuuksien) muuntamiseen.

Metsäpuiden perinteiset jalostustavoitteet ovat selkeät: hyvä puun kasvu ja laatu sekä sopeutuneisuus kasvatuspaikalle. Nämä ominaisuudet ovat kuitenkin tähän mennessä olleet vaikeasti geeninsiirtojen kautta saavutettavissa, sillä ominaisuudet ovat useiden geenien säätelemiä, eikä näitä geenejä edes välttämättä tunneta. Lisäksi kerralla voidaan siirtää geenejä vain rajoitettu määrä. Lehtipuihin geenejä siirrettäessä onkin tähän asti viljelykasvien tapaan paljon käytetty kestävyysgeenejä. Kestävyysgeenien siirto pitkäikäisiin puihin on kui-

tenkin eri asia kuin vastaavien geenien siirto 1-2-vuotisiin viljelykasveihin. Metsäpuillakin tulevaisuuden tavoitteena voidaan pitää laatuominaisuuksien siirtoa, koska karakterisoi- tujen geenien määrä lisääntyy koko ajan.

Merkittäväksi katsottujen ominaisuuksien siirron lisäksi geeninsiirrot ja siirtogeeniset kasvit avaavat uusia mahdollisuuksia lajien geneettisen rakenteen ja säätelyn tutkimiseksi. Spesifiset muutokset yksittäisissä geeneissä, kuten geenien yli- tai alitoiminta, lisäävät tietoa kasvin perimästä ja sen toiminnasta, ja tämä osaltaan auttaa kasvinjalostuksen päämääriin pyrittäessä. Toisaalta siirtogeenisen materiaalin avulla voidaan suunnitella kokeita, jotka ennakoivat esim. ilmastonmuutoksen aiheuttamia seurauksia. Metsäpuiden genomien molekyyliarakennetta, niiden geenien toimintaa ja säätelyä on toistaiseksi tutkittu vähän, ja ne ovatkin tulevaisuuden haastava ja mielenkiintoinen tutkimuskohde. Oman kiinnostavan lisänsä luo puiden pitkä ikä - miten saada siirtogeenit toimimaan haluttuun aikaan, tietystä kehitysvaiheesta.

## Reportterigeenit ja selektoitavat merkkigeenit

Toistaiseksi suuressa osassa metsäpuilla ja etenkin havupuilla tehdyistä geeninsiirroista on ollut kysymys geeninsiirtotekniikan optimoinnista. Niinpä siirrettyt geenit ovat olleet lähinnä reportteri- ja merkkigeenejä. Näiden geenien avulla voidaan varmistaa geenien siirtyminen kasvisoluun ja niiden toiminta siellä. Useimmat merkkigeenit on alunperin eristetty bakteereista, koska niiden tehtävän kannalta on tärkeää, että niitä ei ole luonnostaan kasvisoluissa. Agrobakteerivälitteisessä geeninsiirrosta taas on oleellista, että siirrettävät geenit eivät ilmene bakteerissa, jotta mahdollinen agrobakteerikontaminaatio voidaan eliminoida. Tällainen, vain kasvisoluissa ilmenevä reportterigeeni, on rakennettu sijoittamalla geenin keskelle introni (Vancanneyt *et al.* 1990).

Reportterigeenit koodaavat tavallisesti entsyymi- proteiineja, joiden määrä siirtogeenisessä

solussa on helppo määrittää. Näitä geenejä käytetään myös yleisesti tutkittaessa erilaisten säätelyalueiden tehoa ja toimintaa. Tavallisimmin käytetty reportterigeeni on  $\beta$ -glukuronidaasi eli GUS (*uidA*)-geeni, joka on alunperin eristetty *Escherichia coli* -bakteerista. GUS-geenin ilmeneminen solukoissa on helppo havaita suhteellisen yksinkertaisen histokemiallisen tai fluorometrisen testin jälkeen. Reportterigeeni- vaihtoehtoja on kuitenkin nykyisin jo useita. Esimerkiksi joko hyönteisistä tai bakteereista peräisin olevien lusiferaasigeenien ja maneesita eristetyn GFP (green fluorescent protein)-geenin toiminnan havainnointi perustuu bioluminesenssi-ilmiöön. Geeninsiirtojen historian alkuvaiheessa käytettiin suhteellisen paljon *E. coli* -bakteerista eristettyjä  $\beta$ -galaktosidaasi- (LacZ) ja kloramfenikoli asetyylitransferaasi (CAT) -geenejä. Ne eivät kuitenkaan ole yhtä spesifisiä, eikä niiden havainnointi yhtä helppoa kuin myöhemmin käyttöön otettujen reportterigeenien. Muista ainakin toistaiseksi vielä vähän käytetyistä reportterigeeneistä mainittakoon antosyaanit.

Geeninsiirroissa käytettävät selektoitavat merkkigeenit ovat yleensä joko antibiootti- tai herbisidinkestävyysgeenejä. Vain ne solukot, joissa ko. kestävyysgeeni on, voivat kasvaa vastaavaa antibioottia tai herbisidiä sisältävällä alustalla. Yleisimmin käytetty selektoitava merkkigeeni on *E. coli* -bakteerista eristetty neomysiini-fosfotransferaasi-geeni (NPTII), joka fosforyloimalla inaktivoi selektiossa käytetyn kanamysiini-antibiootin. Myös muita samalla periaattella toimivia antibiootinkestävyysgeenejä on käytössä. Näitä ovat mm. hygromysiini-, gentamysiini- ja metotrekssaatti-geenit. NPTII-geeniä ei kuitenkaan voida pitää optimaalisena merkkigeeninä kaikille kasvilajeille ja -solukoille. Esimerkiksi monet yksisirkkaiset kasvit ovat luonnostaan kanamysiiniä kestäviä ja useimmat havupuut taas sietävät vain verrattain matalia kanamysiinipitoisuuksia. Joillakin lehtipuilla käytetyt kanamysiinipitoisuudet estävät erilaistumista, kun taas toiset lehtipuulajit kestävät hyvinkin korkeita pitoisuuksia.

Toisena vaihtoehtona selektoitaviksi merkkigeeneiksi ovat herbisidinkestävyysgee-

nit. Tällaisia merkkigenejä ovat mm. glufosinaatin-, fosfinotrisiinin- ja klorosulfonkestävyyseen. Tällaisten merkkigeenien käyttöä metsäpuiden siirtogeenisten taimien avoimeen käyttöön tähtäävässä tutkimuksessa on kuitenkin tarkkaan harkittava mahdollisten ei-toivotavien ympäristövaikutusten takia. Myöskään lyhytikäisillä kasveilla mahdollinen merkkigeenin poisto alkuperäisen valinnan jälkeen ei ainakaan nyky menetelmillä sovellu pitkäikäisille metsäpuille.

## Mikroammukset ja agrobakteerit geeninsiirron välineinä

Geeninsiirtotapoja on lukuisia. Ensimmäiset geeninsiirrot kasveihin tehtiin hyödyntämällä agrobakteerin omaa geeninsiirtomekanismia haluttujen geenien siirrossa. Vielä nykyisinkin agrobakteerivälitteinen geeninsiirto on käytetty menetelmä sekä kaksisirkkaisilla kasveilla että useimmilla lehtipuilla. Monet kasviryhmät, kuten yksisirkkaiset ja havupuut eivät kuitenkaan ole luontaisia isäntäkasveja agrobakteerille, mikä rajoittaa agrobakteerien käyttöä geeninsiirtovektoreina näillä lajeilla, ja on johdannut erilaisten geeninsiirtomenetelmien kehittämiseen. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi elektroporaatio, polyetyleeniglykolin käyttö, sonikaatio, mikroinjektio, makroinjektio, liposomien käyttö, muunnellut kasviviruset ja erilaiset geeninsiirtoaseet (partikkelipommitus eli mikroammusmenetelmä). Tällä hetkellä metsäpuille parhaiten soveltuvat menetelmät ovat lehtipuilla joko agrobakteerivälitteinen geeninsiirto tai mikroammusmenetelmä ja havupuilla mikroammusmenetelmä.

Agrobakteerivälitteisessä geeninsiirrossa käytetään joko *Agrobacterium tumefaciens* tai *A. rhizogenes* -lajien kantoja. Agrobakteerien aiheuttamien kasvitautien oireet johtuvat Ti- tai Ri-plasmidissa sijaitsevan T-DNA:n hormonigeneistä. Siirtyessään isäntäkasviin nämä joko luovat uusia kasvihormonien biosynteesireittejä tai herkistävät solut kasvin omille hormoneille, jolloin solunjakautumisen tuloksena infektiokohtaan muodostuu joko äkämä tai tiheäkarvaisia juuria. Tällaisia villityyppejä agrobakteerikantoja on käytetty useissa tutkimuk-

sissa, joissa on haluttu löytää eri lajeille parhaiten soveltuvia geeninsiirtovektoreita. Esimerkiksi *A. tumefaciens* -kanta A281 soveltuu hyvin useille havupuulajeille (Clapham *et al.* 1990, Aronen & Häggman 1995). Myöskin toistaiseksi ainoan agrobakteerivälitteisellä menetelmällä transformoidun havupuun, euroopanlehtikuusen, geeninsiirtoon (Huang *et al.* 1991) käytettiin villityypin *A. rhizogenes* -kantaa. Hypokotyylien inokulointikohtiin muodostui adventiivisilmuja, joista regeneroitiin siirtogeenisiä taimia.

Varsinaiset geeninsiirtokokeet tehdään tavallisimmin sellaisilla agrobakteerikannoilla, joissa poistettujen T-DNA:n geenien tilalle on laitettu haluttuja genejä eli kyseessä ovat tällöin integroituvat vektorit. Siirrettävät geenit voidaan myös laittaa agrobakteeriin erillisessä miniplasmidissa, jolloin on kyseessä autonominen eli binaarivektori. Molemmista vektorityypeissä T-DNA:n siirto agrobakteerista kasvisoluun tapahtuu Ti-plasmidin virulenssi- eli *vir*-geenien ohjaamana. *Vir*-geenit alkavat toimia esimerkiksi fenolien ja sokerien vaikutuksesta, joita erittyy haavoittuneesta kasvisolukosta tai joita lisätään keinotekoisesti. *Vir*-geenien toiminta alkaa, kun bakteerien solukelmussa oleva *virA*-proteiini tunnistaa signaalimolekyylit ja fosforyloi solulimassa olevan *virG*-proteiinin, joka sen jälkeen kiinnittyy *vir*-geenien säätelyalueelle aktivoiden ne (Zambryski 1992). Agrobakteerivektoreita on käytetty siirrettäessä genejä lehtipuihin, etenkin *Populus*-suvun lajeihin (esim. de Block 1990, Brasileiro *et al.* 1991, Nilsson *et al.* 1992, Confalonieri *et al.* 1994, Leple *et al.* 1995) ja myös moniin hedelmäpuihin (esim. Scorza *et al.* 1990, Pena *et al.* 1995, de Bondt *et al.* 1996). Kuvassa 1 testataan villityyppisten agrobakteerikantojen infektiotehoa rauduskoivulla.

Geeninsiirtoon käytettäviä aseita on olemassa monia erilaisia. Useimmissa niistä hyödynnetään ns. mikroammusmenetelmää, jossa siirrettävä DNA saostetaan joko kulta- tai wolframhiukkasten pinnalle, ja nämä ammutaan kasvisolukkuun. Hiukkasten kiihdyttämisessä käytetään useimmiten joko sähkövarauksen tai kaasunpaineen purkausta. Vaikka mikroammusmenetelmä on suhteellisen yksin-



**Kuva 1.** Geenejä siirretään lehtipuihin yleensä agrobakteerin välityksellä.

kertainen ja nopea, niin menetelmä on kuitenkin optimoitava sekä fysikaalisten että biologisten tekijöiden suhteen kulloinkin kohteena olevan lajin ja solukon mukaan. Optimoitavia fysikaalisia tekijöitä ovat mm. kaasunpaine, kultahiukkasten koko, DNA:n määrä ja kohteena olevan kasvimateriaalin ja siirrettävän DNA:n välinen etäisyys. Optimoitavista biologisista tekijöistä mainittakoon esim. solukkotyyppi ja kehitysvaihe. Mikroammusmenetelmää on käytetty etenkin havupuiden transformaatioissa (esim. Stomp *et al.* 1991, Ellis *et al.* 1993, Charest *et al.* 1993, Bommineni *et al.* 1994). Myös Suomessa havupuilla on saatu lupaavia tuloksia sekä kuusella (Newton *et al.* 1992, Robertson *et al.* 1992, Yibrah *et al.* 1994, Clapham *et al.* 1995) että männynllä (Aronen *et al.* 1994, Aronen *et al.* 1995, Aronen

1996). Kuvassa 2 ammutaan reportterigeenejä männyn sirkkalehtiin.

## Edellytyksenä toimiva solukkoviljelymenetelmä

Geeninsiirtojen onnistuminen edellyttää yleensä tehokasta ja toimivaa solukkoviljelymenetelmää tutkittavalle lajille. Metsäpuilla tämä näkyy myös selvästi. Esimerkiksi mäntylajeista on transformoitu ainoastaan radiatamänty (Walter *et al.* 1994), joka on erinomainen esimerkki kloonatun materiaalin tuotosta solukkoviljelyn avulla käytännön viljelyyn. Siirtogeenisia taimia on myös saatu aikaan valkokuusella ja mustakuusella (Ellis *et al.* 1993, Charest *et al.* 1996), joilla somaattinen embryo-geneesi toimii. Hyvä solukkoviljeltävyys ei kuitenkaan automaattisesti ennakoiki menestystä myös geeninsiirtojen saralla. Esimerkkejä lajeista, joilla solukkoviljelymenetelmät toimivat, ja joilla on myös paljon tehty geeninsiirtotutkimusta onnistumatta toistaiseksi tuottamaan siirtogeenisia taimia, ovat kuusi (*Picea abies*) ja loblollymänty (*Pinus taeda*).

Vain harvoissa tapauksissa solukkoviljelyvaihetta ei tarvita. Tällainen tilanne on mm. agrobakteerivälitteisen geeninsiirron ns. ko-inokulaatiomenetelmää käytettäessä. Tässä menetelmässä siirtogeenisia versoja saadaan muodostumaan, kun *Agrobacterium tumefaciens* kannalla 82.139 ja halutulla insinöroidyllä agrobakteerikannalla inokuloidaan yhtäaikaan kohdesolukkoa (Brasileiro *et al.* 1991). Ko-inokulaation tuloksena muodostuu äkämiä, joista syntyy joko ei-siirtogeenisia, siirtogeenisia tai kimeerejä versoja. Tämän menetelmän on kuitenkin todettu soveltuvan vain muutamalle lehtipuulajille. Myöskin käyttämällä transformoituja mikrosproreja tai siitepölyhiukkasia kontrolloiduissa risteelyissä voidaan välttää solukkoviljelyvaihe. Tällaiset transformaatiomenetelmät ovat vielä kehitteillä, mutta ne ovat varsin mielenkiintoisia vaihtoehtoja etenkin havupuille, joilla solukkoviljely on yleensä vaikeaa.



Kuva 2. Geenejä siirretään havupuihin tavallisesti mikroammusmenetelmällä.

## Siirrettyjen geenien toiminta kasvisoluissa

Jo geeninsiirtojen historian alkuvaiheessa havaittiin, että toimiakseen kasvilla siirrettävässä geenikonstruktissa tulee olla säätelyalueet. Transkription aloittamiseksi RNA-polymeraasin kiinnittymistä varten tarvitaan promoteri, joka sijaitsee ennen geeniä ja geenin perään lisätään ns. terminaattori. Prokaryoottien promoterit eivät kuitenkaan välttämättä toimi kasvisoluissa. Vuosien varrella on tehty runsaasti tutkimuksia siitä miten eri promoterit toimivat eri lajeilla ja eri solukoissa. Parhaita tieteenkin pitkäikäisillä metsäpuilla olisivat solukko- tai kehitysvaihespesifiset promoterit, mutta tällaisia on toistaiseksi karakterisoitu vain muutama. Yleisimmin metsäpuiden geeninsiirroissa käytettävät promoterit voidaan jakaa konstituivisiin eli jatkuvatoimisiin (esim. 35-S, joka on eristetty kukkakaalinmosaiikkiviruksesta) ja indusoituviin (esim. abskissihapolla indusoitava promoteri).

Koska geenitoimintaan vaikuttavat myös DNA:han sitoutuvat proteiinit, on joihinkin

geenikonstrukteihin lisätty sekvenssejä, jotka tehostavat translaatiota. Tällaisia konstrukteja on käytetty myös metsäpuita transformoitaessa (esim. Charest *et al.* 1993, Aronen 1996). Joissakin tapauksissa nämä ovat lisänneet merkittävästi myös siirtogeenien ilmenemistä.

Yhä edelleenkin geeninsiirroille on tyypillistä, että siirrettyjen geenien ilmeneminen vaihtelee siirtogeenisissä solukoissa kasveissa, jotka ovat peräisin erillisistä transformaatio-tapahtumista. Käytettiinpä mitä geeninsiirtomenetelmää tahansa ei tiedetä, mikä määrää vieraiden geenien insertiokohdan kromosomeihin. Joissakin tutkimuksissa on havaittu, että geeninsiirrot onnistuvat parhaiten meristemattisesti aktiivisiin solukoihin, joissa siis myös transkriptio on vilkasta. Geenien on arveltu siirtyvän tällaisiin kohtiin. Ilmeisesti geenejä siirtyy kuitenkin myös kromosomialueille, joiden transkriptiokyvyissä on eroa. Viime aikoina onkin kiinnitetty huomiota ns. MAR- (matrix attachment regions) ja SAR - (scaffold attachment regions) DNA-sekvensseihin. Niiden on havaittu lisäävän siirtogeenien ilmenemistä ja vähentävän transformanttien välistä

vaihtelua sekä kasveilla että eläimillä. Näitä sekvenssejä on kuitenkin toistaiseksi käytetty tutkimuksessa vasta vähän, eikä metsäpuilla lainkaan. Näillä sekvensseillä lienee huomattavaa merkitystä transformaatiomenetelmiä edelleen kehitettäessä.

## Geenitekniikan riskit ja niiden hallinta

Vaikka geeninsiirtojen historia kasveilla on jokseenkin lyhyt, on nykyisin useimmille tärkeille ravintokasveille, kuten viljoille, jo ole-massa toimiva geeninsiirtomenetelmä. Samoin siirtogeenisten puulajien lista pitenee koko ajan. Siirtogeenisten kasvien määrän lisääntymisessä ovatkin niiden mahdolliset ympäristö- tai terveysvaikutukset olleet sekä suuren yleisön että tiedeyhteisön huolenaiheena. Tästä syystä useimmissa maissa on luotu ohjeisto koskien siirtogeenisten kasvien sekä suljettua että avointa käyttöä ja riskianalyysijä.

Myös Suomessa geenitekniikkalaki tuli voimaan kesäkuussa 1995. Laki ja asetus pohjautuvat EU-direktiiveihin. Tiloista, joissa geenitekniikkatyötä tehdään, sekä suljetusta käytöstä on tehtävä ilmoitus Sosiaali- ja Terveysministeriöön Geenitekniikan lautakunnalle. Avoimesta käytöstä, kuten kenttäkokeista, ilmoitetaan myös EU-komissiolle. Näihin ilmoituksiin sisältyvät myös riskianalyysit. Yleisesti ottaen mitään geenitekniikkatyötä ei voida

aloittaa ennen Geenitekniikan lautakunnan hyväksymistä.

Metsäpuiden geeninsiirroissa on useimmiten ollut kyse menetelmän kehittämistä ko-lajille tai solukolle. Kenttäkokeet siirtogeenisillä puilla ovat vielä jokseenkin harvinaisia, mutta niiden määrä tulee jatkossa lisääntymään. Avoimessa käytössä olevien siirtogeenisten metsäpuiden aiheuttamat mahdolliset riskit ympäristölle voivat johtua siirretystä geenistä, lajin (pölytystapa, risteytyminen jne.) ja siirtogeenisen puun ominaisuuksista tai vuorovaikutuksesta siirtogeenisen puun ja ympäristön välillä. Ennen avointa käyttöä on kaikissa tapauksissa tehtävä riskianalyysi. Lain ja asetuksen mukaan avoimessa käytössä ns. hyväksyttävän riskiluokan tulee olla joko ”pieni” tai ”lähes nolla”.

Geeninsiirrot metsäpuihin avaavat aivan uusia mahdollisuuksia metsäpuiden perinteisen jalostuksen rinnalle. Molekyylijalostuksen avulla on mahdollista päästä pitkän kiertoajan omaavilla metsäpuilla nopeammin toivottuun päämäärään kuin perinteisen jalostuksen valinnan, risteytyksen ja takaisinristeytyksen menetelmin. Samoin siirtogeenisten puiden avulla saadaan tietoa puiden genomista ja perinnöllisestä säätelystä. On kuitenkin tärkeää, että geenitekniikkatutkimusta tehdään metsäpuiden erityisominaisuudet huomioon ottaen ja mahdolliset riskit halliten. Geenitekniikkatutkimuksen tulee olla sopusoinnussa yhteiskunnan arvojen ja eettisten käsitysten kanssa, joita osaltaan kuvaa laki- ja asetustekstien sisältö.

## Kirjallisuus

Aronen, T. 1996. Genetic transformation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Väitöskirja. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 595. Punkaharju: Metsäntutkimuslaitos. 53 p. ISBN 951-40-1504-5

Aronen, T., Hohtola, A., Laukkanen, H. & Häggman, H. 1995. Seasonal changes in the transient expression of a 35S CaMV-GUS gene construct introduced into Scots pine buds. *Tree Physiology* 15: 65–70.

Aronen, T. & Häggman, H. 1995. Differences in *Agrobacterium* infections in silver birch and Scots pine. *European Journal of Forest Pathology* 25: 197–213.

Aronen, T., Häggman, H. & Hohtola, A. 1994. Transient  $\beta$ -glucuronidase expression in Scots pine tissues derived from mature trees. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 2006–2011.

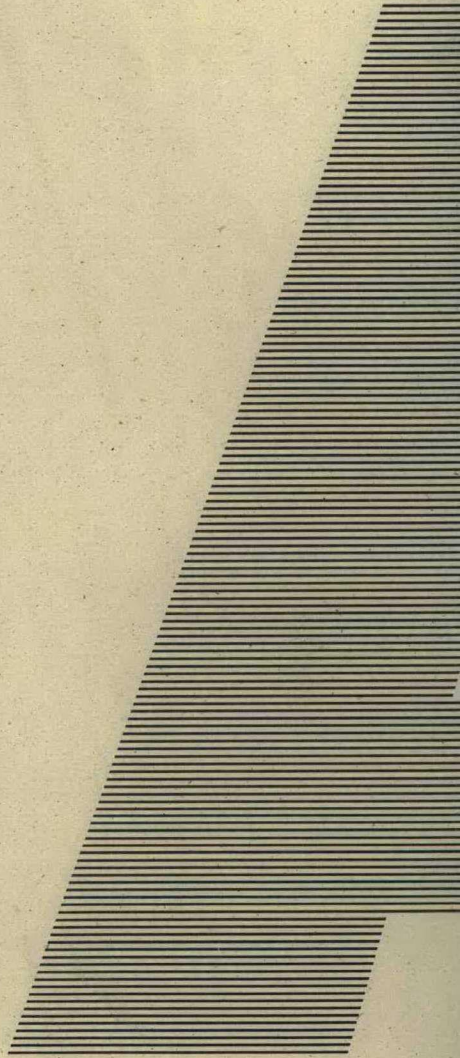
- Bevan, M.** 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711–8721.
- Bommineni, V. R., Datla, R. S. S. & Tsang, E. W. T.** 1994. Expression of *gus* in somatic embryo cultures of black spruce after microprojectile bombardment. *Journal of Experimental Botany* 45: 491–495.
- Block, M. de** 1990. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiology* 93: 1110–1116.
- Bondt, A. de, Eggermont, K., Pennickx, I., Goderis, I. & Broekaert, W. F.** 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 15: 549–554.
- Brasileiro, A. C. M., Lepié, J. C., Muzzin, J., Ounnoughi, D., Michel, M. F. & Jouanin, L.** 1991. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. *Plant Molecular Biology* 17: 441–452.
- Charest, P. J., Caléro, N., Lachance, D., Datla, R. S. S., Duchesne, L. C. & Tsang, E. W. T.** 1993. Microprojectile-DNA delivery in conifer species: factors affecting assessment of transient gene expression using the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene. *Plant Cell Reports* 12: 189–193.
- Charest, P. J., Devantier, Y. & Lachance, D.** 1996. Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 32: 91–99.
- Charest, P. J., Stewart, D. & Budicky, P. L.** 1992. Root induction in hybrid poplar by *Agrobacterium* genetic transformation. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 1832–1837.
- Clapham, D., Ekberg, I., Eriksson, G., Hood, E. & Norell, L.** 1990. Within-population variation in susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* A281 in *Picea abies* (L.) Karst. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 654–656.
- Clapham, D., Manders, G., Yibrah, H. S. & Arnold, S. von** 1995. Enhancement of short- and medium-term expression of transgenes in embryogenic suspensions of *Picea abies* (L.) Karst. *Journal of Experimental Botany* 46: 655–662.
- Calfalonieri, M., Balestrazzi, A. & Bisoffi, S.** 1994. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 13: 256–261.
- Donahue, R. A., Davis, T. D., Michler, C. H., Riemenschneider, D. E., Carter, D. R., Marquardt, P. E., Sankhla, N., Sankhla, D., Haissig, B. E. & Isebrands, J. G.** 1994. Growth, photosynthesis, and herbicide tolerance of genetically modified hybrid poplar. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 2377–2383.
- Ellis, D., McCabe, D., McInnis, S., Ramachandran, R., Russell, D., Wallace, K., Martinell, B., Roberts, D., Raffa, K. & McCown, B.** 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology* 11: 84–89.
- Fillatti, J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B. & Comai, L.** 1987. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Molecular and General Genetics* 206: 192–199.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R. & Flick, J. S.** 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803–4807.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Montagu, M. van & Schell, J.** 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209–213.
- Huang, Y., Diner, A. & Karnosky, D.** 1991. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 27P: 210–217.
- Kajita, S., Osakabe, K., Katayama, Y., Kawai, S., Matsumoto, Y., Hata, K. & Morohoshi, N.** 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of poplar using disarmed binary vector and the overexpression of a specific member of a family of poplar peroxidase genes in transgenic poplar cell. *Plant Science* 103: 231–239.
- Lepie, J. C., Bonadebottino, M., Augustin, S., Pilate, G., Letan, V. D., Delplanque, A., Cornu, D. & Jouanin, L.** 1995. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera, Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Molecular Breeding* 1: 319–328.
- Newton, R. J., Yibrah, H. S., Dong, N., Clapham, D. H. & Arnold, S. von** 1992. Expression of an abscisic acid inducible promoter in *Picea abies* (L.) Karst. following bombardment from an electric discharge particle accelerator. *Plant Cell Reports* 11: 188–191.



- Nilsson, O., Aldén, T., Sitbon, F., Little, C. H. A., Chalupa, V., Sandberg, G. & Olsson, O.** 1992. Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promoter-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging. *Transgenic Research* 1: 209–220.
- Pena, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J. A., Durán-Vila, N. & Navarro, L.** 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 14: 616–619.
- Robertson, D., Weissinger, A. K., Ackley, R., Glover, S. & Sederoff, R. R.** 1992. Genetic transformation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) using somatic embryo explants by microprojectile bombardment. *Plant Molecular Biology* 19: 925–935.
- Scorza, R., Morgens, P. H., Cordts, J. M., Mante, S. & Callahan, A. M.** 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of peach (*Prunus persica* L. Batsch.) leaf segments, immature embryos, and long-term embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26: 829–834.
- Séguin, A., Lachance, D. & Charest, P. J.** 1996. Transient gene expression and stable genetic transformation into conifer tissues by microprojectile bombardment. *Plant Tissue Culture Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. B13: 1–46.
- Shah, D. M., Rommens, C. M. T. & Beachy, R. N.** 1995. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends in Biotechnology* 13: 362–363.
- Stomp, A.-M., Weissinger, A. & Sederoff, R. R.** 1991. Transient expression from microprojectile-mediated DNA transfer in *Pinus taeda*. *Plant Cell Reports* 10: 187–190.
- Tsai, C. J., Podila, G. K. & Chiang, V. L.** 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of quaking aspen (*Populus tremuloides*) and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 14: 94–97.
- Tuominen, H., Sitbon, F., Jacobsson, C., Sandberg, G., Olsson, O. & Sundberg, B.** 1995. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid biosynthetic genes. *Plant Physiology* 109: 1179–1189.
- Walter, C., Smith, D. R., Connett, M. B., Grace, L. & White, D. W. R.** 1994. A biolistic approach for the transfer and expression of a *gusA* reporter gene in embryogenic cultures of *Pinus radiata*. *Plant Cell Reports* 14: 69–74.
- Vancanneyt, G., Schmidt, A., O'Connor-Sanchez, A., Willmizer, L. & Rocha-Sosa, M.** 1990. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events. *Molecular and General Genetics* 220: 245–250.
- Yibrah, H. S., Manders, G., Clapham, D. H. & Arnold, S. von** 1994. Biological factors affecting transient transformation in embryogenic suspension cultures of *Picea abies*. *Journal of Plant Physiology* 144: 472–478.
- Zambryski, P. C.** 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 465–490.

		Julkaisun sarja ja numero Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 18	
		Julkaisuaika (kk ja vuosi) Maaliskuu 1997	
Tekijä(t) Sirkka Immonen (toim.)		Tutkimushankkeen nimi	
		Toimeksiantaja(t) Maatalouden tutkimuskeskus	
Nimike Solusta tuottavaan kasviin. Hyötykasvien solukkoviljelyseminaari. Esitelmät			
Tiivistelmä  Hyötykasvien solukkoviljelyseminaari "Solusta tuottavaan kasviin" järjestettiin Maatalouden tutkimuskeskuksessa Jokioisilla 10.-11.12.1996. Osanottajat edustivat mm. yliopistoja ja tutkimuslaitoksia. Esitelmissä käsiteltiin sekä metsäpuita, peltokasveja että puutarha- ja koristekasveja. Solukkoviljelyä tarkasteltiin sekä käytännön kannalta että kasvitieteellisen perustutkimuksen osana. Seminaarin aihepiirit olivat 1) mikrolisäys, 2) somaattinen ja gameettinen embryogeneesi ja 3) uuden geneettisen muuntelun tuottaminen. Puuvartisten kasvien mikrolisäyksellä voidaan ratkaista useita kasvulliseen ja siemenlisäykseen liittyviä ongelmia. Mikrolisäystä käytetään jo mm. terveen taimimateriaalin tuottamiseksi useista puutarha- ja koristekasvilajeista. Embryogeneesiä käsiteltiin sekä perustutkimuksen että käytännön sovellutusten kannalta. Somaattinen embryogeneesi on usein valittu tapa regeneroida kasveja solukkoviljelmistä ja sitä sovelletaan mm. keinosiementekniikassa. Gameettista embryogeneesiä tutkitaan useilla viljakasveilla, ja Suomessa sitä sovelletaan jo ohran ja vehnän jalostuksessa. Kolmannessa aihepiirissä käsiteltiin kasvinjalostuksen näkökulmasta mm. somakloonista muuntelua, somaattisia hybridejä ja solukkoviljelyä geeninsiirroissa. Näitä tekniikoita voidaan käyttää kasvinjalostuksen apuna kasvien geneettisen pohjan laajentamiseksi ja haluttujen ominaisuuksien siirtämiseksi. Ne vaativat kuitenkin vielä kehittämistä vakiintuakseen laajaan käyttöön.			
Avainsanat androgeneesi, embryogeneesi, geeninsiirto, <i>in vitro</i> , kallus, mikrolisäys, regeneraatio, somaklooni			
Toimintayksikkö Kasvinjalostuksen tutkimusala, 31600 Jokioinen			
ISSN 1238-9935	ISBN 951-729-483-2	<input type="checkbox"/> Tuloksia voi soveltaa luomuviljelyssä	
Myynti: MTT tietopalveluyksikkö, 31600 JOKIOINEN Puh. (03) 41 881 Telekopio (03) 4188 339		Sivuja 174 s. + 1 liite	Hinta 70 mk + alv 12 %





Jokioinen 1997  
ISBN 951-729-483-2  
ISSN 1238-9935