

# TESTATTUJEN PUUTARHAKASVIEN PITKÄAIKAISVARASTOINTI KYLMSÄILYTYKSEN AVULLA

Long-term storage of tested horticultural plants  
by cryopreservation



## LOPPURAPORTTI

MTT, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema  
30.3.2006

# LOPPURAPORTTI

## TESTATTUJEN PUUTARHAKASVIEN PITKÄAIKAISVARASTOINTI KYLMÄSÄILYTYKSEN AVULLA

Long-term storage of tested horticultural plants by cryopreservation

Anna Nukari<sup>1</sup> ja Marjatta Uosukainen<sup>2</sup>  
MTT Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, Laukaa  
Antinniementie 1, 41330 Vihtavuori  
<sup>1</sup>anna.nukari@mtt.fi, <sup>2</sup>marjatta.uosukainen@mtt.fi

Raportin valokuvat ovat Marjatta Uosukaisen ottamia. Osa tekstistä perustuu Sanna Kauppinen laatimaan hankesuunnitelmaan. Kaaviokuvat eri kryosäilytysmenetelmien työvaiheista (Liite 5) on muokattu Qiaochun Wangin laatimista kaavioista.

Hanketta ovat rahoittaneet MTT Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema, Maa- ja metsätalousministeriö, Kansallinen kasvigeenivaraohjelma, Helsingin yliopiston soveltavan biologian laitos ja EU.

Kiitämme yhteistyöstä ja asiantuntija-avusta professori Jari Valkosta, tohtori Qiaochun Wangia ja professori Hely Häggmania sekä vanhempi tutkija Marja Aaltosta, vanhempi tutkija Mia Sahramaata ja muuta hankkeen toteutukseen osallistunutta MTT:n henkilökuntaa.

# Sisällys

<b>1 Tutkimuksen tavoitteet</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Tutkimusosapuolet ja yhteistyö</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Tutkimuksen tulokset</b> .....	<b>4</b>
<u>3.1 Tutkimusmenetelmät ja aineisto</u> .....	4
3.1.1. Kylmäsäilytysmenetelmät .....	4
3.1.2 Tutkimuksessa käytetyt menetelmät .....	7
3.1.2 Tutkimuksessa käytetyt aineistot .....	8
<u>3.2 Tutkimustulokset</u> .....	9
3.2.1 Vadelman kylmäsäilytys ja puhdistaminen kasvitaudeista kylmäsäilytyksen avulla .....	9
3.2.2. Kylmäsäilytystekniikan käyttöönotto vadelman avulla .....	11
3.2.3 In vitro -versonkärkien kylmäsäilytysmenetelmän kehittäminen ( <i>Prunus</i> - lajit) .....	12
3.2.4 Lepotilaisten silmujen kylmäsäilytysmenetelmän testaaminen ja menetelmän kehittäminen ( <i>Prunus</i> -lajit, omena).....	14
3.2.5 Herukan kylmäsäilytysmenetelmän testaus ja puhdistuskokeilu reversioviruksesta kylmäsäilytyksen avulla (NGB:n herukka-aineisto Piikkiössä) .....	15
3.2.6 Muut tutkimuksen toteutumista tukeneet tehtävät .....	16
3.2.7 Muita tuloksia .....	17
<u>3.3 Toteutusvaiheen arviointi</u> .....	17
3.3.1 Tavoitteiden toteutuminen .....	17
3.3.2 Hankkeen eteneminen .....	18
3.3.3 Tutkimuksen kannalta merkittävimmät muuttujat .....	19
<u>3.4 Julkaisut</u> .....	19
3.4.1 Tieteellisen julkaisun kirjoittaminen vadelman kylmäsäilytyksestä ja viruspuhdistuksesta .....	20
3.4.2 Hankkeesta kirjoittaminen puutarha-alan ammattilehtiin: esittely ja tulokset sekä käyttökelpoisuus .....	20
3.4.3 Tieteellisen julkaisun kirjoittaminen <i>Prunus</i> -lajien kylmäsäilytyksestä (Acta Agriculturae Scandinavica) .....	20
3.4.4 Valmistuneet julkaisut.....	20
<b>4 Tulosten arviointi</b> .....	<b>21</b>
<u>4.1 Tulosten käytännön sovelluskelpoisuus</u> .....	21
<u>4.2 Tulosten tieteellinen merkitys</u> .....	22
<b>5 Kirjallisuus</b> .....	<b>23</b>
<b>Liitteet</b> .....	<b>24</b>

## 1 Tutkimuksen tavoitteet

Tämä hanke oli Suomen maa- ja metsätalouden kansallista geenivaraohjelmaa toteuttavan tutkimuksen (MTT:n rekisterinumero 317) ”Suomen kansallisen kasvigeenivaraohjelman toimeenpano” osatutkimus ja toteutettiin vuosina 2004-2006.

Hankkeen päämäärä oli menestyksellisesti ottaa käyttöön kylmäsäilystekniikka ilmastolliselta kestävyydeltään testattujen ja tautivapaiden puutarhakasvien pitkäaikaissäilytyksessä MTT:ssä. Hanke palvelee kansallisen kasvigeenivaraohjelman, varmennetun ja tavanomaisen taimituotannon, Pohjoismaisen geenipankin ja puutarhakasvinjalostuksen tarpeita. Hankkeen päätavoite oli käynnistää MTT:ssä puutarhakasvien kokoelmien pitkäaikaisvarastointi kylmäsäilytysmenetelmällä. Hankkeeseen valitut kasvit määräytyivät MTT:n geenivaratyöskentelyn perusteella.

Hankkeen osatavoitteet olivat:

1. Vadelman kylmäsäilytys ja puhdistaminen kasvitaudeista kylmäsäilytyksen avulla
2. Kylmäsäilytystekniikan käyttöönotto vadelman avulla
3. *In vitro* -versonkärkien kylmäsäilytysmenetelmän kehittäminen (*Prunus*-lajit)
4. Lepotilaisten silmujen kylmäsäilytysmenetelmän testaaminen ja menetelmän kehittäminen (*Prunus*-lajit, omena)
5. Herukan kylmäsäilytysmenetelmän testaus ja puhdistuskokeilu reversioviruksesta kylmäsäilytyksen avulla (NGB:n herukka-aineisto Piikkiössä)

Osatavoitteiden 1 ja 2 järjestys on vaihdettu toteutuneen aikataulun mukaiseksi. Osatavoitteiden toteuttamista varten hanke jaettiin kymmeneen tehtävään (Liite 4).

## 2 Tutkimusosapuolet ja yhteistyö

Hanke toteutettiin Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) ja Helsingin yliopiston (HY) yhteistyönä. Hankkeen pääasiallinen toteutuspaikka oli MTT Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema. Kylmäsäilytystyö tehtiin Laukaan solukkolisäyslaboratoriossa hyödyntäen yksikön vuosikymmenien kokemusta mikrolisäyksestä, kasvintuhojatestauksesta ja -puhdistuksesta sekä kasvihuonetuotannosta. Laitteet ja tarvikkeet hankittiin MTT:n varoilla sekä hyödyntäen jo olemassa olevaa MTT:n laitekantaa. MTT vastasi hankkeessa osatavoitteista 2, 3, 4 ja 5.

HY vastasi hankkeessa osatehtävästä 1 eli vadelman kylmäsäilytysmenetelmien testaus ja viruspuhdistusosa tehtiin HY soveltavan biologian laitoksella vuonna 2004. Alan kansainvälisen huippututkijan, kiinalaisen tohtori Qiaochun Wangin syksystä 2003 syksyyn 2004 kestänyt tutkijavierailu soveltavan biologian laitoksella mahdollisti kylmäsäilytystekniikan tietotaidon siirtämisen projektin käyttöön.

Tutkimuksessa käytetty kasvimateriaali oli ensisijaisesti Laukaassa mikrolisäyksessä valmiiksi olevaa sekä MTT:n kenttäkokoelmista olevaa aineistoa.

## **Hankkeen toteutusryhmä koostui seuraavista henkilöistä:**

### MTT, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema

- Marjatta Uosukainen, johtaja. Projektin vastuullinen johtaja. Hänen tietämystään mikrolisäyksestä ja säilytykseen aiotuista kasveista hyödynnettiin hankkeen aikana.
- Sanna Kauppinen (huhti-kesäkuu 2004), tutkija, vastasi hankkeen ja tutkimuksen teknisestä käynnistämisestä.
- Anna Nukari (7.6.2004-31.3.2006), tutkija. Pääasiallinen työn suorittaja hankkeessa. Tehtävänä oli kylmäsäilytysmenetelmien testaaminen valituille kasveille ja menetelmien edelleen kehittäminen.
- Saija Rantala (helmi-lokakuu 2005), tutkija. Tutkimuksen toteuttaminen.
- Jaana Laamanen, tutkija, (sijaisena Riitta Peräinen, tutkija, marraskuusta 2005 lähtien). Kasvimateriaali ja tautitestausta. Antoivat asiantuntija-apua kylmäsäilytysmenetelmän kehittämisessä viruspuhdistuksen apuvälineeksi.
- Tekninen henkilöstö: Riitta Toivakka, tutkimusmestari, Virpi Tiainen, tutkimusmestari, Virpi Lahtonen, tutkimusmestari, Satu-Marja Virtanen, tutkimusapulainen, Pirkko Jalkanen, tutkimusmestari, Hannu Tiainen, tutkimusmestari, Anu Flyktman, laboratorioharjoittelija.

### HY, soveltavan biologian laitos

- Qiaochun Wang, virologian tohtori, puutarhatieteen professori, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan, Kiina. Hän on erikoistunut kasvien mikrolisäysmateriaalin kylmäsäilytykseen ja viruspuhdistukseen kylmäsäilytyksen avulla (Wang ym. 2003) ja vuoden pituisella Suomen vierailullaan hän siirsi tietotaitonsa projektin käyttöön.
- Jari Valkonen, kasvipatologian professori. Hän toi projektiin tietoa kylmäsäilytystekniikan soveltamisesta kasvitautien puhdistuskeinona sekä järjesti mahdollisuuden viruspuhdistuskokeisiin ja tohtori Wangin vierailuun.

### Neuvonantajat/yhteistyötahot

- Mia Sahramaa, vanhempi tutkija, MTT Kasvintuotanto, Jokioinen. Kansallisen kasvigeenivaraohjelman koordinoija. Hän toi hankkeessa esiin kansallisen kasvigeenivaraohjelman tarpeet.
- Marja Aaltonen, vanhempi tutkija, MTT Hämeen tutkimusasema, Pälkäne. Hän toimi hankkeessa Hämeen tutkimusaseman *Prunus*-kokoelmien asiantuntijana.
- Hely Häggman, kasvifysiologian professori Oulun yliopiston biologian laitokselta avusti monen vuoden kylmäsäilytysmenetelmien tutkimuskokemuksellaan merkittävästi tämän hankkeen tutkimussuunnitelman laadinnassa.

## 3 Tutkimuksen tulokset

### 3.1 Tutkimusmenetelmät ja aineisto

Tutkimus käynnistettiin kirjallisuusselvityksellä kasvien kryosäilytyksessä käytettävistä menetelmistä ja tutkimukseen valituille kasveille mahdollisesti kehitetyistä sovellutuksista.

#### 3.1.1. Kylmäsäilytysmenetelmät

Kirjallisuusselvityksen mukaan kylmäsäilytysmenetelmät voidaan jakaa kahteen ryhmään:

- 1) perinteisiin jäädytysmenetelmiin ja
- 2) hiljattain kehitelyihin vitrifikaatiomenetelmiin.

Perinteisiä jäädytysmenetelmiä ovat kasvinosan upotus suoraan nestetyypeen (fast freezing method), kasvinosan jäädyttäminen vaiheittain  $-20^{\circ}\text{C}$ :sta  $-196^{\circ}\text{C}$ :een (prefreezing method) tai kasvinosan jäädyttäminen  $0,2-1,0^{\circ}\text{C}/\text{minuutti}$  noin  $-40^{\circ}\text{C}$ :een, jonka jälkeen näyte upotetaan nestetyypeen (slow-cooling method, two-step freezing). Nämä menetelmät soveltuvat karaistuneen, lepotilassa olevan kasvinosan säilyttämiseen. Kaksivaihejäädytystä (two-step freezing) käytetään lähinnä lepotilaisten silmujen säilytykseen, mutta se soveltuu myös mikrolisäysmateriaalin säilyttämiseen (Reed 1998). Kaksivaihejäädytyksessä tarvitaan ohjelmoitavaa pakastinta lämpötilan hallittuun laskemiseen. Muut menetelmät ovat tekniikaltaan yksinkertaisempia.

Vitrifikaatioon perustuvia menetelmiä käyttäen on viime vuosina saatu hyviä tuloksia mikrolisätyn kasvimateriaalin, kuten versonkärkien ja somaattisten alkioiden, jäädyttämisessä. Vitrifikaatiopohjaisten menetelmien vaatimuksena on mikrolisäysmenetelmän toimiminen säilytettävälle kasville. Vitrifikaatio-menetelmässä (vitrification method, Sakai ja Kobayashi 1990) kasvimateriaalia käsitellään ensin väkevällä jäänsuoja-aineliuoksella (vitrifikaatioliuos) ja upotetaan lopuksi nestetyypeen. Herkkien mikrolisäysmateriaalien kanssa on mahdollista päästä hyviin säilytystuloksiin kapselointimenetelmien avulla. Kapselointi-dehydraatiomenetelmässä (encapsulation-dehydration method, Fabre ja Dereuddre 1990) kasvimateriaali ensin kapseloidaan algiinaatin ja kalsiumkloridin avulla. Tämän jälkeen kapselia kuivatetaan ilmvirrassa ennen siirtoa nestetyypeen. Kapselointi-vitrifikaatiomenetelmässä (encapsulation-vitrification method, Matsumoto ym. 1995) kasvimateriaali kapseloidaan ja kuivatetaan sitten vitrifikaatioliuoksen avulla.

Kylmäsäilytys muodostaa työketjun, joka voidaan jakaa kolmeen päävaiheeseen ja yhdeksään osavaiheeseen seuraavasti:

I. Säilytettävän kasviaineiston esikäsittelyt

1. Emokasvien esikäsittely
2. Kasvinosan siirrostus
3. Säilytettävän kasvinosan esikäsittely
4. Jäänsuoja-aineiden lisääminen

II. Jäädytys ja varastointivaihe

5. Asteittainen/nopea jäädytys
6. Kylmäsäilytys

III. Kylmävarastoidun aineiston elvytys

7. Sulatus
8. Jäänsuoja-aineiden poisto
9. Kasvatus ja kasvuun lähdön mittaaminen kylmäsäilytyksen jälkeen

Työketjun vaiheista joko osa tai kaikki sisältyvät sekä perinteisiin että vitrifikaatiomenetelmiin riippuen kasvilajista ja –materiaalista. Kylmänkestävät kasvilajikkeet ovat karaistumiskykynsä takia helpompia kylmäsäilytettäviä kuin leudon seudun lajikkeet (Reed 1998). Ulkona tai kasvihuoneessa sijaitsevat emokasvit karaistuvat luontaisesti lämpötilan laskiessa ja päivänpituuden lyhetessä. Käytettäessä lähtöaineistona mikrolisäysviljelmiä, emokasvien esikäsittelyvaiheessa kasvien kylmänkestävyyttä voidaan lisätä esimerkiksi sijoittamalla ne lähelle 0°C lämpötilaa ja lyhyen päivän olosuhteisiin.

Säilytettävän kasvinosan esikäsittelyssä pyritään edelleen lisäämään kasvimateriaalin kylmänkestävyyttä. Vitrifikaatiossa kasvisoluissa oleva vesi vaihdetaan jäänsuoja-aineisiin kuten sakkaroosiin, glyseroliin, etyleeniglykoliin ja dimetyylisulfoksidiin (DMSO). Tällöin solujen ja soluvälien neste muuttuu niin viskoosimaiseksi, että kidemäistä jäätä ei synny. Tämä ilmiö estää jääkiteitä rikkomasta soluja ja solujen kasaan lyhyhistymistä kuivumisen (dehydraation) takia (Bajaj 1995, Sakai 1998). Vitrifikaatioon voidaan yhdistää kasvupisteen kapselointi alginaattihelmen sisään. Kapseloinnin avulla kasvinosaa on helppo käsitellä ja aineiden vaihto sekä dehydraatio tapahtuvat hallitusti (Towill 2002). Kasvimateriaalin kuivatus voi tapahtua liuosten lisäksi silikageelin tai ilmapinnan avulla.

Esikäsittelyjen jälkeen kasvimateriaali jäädytetään joko asteittain tai suoraan nestemäiseen tyypeen. Lepotilaisille silmuille käytetään esimerkiksi alle 1 °C/min laskevaa lämpötilaa aina -40 °C:een asti, jonka jälkeen silmut upotetaan nestetyypeen. Jäänsuoja-aineilla käsitelty ja kapseloitu mikrolisäysaineisto sen sijaan on saatava jäätymään mahdollisimman nopeasti, jotta jääkiteet eivät pääse kasvamaan vaan soluneste muuttuu kiteettömäksi jääksi (vitrifioituu).

Lepotilaiset silmut sulatetaan hitaasti muutaman asteen lämpötilassa kosteassa turpeessa (etenkin jos silmut ovat pakkaskuivatetut ja vaativat siksi veden palautumisen takaisin soluihin eli rehydraation). Silmut voidaan sulattaa myös nopeasti vesihauteessa, mikäli silmut on pakattu kryoputkiin. Tämän sulatustavan etuna on mahdollisen turpeella rehydratoitumisen aikana tapahtuvan mikrobien kasvun välttäminen. Sulatetut silmut silmutetaan perusrunkoihin tai siirrostetaan kasvamaan ravintoalustalle *in vitro*.

Mikrolisätyt aineistot sulatetaan pitämällä niitä +25 - +40 °C:een vesihauteessa muutaman minuutin ajan. Tämän jälkeen jäänsuoja-aineet pestään pois ja versonkärjet

siirretään kasvamaan ravintoalustalle.

Tärkeimpiä kryosäilytyksen onnistumisen mittareita ovat jäädytetyn aineiston elävyys kylmäsäilytyksen jälkeen ja kasvinosan regeneraatiokyky eli kyky kasvattaa erilaistumattomasta solukosta uusi kasvi. Jokainen yllä kuvatusta yhdeksästä vaiheesta vaatii kasvilajikohtaista menetelmän tarkistamista tai kehittämistä, jotta kylmäsäilytyksessä saavutetaan toimintavarmuus. Myös lajin sisällä eri genotyypit voivat vaatia menetelmän tarkentamista selviytyäkseen kylmäsäilytyksestä (Reed 1998).

Keskeisin ongelma on kasvimateriaalin vesipitoisuus soluissa ja soluväleissä, sillä kiteiseksi jäätyvä vesi rikkoo kasvisolut. Lähtöaineiston esikäsittely parantaa versonkärkien selviämistä kylmäsäilytyksestä. Tarvittaessa kasvimateriaalin selviämiseen kryokäsittelystä voidaan vaikuttaa esikäsittelyinä käytettävien kasvunsäätteiden, abskissiinihapon, viileäkäsittelyn ja valo-olojen avulla. Mikrolisäyviljelmästä irrotettu kasvinosa ei selviydy jäädytyksestä ilman käsittelyjä vesipitoisuutensa takia. Toisaalta jäätyminen ja jäänsuoja-aineiden lisäys aiheuttavat solun kuivumisen. Sokerit alentavat solujen vesipitoisuutta ja suojaavat soluja kuivumiselta.

Kasvimateriaalin säilytyksessä oman ongelmansa aiheuttaa säilytettävän kasviaineiston tautisuus ja erityisesti virustaudit. Säilytettävän aineiston hyödynnettävyyden kannalta on tärkeää, että varastoitava kasviaineisto olisi mahdollisimman tervettä. Laukaassa saadun kokemuksen mukaan virustartunnat heikentävät kasvien mikrolisättävyyttä. Uusien tutkimustulosten mukaan kylmäsäilytysmenetelmää voidaan käyttää myös viruspuhdistusmenetelmänä.

Virukset ovat kasveilla erityisen ongelmallisia taudinaiheuttajia, koska niitä ei voida tuhota antibiooteilla eikä fungisideilla. Lämpökäsittely ja kasvupisteen otto on vakiintunut viruspuhdistusmenetelmä. Sen heikkoutena on, että versonkärkien kasvuun lähtö solukkoviljelyssä on sitä parempi, mitä suurempi kasvupiste otetaan, kun taas virusten puhdistus on sitä tehokkaampaa, mitä pienempään kasvupisteeseen voidaan tyytyä. Näiden kahden, vastakkaisen vaatimuksen takia kasvupisteiden puhtausaste jää alhaiseksi.

Kylmäsäilytyksessä tällaista elävyyden ja puhdistuvuuden vastakkainasettelua ei ole. Luumupuiden pienistä kasvupisteistä vain 20 % puhdistui luumunrokkoviruksesta (*Plum pox virus*) tavanomaisella kasvupisteenottomenetelmällä, mutta pakkasäilytyksellä 50 % kasvupisteistä oli virusvapaita kasvupisteen koosta riippumatta ja kasvupisteiden elävyys oli hyvä (Brison ym. 1997). Viiniköynnöksen puhdistaminen viiniköynnöksen A-viruksesta (*Grapevine virus A*) tuotti samanlaisen tuloksen (Wang ym. 2003).

Ilmiötä tutkittaessa kasvupisteiden mikroskooppitarkastelussa havaittiin, että pakkasäilytys tappaa suurimman osan kasvupisteiden soluista, jättäen vain muutaman meristeemisolukerroksen jäljelle (Helliot ym. 2002). Tämä ei vaikeuta kasvupisteen kasvuunlähtöä, mutta tuhoaa lähes kaikki virustartunnan saaneet solut. Useimmat virukset eivät pysty etenemään nuorimpiin kasvupistesoluihin, koska niiden väliset kuljetuskanavat (plasmodesmit) ovat kehittymättömiä. Näin pakkasäilytys täydentää veitsellä tehtävää, tautisen ja terveen solukon erottamista toisistaan kasvupisteessä.

Esimerkiksi vadelmaa vaivaavat lukuisat erilaiset virukset sekä fytoplasmat, jotka leviävät pellolla nopeasti hyönteisten ja siitepölyn välityksellä (Tapio ym. 1997) ja



taannuttavat sadon kuudesosaan normaalista (Bremer 1980). Vadelman pakkassäilytyksestä on kuitenkin vähäisesti tietoa. Terveen aineiston ylläpito, varmennettu taimituotanto sekä kasvustojen säännöllinen uusiminen terveitä taimia käyttäen on vadelmantuotannossa aivan välttämätöntä (Ellis ym. 1991).

Vadelman puhdistaminen joistakin viruksista ja fytoplasmoista on osoittautunut nykymenetelmin lähes mahdottomaksi. Vain neljän erilaisen viruksen puhdistamista kasvupisteistä oli aiemmin tutkittu pakkassäilytyksellä (Brison ym. 1997, Helliott ym. 2002, Wang ym. 2003), ja vain yksi niistä kuului vadelmassakin esiintyviin potyvirusiin. Fytoplasmojen puhdistamista kasvupisteistä ei ole tällä menetelmällä tutkittu.

### **3.1.2 Tutkimuksessa käytetyt menetelmät**

Tutkimuksessa ensisijaisesti käytetty menetelmä oli solukkolisätyjen aineistojen kryosäilytys. Lisäksi kokeiltiin lepotilaisten silmuaineistojen kryosäilytystä ja eri elvytysmenetelmiä niille. Menetelmiä kehitettäessä käytettiin lähinnä faktorikokeita, joissa tärkeimmät muuttujat olivat kasviaineistot, silmujen tai versonkärkien pituus sekä esikäsittelyt ja vitrifikaatiokäsittelyjen pituus. Työ oli kartoitusluonteista ja tulokset olivat +/- tyyppisiä. Tutkimuksen kuluessa tulokset käsiteltiin eloon jääneiden, versoontuneiden ja hyvin lisääntyviksi viljelmiksi kehittyneiden kasvupisteiden prosenttiosuuksina tapauksista. Julkaisuja varten aineistot yksittäisistä kokeista käsitellään kullekin aineistolle sopivin menetelmin.

Mahdollisuutta hyödyntää kryosäilytystä viruspuhdistuksessa tutkittiin HY:ssa käyttäen menetelminä kapselointi-dehydraatiota ja kapselointi-vitrifikaatiota. Puhdistustehoa tutkittiin vadelman kääpiökasvuviruksen saastuttamalla vadelma-aineistolla.

Tutkimuksen alkuvaiheessa havaittiin, että karaisevat lämpötilaan tai valorytmiin liittyvät esikäsittelyolosuhteet eivät olleet välttämättömiä. Siksi näiden tekijöiden vaikutusten tarkempi selvittäminen jätettiin tämän hankkeen ulkopuolelle. Osalle lepotilaisista silmuista käytettiin esikäsittelyä pakkaskuivatusta.

Solukkoviljelmistä eristettyjen versonkärjien tai silmujen vesipitoisuuden alentamisen menetelmänä tutkittiin esikasvatusta sokeripitoisuudeltaan portaitaisesti kasvavilla ravinnealustoilla. Kun tavoiteltu korkein sokeripitoisuus oli saavutettu, kasvinosat käsiteltiin vitrifikaatioliuoksin.

Jäänsuoja-aineseosten hyväksi havaittu koostumus vaihtelee kirjallisuudessa paljonkin. Yleisesti hyväksi havaittu ja eri kasveille sopiva seos oli PVS2-liuos (plant vitrification solution 2). Yksinkertaisiin faktorikokeisiin sopivan seoksen löytämiseksi ei ollut tarvetta ryhtyä. Kasvinosan kapselointi alginaattiliuoksessa ja kuoren muuttaminen kalsiumin avulla viskoosimaiseksi parantaa hallittua aineidenvaihtoa ja kontrolloi solujen kuivumista.

Jäädytysmenetelmistä solukkolisätyille kasvinosille käytettiin esikäsittelyjen jälkeistä suoraa upotusta huoneenlämmöstä nestetyypeen. Lepotilaisille silmuille kokeiltiin 1) hidasta jäädytystä ja 2) silmujen upotusta suoraan ulkona vallitsevasta lämpötilasta nestetyypeen.

Solukkoviljeltyjen materiaalien sulatuksessa käytettiin nopeaa sulatusta vesihauteessa ja elvytystä solukkoviljelyalustoilla. Lepotilaisten silmujen sulatus- ja elvytysvaiheessa verrattiin keskenään kahta menetelmää: 1) sulatusta turpeella yhdistettynä silmutukseen ja 2) sulatusta vesihauteessa yhdistettynä solukkoaloitusten tekoon silmuista.

Kasvikohtaisessa tutkimuksessa lähdettiin liikkeelle kullekin kasville todennäköisimmin soveltuvalla, olemassa olevalla kylmäsäilytysmenetelmällä, jota muunneltiin tarpeen mukaan. Lähestymistapana tutkimuksessa oli, että haettiin mahdollisimman yksinkertaista menetelmää. Vadelmalle kehitettyä pisara-vitrifikaatio-menetelmää ryhdyttiin testaamaan kaikille muillekin lajeille. menetelmää mukautettiin kasvilajikohtaisesti saadun näytön ja käyttökelpoisuuden mukaisesti.

### 3.1.2 Tutkimuksessa käytetyt aineistot

Kirjallisuusselvityksen perusteella vadelma soveltui kryotutkimuksen kohteeksi erinomaisesti. Vadelmaa käytettiin mallikasvina kotiutettaessa menetelmää hankkeeseen sekä kehitettäessä eri kryosäilytys- ja viruspuhdistusmenetelmiä. Käytävissä oli sekä vadelman kääpiökasvuviroosin saastuttamaa että valmiiksi viruspuhdistettua kontrolliaineistoa.

Vadelmaosion ja menetelmän Laukaaseen kotiuttamisen jälkeen tutkimusta laajennettiin puuvartisiin kasveihin. Tutkittavat kasvit olivat Laukaan solukkolaboratorion virustestattua lisäsmateriaalia: neljä luumulajiketta (*Prunus domestica*), yksi kriikunalajike (*Prunus domestica* ssp. *insititia*), kolme hapankirsikkalajiketta (*Prunus cerasus*) ja yksi viherherukkajaloste (*Ribes nigrum*). Alkuperäisen tutkimussuunnitelman kasvilajien lisäksi tekniikan soveltuvuutta testattiin myös suomalaiselle humalan (*Humulus lupulus*) geenivara-aineistolle.

Lepotilaisten silmujen kryosäilytystutkimuksessa kohteina olivat omena (*Malus domestica*), hapankirsikka, luumu sekä mustaherukka (*Ribes nigrum*) ja punaherukka (*Ribes Rubrum*-ryhmä). Tutkittavat aineistot olivat peräisin joko MTT:n kenttäkokoelmista tai Laukaan ydinkasvihuoneesta.

## **3.2 Tutkimustulokset**

Hankkeessa kehitettiin kasvullisesti lisättävien puutarhakasvien geenivarojen pitkäaikais-säilytykseen nestemäisessä tyypessä soveltuvia kylmäsäilytys- eli kryosäilytysmenetelmiä. Menetelmien toimivuus testattiin käytännössä vadelmalla ja humalalla. Menetelmien osoitettiin toimivan myös puuvartisilla kasveilla, kuten viherherukalla, hapankirsikoilla ja luumuilla.

Tutkimustulokset on esitetty osatavoitteiden mukaisessa järjestyksessä.

### **3.2.1 Vadelman kylmäsäilytys ja puhdistaminen kasvitaudeista kylmäsäilytyksen avulla**

Osatavoitetta 1 tutkittiin tehtävän 1 ”Vadelman kylmäsäilytysmenetelmän ja viruspuhdistuksen kehittäminen ja virustestaukset” avulla. Julkaisu vadelman kapselointi-kryosäilytysmenetelmistä ilmestyi keväällä 2005.

Tohtori Qiaochun Wang kehitti tutkijavierailunsa aikana vuonna 2004 Helsingin yliopiston Soveltavan biologian laitoksella eri vadelmalajikkeille ja –klooneille soveltuvat kapselointi-vitrifikaatio- ja kapselointi-dehydraatio-menetelmät. Lisäksi hän loi ohjeen myös vadelman pisara-vitrifikaatiomenetelmälle. Vadelmakloonit olivat peräisin MTT Laukaan tutkimus- ja valiotaimiaseman mikrolisäyslaboratoriosta. Osa vadelmaklooneista oli terveitä ja osa kääpiökasvuviroosin ja viruskompleksin saastuttamia.

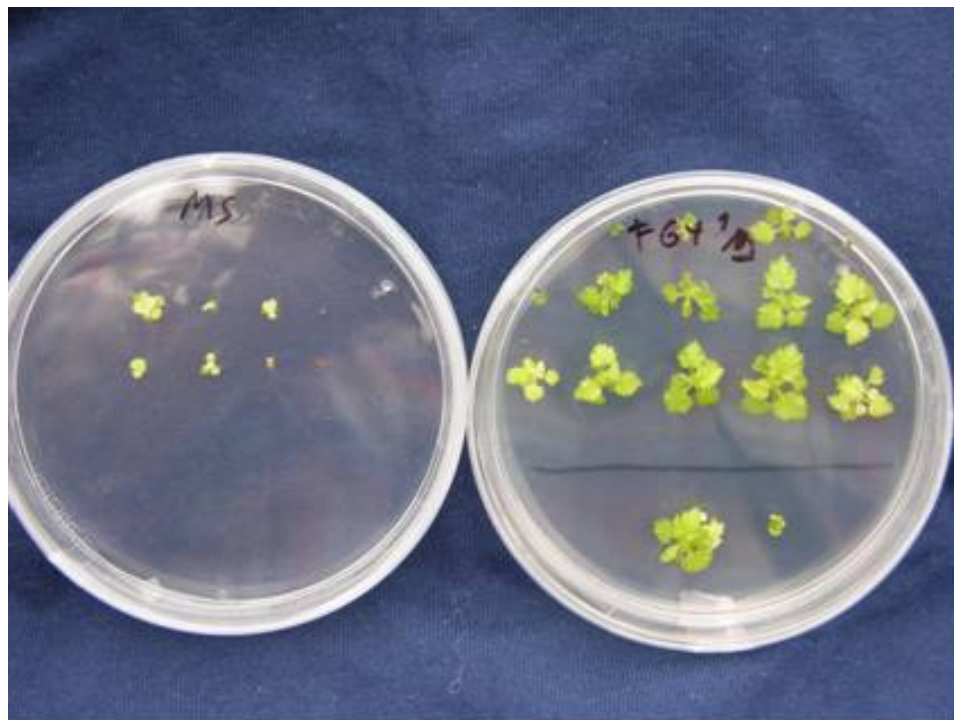
Tohtori Wang kehitti kapselointi-vitrifikaatio-menetelmän, joka soveltui hyvin tutkimuksessa käytetyille vadelmaklooneille. Parhaimmillaan 85 % versonkärjistä elpyi säilytyksestä nestetyypessä. Myös kapselointi-dehydraatio-menetelmän käyttö vadelman kylmäsäilytyksessä osoittautui mahdolliseksi, mutta käytännössä hankalaksi ja onnistumisprosentti jäi alhaisemmaksi kuin muilla menetelmillä.

Vierailunsa aikana tri Wang tutki myös käytettyjen kylmäsäilytysmenetelmien tehoa vadelman kääpiökasvuviruksen puhdistamisessa. Kääpiökasvuviruksen esiintymistä kylmäsäilytyksestä elpyneissä versonkärjissä tutkittiin ELISA-testauksen avulla. Tässä yhteydessä todettiin, että kyseinen virus esiintyy myös versojen meristeemeissä. Täten kryoterapiaa ei voitu hyödyntää viruksen eliminoimiseksi. Wangin tutkijavierailu päättyi marraskuussa 2004.

Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla valittiin Wangin tulosten perusteella käytännössä kokeiltaviksi kapselointi-dehydraatio- ja pisara-vitrifikaatio-menetelmät. Kapselointi-dehydraatiomenetelmän etuna olisi, että se ei vaadi mahdollisesti terveydelle haitallisten kylmäsäilytysliuosten käyttöä. Tästä menetelmästä luovuttiin kuitenkin syksyllä ja talvella 2004 suoritettujen kokeiden perusteella, koska käsittelyn optimointi todettiin liian hankalaksi. Pisara-vitrifikaatiomenetelmällä olosuhteiden hallinta ja täten myös saadut tulokset olivat parempia kuin dehydraatioon perustuvassa menetelmässä. Kapselointi-dehydraatio saattaisi joissakin erikoistapauksissa ja viruspuhdistusmenetelmänä toimia kapselointi-vitrifikaatio-menetelmää paremmin, sillä siinä säilyvien meristeemisolujen määrä on pienempi.

Kapselointiin perustuvien menetelmien ohella Laukaassa jatkettiin Wangin pisara-

vitrifikaatio-menetelmän optimoimista. Siinä toipumisprosentti oli korkea ja menetelmä oli silmuja säästävä ja yhtenäisen käsittelyn takaava. Menetelmä havaittiin erittäin toimivaksi, kun sen sisäänajo laboratorioon oli saatu suoritettua. Erityisesti lajiketta 'Jatsi' käytettiin mallilajikkeena vuonna 2004 ja vuoden 2005 alkupuolella. Nestetyypikäsittelystä toipuneet vadelmaviljelmät olivat elinvoimaisia ja kasvutavaltaan sekä ulkoasultaan normaaleja. Kryokäsittelystä toipuneita lajikkeiden 'Jatsi' ja 'Jenka' taimia on jo istutettu myös avomaalle.



**Kuva 1.** Kryokäsitellyt vadelmalajikkeen Jenka versonkärjet toipuvat laadullisesti paremmin Laukaan omalla kasvatusalustalla (oikealla) kuin Wangin protokollan mukaisella MS-toipumis-alustalla (vasemmalla). Versonkärjistä saatiin toipuneiksi viljelmiksi MS-alustalla kasvatetuista 45 % ja Laukaan omalla alustalla kasvatetuista 60 %. Jälkimmäisten laatu oli erinomainen, kun taas MS-alustalla kasvatetut versonkärjet kellastuivat.



**Kuva 2.** Kryokäsittelystä elvytetty vadelmalajikkeen 'Takalan Herkku' versot olivat kasvihuoneella elinvoimaisia ja ulkoasultaan täysin normaaleja. Nämä kaikki taimet on juurrutettu yhdestä ja samasta kryokäsitellystä kasvupisteestä saadusta viljelmästä. Jo yhdestäkin elpyneestä vadelman versonkärjestä saadaan nopeasti laaja viljelmä. Kun halutaan ottaa kasvi tuotantoon, kannattaa kuitenkin sulattaa kerralla kolmea eri kasvupistelinjaa edustavia versonkärkiä.

### 3.2.2. Kylmäsäilytystekniikan käyttöönotto vadelman avulla

Osatavoitetta 2 toteutettiin tehtävän 2 ”Suomalaisten vadelmalajikkeiden varastointikokeilu” avulla.

Pisara-vitrifikaatio-menetelmä valittiin käytettäväksi MTT Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla vadelman pitkäaikaisvarastoinnissa. Sen etuina todettiin olevan kapselointia vaativiin menetelmiin verrattuna kapselointiin kuluvan ajan säästyminen, kapselin mahdollisesti aiheuttamien versoontumisvaikeuksien välttäminen ja silmujen pieni tilantarve. Kasvupisteitä mahtui samaan säilytystilaan jopa noin neljä kertaa enemmän kuin kapseloituina. Varastointimenetelmän soveltuvuus testattiin kuudella eri lajikkeella: 'Jatsi', 'Jenka', 'Maurin Makea', 'Takalan Herkku', 'Muskoka' ja 'Ottawa'.

Kryotankkiin pitkäaikaissäilytykseen otettujen versonkärkien elinvoimaisuuden säilyminen tarkistettiin sulattamalla kontrollierät tunnin kuluttua nestetyyppeen upottamisen jälkeen. Kontrollinäytteissä havaittiin pieniä eroja lajikkeiden välillä (Liite 3). Keskimäärin testattujen lajikkeiden versonkärkien toipuminen onnistui hyvin. Onnistuminen oli parhaimmillaan 47 - 86 % lajikkeesta riippuen. Parhaiten elpyivät lajikkeet 'Ottawa' ja 'Jatsi' ja heikoimmin lajikkeet 'Muskoka' ja 'Maurin Makea'.

### 3.2.3 In vitro -versonkärkien kylmäsäilytysmenetelmän kehittäminen (*Prunus*-lajit)

Osatavoite 3 toteutettiin tehtävien 3 ja 4 avulla. Tehtävät olivat ”*In vitro* –kylmäsäilytysmenetelmien testaus ja kehittäminen *Prunus*-lajeille” ja ”Varastointi-kokeilu *Prunuksilla in vitro* –kylmäsäilytysmenetelmien avulla”.

Tehtävässä 3 käynnistimme syksyllä 2004 kapselointi-dehydraatio-menetelmän kehittämisen *Prunus*-lajeilla. Työ jatkui talveen 2005 tällä menetelmällä. Kosteuspitoisuuden ollessa noin 30 % eloonjääminen oli vaihtelevasti jopa 85 %, mutta myöhempi kehitys oli silti usein heikkoa. Kuivatusajan kaksin- tai kolminkertaistuttua jäi eloon vielä yksittäisiä silmuja. Näissä tapauksissa myös kuivatettujen mutta nestetypellä käsittelemättömien kontrollisilmujen kasvuun lähtö oli heikkoa. Näiden kokeilujen perusteella vedimme johtopäätöksen, että itse kuivatuskin saattoi olla liian rankka toimenpide silmuille. Tulokset vaihtelivat paljon eri käsittelykertojen välillä. Käytetyt kuivatusajat olivat myös hyvin pitkiä. Kuivatusta olisi täytynyt joko saada hidastettua yli yön kestäväksi tai nopeutettua korkeintaan kuusituntiseksi.

Täten kapselointi-dehydraatio-menetelmän jatkokehittelystä luovuttiin samoista syistä kuin vadelmilla ja kevästä 2005 alkaen keskityimme vain pisara-vitrifikaatio-menetelmän kehittämiseen. Kokeissa käytettiin luumulajikkeita ’Sinikka’, ’Kuntalan Punaluumu’, ’Kuokkala’ ja ’Savion Keltaluumu’, kriikunalajiketta ’Yleinen Sinikriikuna’ sekä hapankirsikkalajikkeita ’Yltöisten Kuulasmarjo’, ’Rauhalan Morelli’ ja ’Inkeröisten Kuulasmarjo’.

Pisara-vitrifikaatio-menetelmä yhdistettynä sitä edeltävään 2 vrk pituiseen kylmäkäsittelyyn +4 °C:ssa oli alustavissa kokeissa lupaava menetelmä. Ristiriitaisten tulosten ja menetelmän yksinkertaistamiseksi kylmäkäsittelystä luovuttiin, koska sen edullisuudesta ei ollut näyttöä.

Pisara-vitrifikaatiossa joka käsittelykerralla ainakin osa meristeemeistä jäi henkiin ja henkiinjääminen oli usein vähintään tyydyttävää. Tulokset kuitenkin vaihtelivat paljon eri käsittelykertojen välillä. Tutkimuksen päättyessä eri lajikkeiden versoontuminen kryokäsittelyn jälkeen onnistuu. Lajikekohtaista vaihtelua kuitenkin esiintyy. Toipumisalustojen koostumusta joudutaan vielä tarkistamaan, sillä totesimme kasvien regeneraatiokyvyn muuttumista kryosäilytyksen seurauksena. Solukot herkistyvät alustoissa käytetyille kasvunsääteille, mikä aiheutti kryokäsitteltyjen versonkärkien kallusmaista kasvua toipumisalustalla versoontumisen sijasta. (Vadelmilla kalluksen muodostuminen on harvinaista ja myös luumujen kapselointi-dehydraatiossa se oli hyvin vähäistä.)

Kaikilla menetelmillä toipumisen havaittiin riippuvan mm. lajikkeesta ja käytettyjen silmujen koosta. *Prunus*-lajeilla käytettävien hankasilmujen pituus voi vaihdella noin yhdestä kolmeen millimetriin. Isompia silmuja käytettäessä kasvun havaittiin alkavan nopeammin. Toisaalta isossa silmussa suojaavia lehtiä oli paljon ja käsittelyajan kryosäilytysliuoksilla tulisi mahdollisesti olla pidempi.

Menetelmän optimoimiseksi ja rutinoimiseksi tulisi selvittää vielä tarkemmin käytettävien silmujen optimikokoa, niitä ympäröivien lehtien määrän vaikutusta, kärki- ja hankasilmujen välisiä eroja ja etenkin toipumisalustan vaikutusta toipumisen onnistumiseen ja kalluksen muodostukseen. Tämän hankkeen puitteissa kattavaa toipumisalustakoetta ei ehditty enää suorittaa.



**Kuva 3.** Käsiteltäessä luomulajikkeen 'Sinikka' silmuja kapselointi–dehydraatio-menettelmällä kuivatusajalla 6 h 30 min (vasemmalla) ei tapahtunut regeneraatiota, mutta 7 h 15 min kuivatusajalla (keskellä) regeneraatio oli 57 %. Kontrollia (oikealla) ei käsitelty nestetyypellä ja kuivatusaika oli 7 h 15 min.



**Kuva 4.** Nestetyypikäsitteystä toipuneesta luumu-lajikkeen 'Sinikka' silmusta saadusta solukkoviljelmästä juurrutettuja versoja kasvihuoneella keväällä 2005. Versot olivat kasvutavaltaan normaaleja ja niitä on istutettu myös avomaalle.

Tehtävässä 4 aloitettiin keväällä 2005 varastointikokeilu *Prunus*-lajien solukkoviljelmien kylmäsäilytys-menetelmien avulla. Varastointia kokeiltiin useilla eri luomu- ja kirsikkalajikkeilla (Liite 3). Menetelmän kehittämisen tässä vaiheessa toipuminen kylmäsäilytyksestä oli riittävän tasaista, (eläviä silmuja 42-100% )vaikka siinä ei yllettykään yhtä hyvälle tasolle kuin vadelmien toipumisessa.

*Prunus*-lajeilla ei tarvitse pyrkiä vadelmilla saavutettuun toipumisprosenttiin. Vaikeammin työstettävillä lajeilla käsittelyyn otettavien kasvupisteiden määrällä voi kompensoida suhteellisen pieniäkin toipumisprosentteja. Näin voidaan onnistua pitkäaikaissäilytyksessä, vaikka toipuminen olisi heikompaakin. Pitkäaikaissäilytykseen otetuilla luumuilla versonta oli lajikkeesta riippuen parhaimmillaan 67 % ja hapankirsikoilla 82 %. Kriikunoilla saavutetut silmujen eloon-jäämisprosentit vaihtelivat välillä 15-100 %, mutta versoontuminen ei onnistunut ja menetelmäsovellus niille vaatii jatkokehittelyä. Kaikilla näillä lajeilla havaittiin kalluksen muodostumista toipumisalustalla, alustan koostumuksesta riippuen.

### 3.2.4 Lepotilaisten silmujen kylmäsäilytysmenetelmän testaaminen ja menetelmän kehittäminen (*Prunus*-lajit, omena)

Osatavoitetta 4 toteutettiin tehtävän 6 ”Kaksivaihejäädätyksen testaus ja menetelmän kehittäminen luumun ja omenan lepotilaisille silmuille” avulla. Tämä menetelmä on käytössä mm. Yhdysvalloissa omenapuiden geenivarojen säilytyksessä.

Vuonna 2004 kokeiltiin luumu- ja omenalajikkeiden lepotilaisten silmujen pakkaskuivatusta  $-4^{\circ}$  C lämpötilassa ja sen jälkeistä kaksivaihejäädätystä alkionpakastuslaitteella. Pakastetut silmut sekä pakastamaton kontrolliaineisto silmutettiin kriikuna- ja omenaperusrunkoihin, mutta valitettavasti yksikään silmuista ei lähtenyt kasvuun. Myöskään kaksivaihejäädätyksestä alkionpakastuslaitteella ei saatu hyviä kokemuksia. Menetelmä osoittautui hankalaksi, hitaaksi ja kalliiksi. Menetelmän jatkotutkimukset lopetettiin.



**Kuva 5.** Oksanpätkiä pakkaskuivatukseen käytetyssä ohjelmoitavassa jääkaappipakastimessa.





**Kuva 6.** Oksanpätkien hitaaseen jäädytykseen käytetty ohjelmoitava alkionpakastuslaite liitettynä laitteen kylmentämiseksi tarvittavaan nestetyypipulloon. Menetelmän nestetyypen kulutus on suuri.



**Kuva 7.** Silmun leikkaaminen jäädytetystä oksanpätkästä T-silmutusta varten. Jos nestetyypikäsitte-lyssä kuollutta solukkoa jää leikattuun palaan, kasvuun lähtö ei onnistu. Menetelmän hallinta vaatii harjaantunutta kättä.

Vaihtoehtoisena menetelmänä kokeiltiin keväällä 2005 avomaalta kerättyjen lepotilaisten kirsikka- ja omenapuiden silmujen siirtämistä suoraan  $-20^{\circ}\text{C}$  pakasteesta nestetyyppeen. Nestetyypestä sulatetuista silmuista otettiin solukkoviljelyaloitukset. Tällä uudella menetelmällä onnistuttiin saamaan solukkoviljelmiä kryokäsitellyistä lepotilaisista silmuista.

### **3.2.5 Herukan kylmäsäilytysmenetelmän testaus ja puhdistuskokeilu reversioviruksesta kylmäsäilytyksen avulla (NGB:n herukka-aineisto Piikkiössä)**

Tehtävässä 8 oli tarkoitus tutkia kylmäsäilytyksen lisäksi myös viruspuhdistusta kryokäsittelyn avulla Pohjoismaisen geenipankin viroottisella mustaherukka-aineistolla. Tehtävän toteuttaminen onnistui vain osittain johtuen virustautisen aineiston heikosta kunnosta. NGB:n herukka-aineisto osoittautui niin heikkokuntoiseksi, että sitä ei voitu käyttää menetelmätestauksessa. Täten tehtävässä päädyttiin tutkimaan pelkästään herukan kylmäsäilytystä ja aineistona käytettiin Laukaan virustestattua herukka-aineistoa. Menetelminä tutkittiin sekä solukkoviljelmistä otettujen silmujen että lepotilaisten silmujen kryosäilytystä.

Keväällä ja kesällä 2005 tutkittiin viherherukan solukkoviljelmien ja kasvihuoneessa talvetettujen punaherukkalajikkeiden 'Rotes Wunder Katri' ja 'Punainen Hollantilainen' sekä mustaherukkalajikkeiden 'Hedda' ja 'Mortti' lepotilaisten silmujen kylmäsäilytystä. Pensaiden lepotilaisia silmuja kuivatettiin kylmiössä silmujen kosteusprosentin laskemiseksi alle 30 %:iin. Silmut pakastettiin nestetyyppeen kaksivaihejäädätyksellä laskemalla pakaste-jääkaapin lämpötilaa ensin asteittain +2 °C:sta -20 °C:een kahden asteen tuntivauhdilla ja upottamalla silmut sen jälkeen nestetyypitankkiin. Osa lepotilaisista silmuista sulatettiin ja silmutettiin perusrunkoihin kesällä 2005 ja osasta tehtiin syksyllä 2005 solukkoaloitukset. Silmutetut silmut eivät lähteneet kasvuun, vaikka ne silmutettaessa näyttivätkin eläviltä. Silmutus ei näiden tulosten perusteella ole Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalle soveltuva kryosäilytettyjen silmujen jatkokasvatusmenetelmä. Pakastetuista versoista eristetyt solukkoviljelyaloitukset eivät myöskään elyneet kuivatus- ja nestetyypikäsittelystä.

Sen sijaan solukkoviljelmistä otettujen viherherukan silmujen toipuminen pisaravitrifikaatio-menetelmällä suoritetusta kryokäsittelystä onnistui hyvin, eläviä kasvupisteitä oli 53 - 62 % ja versovia kasvupisteitä 21 - 46 %. (Liite 3). Ongelmana oli ainoastaan fenolien muodostus toipumisalustalla, mikä aiheutti mustumista osaan kasvuun lähteneistä versoista. Mikrolisäyksessä näitä ongelmia on torjuttu mm. aktiivihiihien käytöllä kasvualustoissa. Tutkimuksen perusteella tätä menetelmää voidaan suositella herukoiden kryosäilytysmenetelmäksi.

### **3.2.6 Muut tutkimuksen toteutumista tukeneet tehtävät**

Tutkimustehtävien lisäksi hankkeen aikana toteutettiin tehtävä 5 ”Menetelmäkoulutus ja uuden tutkijan perehdyttäminen projektiin”. Tämän tehtävän tarkoituksena oli kouluttaa sekä hankkeen toteuttava henkilöstö menetelmiin että siirtää menetelmä osaksi Laukaan tutkimus- ja valiotaimiaseman laboratoriohenkilöstön ammattiosaamista.

Tutkija Sanna Kauppinen opetteli kapselointi-vitrifikaatio-, kapselointi-dehydraatio- ja pisara-menetelmän suorittamista tohtori Wangin opastuksella soveltavan biologian laitoksella 19.-28.4.2004. Kasvimateriaalina käytettiin vadelmaa. Tutkija Sanna Kauppinen siirsi eteenpäin hankkimansa kylmäsäilytysopit ja perehdytti tutkimusassistentti Anna Nukarin projektiin Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalla kesäkuun aikana. Anna Nukari opetteli kapselointi-vitrifikaatio-, kapselointi-dehydraatio- ja pisara-menetelmän suorittamista myös tohtori Wangin opastuksella Helsingin yliopiston soveltavan biologian laitoksella 19.-23.7.2004.

Laukaan meristeemialoitusten asiantuntija tutkimusmestari Riitta Toivakka perehtyi Anna Nukarin opastuksella pisara-vitrifikaatiomenetelmään vuoden 2005 alussa. Hän kokeili menestyksellisesti sen käyttöä Laukaan tutkimus ja valiotaimiasemalla olleisiin kansallisen geenivaraohjelman humalakantoihin. Anna Nukari koulutti ma. tutkija Saija Rantalan käyttämään pisara-vitrifikaatio-menetelmää helmi-maaliskuussa 2005. Saija Rantala toimi projektissa tutkijana puolen vuoden ajan suorittaen projektin tehtäviä yhdessä Anna Nukarin kanssa. Anna Nukari ja Saija Rantala saivat puolestaan Riitta Toivakalta opastusta ja ohjausta meristeemien preparoinnissa. Opiskelija Anu Flyktman toimi hankkeessa vuoden 2006 tammikuusta alkaen harjoittelijana perehtyen hankkeen käytännön toteutukseen ja kryosäilytysprosessiin.

Anna Nukari osallistui CRYMCEPT-työpajaan Leuvenin katolisella yliopistolla 12.-22.9.2005 perehtyen eri kylmäsäilytys- ja analyysimenetelmiin. Marjatta Uosukainen osallistui CRYMCEPT-työpajan kryosäilytystutkimuksesta vastaaville ja sitä kehittäville henkilöille tarkoitettuun luento-osuuteen 12.-13.9.2005.

### **3.2.7 Muita tuloksia**

Hankkeen ohessa käytännön sovellutuksena talletettiin pitkäaikaissäilytykseen Kansallisen kasvigeenivaraohjelman haltuun siirtyneet suomalaiset humalakannat keväällä 2005. Talletettuja kantoja on 16. Aineistolle tehtiin myös virustestaus. Aineistosta löytyi myös viroottisia kantoja, joten jatkossa aineistolla on mahdollista testata viruspuhdistuksen onnistumista kryosäilytyksen avulla. Myös humalien kryosäilytyksestä on valmisteilla julkaisukäsikirjoitus.

Hankkeen avulla on MTT:hen luotu kasvien kryosäilytystekniikkaan perehtynyt, eurooppalaisten ja kiinalaisten tutkijoiden kanssa verkottunut tutkimusryhmä, joka toimii aktiivisesti osana Suomen kansallisen kasvigeenivaraohjelman toimeenpanon toteuttamista.

## **3.3 Toteutusvaiheen arviointi**

### **3.3.1 Tavoitteiden toteutuminen**

Hankkeen tavoite oli ottaa MTT:ssä käyttöön kylmäsäilytystekniikka kasvullisesti lisättyjen puutarhakasviaineistojen pitkäaikaissäilytyksessä huomioiden etenkin kansallisen kasvigeenivaraohjelman tarpeet. Suunnitelman mukaisesti hankkeessa keskityttiin mikrolisäyksestä eristettyjen versonkärkien ja avomaalla tai kasvihuoneessa kasvavien emokasvien lepotilaisten silmujen kylmäsäilytysmenetelmien vertailuun ja menetelmien kehittelyyn. Versonkärkien kapselointiin perustuvia, *in vitro* –materiaalille sopiviksi havaittuja kylmäsäilytystekniikoita, kapselointi-vitrifikaatiota ja kapselointi-dehydraatiota testattiin erityisesti vadelmalla. Kylmäsäilytystekniikan soveltuvuutta eri kasvilajeille kartoitettiin käyttäen yhdestä kuuteen eri lajiketta kustakin tutkimukseen valitusta lajista. Hyvän lähtökohdan tutkimukselle antoivat varmennetun taimituotannon mikrolisäyksessä olevat keskeiset lajit sekä geenipankkitoiminnassa kootut kokoelmat.

Hanke toteutettiin hankesuunnitelman mukaisesti ja sen avulla saavutettiin asetetut tavoitteet. Poikkeamana hankesuunnitelmasta oli herukan reversioviruksesta puhdistaminen kylmäsäilytyksen avulla (NGB:n herukka-aineistosta Piikkiössä). Tämä osatehtävä jätettiin suorittamatta, koska herukka-aineisto havaittiin soveltumattomaksi ja liian huonokuntoiseksi, jotta sitä olisi voitu käyttää edes menetelmän kehittelyyn. Tämä tavoite ei kuitenkaan ollut hankkeen päätavoitteen toteutumisen kannalta merkittävä.

Vadelmien kylmäsäilytyskokeiden avulla oli tarkoitus selvittää myös pitkäaikaisen säilytyksen vaikutuksia toipumiseen eripituisten säilytysjaksojen jälkeen. Hankkeen keston lyhentäminen vuodella vei mahdollisuudet tämän asian tutkimiseen.

Ensimmäinen kapselointi-vitrifikaatiomenetelmällä käsitelty ja sen jälkeen yli vuoden kuluttua sulatettu versonkärkierä osoitti, että elinkyky säilyi ainakin näin kauan. Varsinainen säilytyskokeilu päästiin menetelmän käyttöönotossa ilmenneiden alkuvaikeuksien vuoksi aloittamaan vasta kevättalvella 2005. Näytteitä ei sulatettu tämän projektin puitteissa, koska luotettavia tuloksia olisi ehditty saada vain noin puolen vuoden säilytysajan vaikutuksesta. Pitkäaikaisvarastoinnin tutkimiseen tutkimuksen kesto oli liian lyhyt.

### **3.3.2 Hankkeen eteneminen**

Hankkeen etenemistä raportoitiin hankkeen ohjausryhmälle laadituin raportein (31.5.2004, 5.10.2004 ja 4.10.2005). Ensimmäisen vuoden aikana tavoitteena oli tutkia Helsingin yliopiston kasvipatologian professori Jari Valkosen ja aiheeseen erikoistuneen post-doc-tutkija Qiaochun Wangin avustuksella vadelman kylmäsäilytysmenetelmää ja menetelmän ominaisuutta eliminoida viruskontaminaatioita kasveista. Tulosten perusteella oli tavoitteena käynnistää vadelmalajikkeiden kylmäsäilytys. Osioista laadittiin tieteellinen julkaisu. Tulokset johtivat välittömästi myös käytännön menetelmäsovellutukseen viruspuhdistetun vadelma-aineiston pitkäaikaissäilytyksessä.

Hanke eteni ohjausryhmän hyväksymän suunnitelman mukaisesti. Järjestyneen lisärahoituksen (kasvigeenivaraojelman, työvoimahallinto ja Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema) ja aiemmalta vuodelta siirrettyjen varojen turvin hankkeen toteutusvaihetta pidennettiin kestäämään MTT:n osalta syyskuun 2005 sijasta maaliskuuhun 2006. Samalla eri osatehtävien toteutusta jaettiin alkuperäisessä hankesuunnitelmassa kaavailtua pidemmälle aikavälille (Liite 4). MTT:n tutkimusrekisterissä hanke jatkuu vuoden 2006 loppuun.

Toteutusvaiheessa havaittiin, että nestetyypikäsittelystä toipumisen havainnointi vaati etenkin kasvurytmiltään hitaasti kehittyvillä lajeilla, kuten useimmat puuvartiset kasvit, etukäteen suunniteltua pidemmän havainnointijakson. Tällöin myös tulosten saaminen seuraavien kokeiden perustaksi sekä mahdollisuus koetulosten julkaisemiseen viivästyivät. Tätä ongelmaa lisäsi hankkeen typistäminen kaksivuotiseksi, eikä tätä häitää pystytty korjaamaan hankkeen kuluessa.

Hankkeen alkuvaiheessa kirjallisuustietojen perusteella kapselointimenetelmiä pidettiin parhaina vaihtoehtoina solukkolisätylle vadelma-aineistolle, joka toimi mallina eri lajien kryosäilytysmenetelmiä kehitettäessä. Siksi juuri näitä menetelmiä ryhdyttiin optimoimaan. Tohtori Wang kehitti kaksi hyvin toimivaa kapselointimenetelmää vadelmalle, kapselointi-dehydraation ja kapselointi-vitrifikaation. Periaatteeltaan kapselointi-vitrifikaatiota muistuttava, mutta kapselointivaiheen väliin jättävä pisara-vitrifikaatiomenetelmä havaittiin kuitenkin Laukaan tarkoituksiin näppärämmäksi suurien aineistojen käsittelyyn. Tässä menetelmässä yksi työvaihe eli kapselointi voidaan jättää tekemättä ja siten menetelmä on yksinkertaisempi. Menetelmää käyttäen vadelman versojen elpyminen onnistui hyvin. Menetelmän omaksuminen ja soveltaminen on helppoa, mikäli käytettävissä on hyvin toimiva mikrolisäyslaboratorio.

### **3.3.3 Tutkimuksen kannalta merkittävimmät muuttajat**

Tutkimuksen edetessä ilmeni, että mahdollisia kryosäilytysmenestykseen vaikuttavia muuttujia on hyvin monia. Jotta kullekin kasvilajille ja lajikkeelle voitaisiin luoda täysin optimaalinen menetelmä, tarvittaisiin laajoja faktorikokeita kullakin kasvilajilla kymmenien eri muuttujien osalta. Menetelmän saaminen rutiininomaiseen käyttöön, helppo sovellettavuus eri lajeille ja lajikkeille mahdollisimman pienellä optimointitarpeella ja nopeasti sekä menetelmän helppous ja kustannustehokkuus puoltavat kaikkien tarpeettomien työvaiheiden karsimista sekä optimointiprosessista että varsinaisista lajikohtaisista kryosäilytysohjeista. Kun tavoitteena oli perustutkimuksen lisäksi saada menetelmä sovellettavaksi käytäntöön laajasti eri kasvilajeilla, päädyttiin kokeilemaan vadelmalla yksityiskohtaisesti optimoitua perusmenetelmää pienin variaatioin eri kasvilajeille.

Vuoden 2004 ajan hankkeessa keskityttiin kehittämään kapselointi-dehydraatiomenetelmää, jonka etuna on, että siinä ei tarvita kapselointiin käytettävien liuosten ja sokerin lisäksi muita vitrifikaatiota edistäviä kemikaaleja, vaan menetelmä perustuu kuivatukseen. Tällöin vitrifikaatioliuosten mahdollinen toksisuus ei aiheuta riskiä kasvupisteiden säilymiselle eikä kylmäsäilytystyössä altistuta näille liuoksille. Menetelmän eri tekijöiden optimoiminen osoittautui työlääksi, joten Laukaassa muutettiin tutkimuksen linjaa vuoden 2005 alussa ja keskityttiin pisara-vitrifikaatiomenetelmän testaamiseen vadelmalla sekä sen soveltamiseen muille lajeille. Tämä ratkaisu osoittautui koko hankkeen kannalta onnistuneeksi.

Pisara-vitrifikaatio-menetelmällä päästiin vähintään tyydyttäviin tuloksiin pitämällä suurin osa muuttujista vakioina ja etsimällä ensiksi kyseessä olevalle kasvilajille tai lajikkeelle suhteessa silmun tai versonkärjen kokoon sopivan pituinen PVS2-käsittelyn kesto.

Toinen selkeä linjaus tehtiin lepotilaisten silmujen menetelmätutkimuksessa. Ensimmäisten kokeilujen jälkeen Laukaassa ei lähdetty kehittämään vaiheittaiseen jäädytykseen perustuvia menetelmiä. Vertailtaessa lepotilaisille silmuille soveltuvia menetelmiä päädyttiin suosittelemaan menetelmäksi sulatusta vesihautessa ja solukkoaloitusten tekoa lepotilaisista silmuista.

### **3.4 Julkaisut**

Hankkeessa valmistui yksi tieteellinen HY:n ja MTT:n yhteisjulkaisu vadelman kapselointi-kryosäilytysmenetelmistä, kaksi abstraktijulkaisua ja yksi ammattilehtijulkaisu. Lisäksi valmisteilla ovat käsikirjoitukset tieteellisiin julkaisuihin aiheina ”Humalan (*Humulus lupulus*) geenivarojen kryosäilytys” ja toinen aiheesta ”Vadelmien kryosäilytys pisara-vitrifikaatiomenetelmän avulla”. Käsikirjoitusten arvioidut valmistumisajankohdat ovat 30.6. ja 30.8.2006.

### **3.4.1 Tieteellisen julkaisun kirjoittaminen vadelman kylmäsäilytyksestä ja viruspuhdistuksesta**

Tutkimuksen tehtävä 7 oli yhteisjulkaisu vadelman kapselointi-dehydraatio- ja kapselointi-vitrifikaatio-kylmäsäilytys-menetelmistä ilmestyi ensin sähköisesti (15.4.2004) Plant Cell Reports- julkaisun sivuilla. Painettu versio ilmestyi kesäkuussa 2005.

### **3.4.2 Hankkeesta kirjoittaminen puutarha-alan ammattilehtiin: esittely ja tulokset sekä käyttökelpoisuus**

Tehtävänä 9 toteutettiin ammattilehtiartikkeli hankkeesta Puutarha&Kauppa-lehteen. Artikkelin ilmestyi maaliskuussa 2006 hankkeen loppuraportoinnin yhteydessä. Ammattilehtiartikkelin lisäksi hanketta on esitelty posteriesittelyinä kolmesti tieteellisissä kokouksissa (Liite 1): Vuonna 2004 COST 843-kokouksessa Saanen, Sveitsi, vuonna 2005 COST 843-kokous Stara Lesna, Slovakia ja NGB:n 25-vuotisjuhlaseminaari, Hanasaari, Suomi.

### **3.4.3 Tieteellisen julkaisun kirjoittaminen *Prunus*-lajien kylmäsäilytyksestä (Acta Agriculturae Scandinavica)**

Tutkimushankkeen viimeinen tehtävä 10 oli tieteellinen julkaisu pisara-vitrifikaatio-menetelmän käytöstä ja *Prunus*-lajien kylmäsäilytyksestä. Julkaisussa tarvittavat viimeiset toipumishavainnot ovat vasta valmistuneet. Käsikirjoitus valmistuu kesällä 2006.

### **3.4.4 Valmistuneet julkaisut**

NUKARI, A., UOSUKAINEN, M. 2004. Competence of *Prunus* shoot tip meristems for regeneration after cryopreservation. In: Cost 843, Quality enhancement of plant production through tissue culture : MC meeting and workshop on assessment of performance : physiological health and (epi-) genetic stability (WG 3) : Sept 30 - Oct 2, 2004, Saanen, Switzerland. p. 63-64.

WANG, Q., LAAMANEN, J., UOSUKAINEN, M., VALKONEN, J. P. T. 2005. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant cell reports 24: 280-288.

NUKARI, A., UOSUKAINEN, M., WANG, Q. 2005. Cryopreservation in quality plant production. In: Gabriela Libiaková & Alena Gajdosová (eds.). Book of abstracts: Cost 843 Final Conference, Cost 843 and Cost 851 Joint Meeting: June 28- July 3, 2005, Stará Lesná, Slovakia. p. 171-172.

NUKARI, A. 2006. Puutarha & Kauppa (2006):13, 8.

Lisäksi hanketta ja sen tuloksia on esitelty kahden posterin avulla:

- Posteriesittely COST 843 -kokouksessa Stará Lesnássa Slovakiassa 29.6.-1.7. 2005.
- Posteriesittely Pohjoismaisen geenipankin 25-vuotisjuhlaseminaarissa Hanasaaressa 13.10.2004
- Posteriesittely COST 843-kokouksessa Saanenissa Sveitsissä 30.9.-2.10.2004.

## **4 Tulosten arviointi**

Hankesuunnitelmassa esitettiin kysymys, kuinka pitkäaikaissäilytys vaikuttaa kasviin. Tämä kysymys luo tarpeen pitkäaikaisen säilytyskokeen järjestämiselle. Tähän kysymykseen ei ollut mahdollista hakea vastausta näin lyhytaikaisessa hankkeessa. Tämän hankkeen puitteissa useimmat sulatukset tehtiin tunnin kuluttua aineiston pakastamisesta. Mitään epänormaaleja poikkeavuuksia elvytettyjen versojen fenotyypeissä ei havaittu. Sen sijaan mielenkiintoisena ilmiönä todettiin solukoiden parantunut regeneraatiokyky. Tätä ominaisuutta voidaan jatkossa hyödyntää solukkoviljelytekniikkaa kehitettäessä. Säilytettyjen kasviaineistojen ominaisuuksia on testattava hankkeen päätyttyäkin. Vuonna 2004 tehdyistä kryokäsittelyistä elvytettyjä 'Sinikka'-luumuja ja 'Jatsi'- ja 'Jenkka'-vadelmia istutettiin aitouksokeisiin vuonna 2005. Kesällä 2006 selvinnee vadelmien marjonnan onnistuminen. Aineistoa jätettiin pitkäaikaissäilytykseen, josta sitä on tulevaisuudessa mahdollista sulattaa ja havainnoida.

### **4.1 Tulosten käytännön sovellutuskelpoisuus**

Hankkeen tulokset ovat suoraan hyödynnettävissä puutarha-alalla. Kylmäsäilytyksen laajamittainen käyttöönotto mahdollistaa kasvigeenivaraohjelman puutarhakasvien säilyttämiseksi asetettujen tavoitteiden toteutumista. Konkreettisia hyödynsajia menetelmän käyttämisestä ovat myös Huoltovarmuuskeskus ja kasvinjalostajat sekä suomalainen varmennettu taimituotanto. Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema on tällä hetkellä Pohjoismaiden ainoa kryosäilytystä kasvullisesti lisättävien puutarhakasvien pitkäaikaissäilytyksessä hyödyntävä yksikkö.

Hankkeen tulokset tuovat Pohjoismaiselle geenipankille tietoa uudesta säilytysmenetelmästä ja sen soveltamisesta pohjoismaisille puutarhakasveille. Tutkimuksen tulokset ovat päätöksenteon apuna kehitettäessä Pohjoismaiden geenivarojen säilytysmenetelmiä. Pisara-vitrifikaatio -menetelmäsovellus on jo käytössä kasvigeenivaraohjelmaan kuuluvan humalakokoelman ja tärkeimpien Suomessa viljeltyjen vadelmalajikkeiden varmennetun ydinkasviaineiston säilytyksessä.

Suomessa kylmäsäilytyksen merkittävä sovellutus on varmennetussa taimituotannossa. Kylmäsäilytyksen avulla varmennetun taimituotannon kasvintuhoojatestatattujen ja puhdistettujen ydinkasviaineistojen säilyttäminen muuttumattomissa, puhtaissa oloissa on mahdollista. Tällöin ydinkasveja uusittaessa tai uudelleen tuotantoon otettaessa säästytään kalliilta ja jopa 1,5 vuotta kestävilta uusintatatus- ja puhdistustoimenpiteiltä. Lainsäädännössä tutkimuksen tulokset on jo hyödynnetty

sisällyttämällä menetelmä uuteen varmennettua lisäysaineistoa ja taimituotantoa koskevaan asetukseen MMM9/2006.

Kylmäsäilytystekniikan soveltamisesta hyötyy laajemmin koko puutarhaelinkeino. Menetelmän avulla voidaan säilyttää helposti hyödynnettävässä muodossa myös sellaisten viljelykasvien ja lajikkeiden lisäysaineistoja, joiden vähäinen kysyntä kaupallisessa tuotannossa on aiheuttanut lajikkeiden poistumisen lisäystuotannosta.

Tulokset ovat heti MTT:n, Pohjoismaisen geenipankin ja muiden kylmäsäilytystä harjoittavien ja tarvitsevien käytettävissä. Kylmäsäilytyksen tarjoaminen MTT:n ulkopuolisille tahoille voisi olla osa maksullista palvelutoimintaa.

Tuloksia hyödynnetään jatkossa kehitettäessä Laukaan kryosäilytysohjeistuksia ja menetelmäohjetta kryosäilytystoimintaan Laukaassa. Tulokset ja hankkeen aikana kerätty käytännön kokemus kryosäilytystyöstä luovat pohjan Laukaassa vuoden 2006 alusta alkaneelle uudelle kryosäilytyshankkeelle ”Kylmäsäilytystekniikan soveltaminen kasvullisesti lisättävien kasvien geenivarojen pitkäaikaissäilytyksessä”.

#### **4.2 Tulosten tieteellinen merkitys**

Kryosäilytys on tällä hetkellä kansainvälisesti kiinnostusta herättävä aihe, jonka toteutuksessa on viime vuosina saavutettu merkittävää edistystä. Eri maissa ja myös kansainvälisessä yhteistyössä kehitetään menetelmiä erityyppisille solukoille ja eri kasvilajeille. Vadelman kryosäilytystä ja viruspuhdistusta tässä hankkeessa käytetyin menetelmin ei ollut aiemmin tutkittu. Hankkeessa saatujen tulosten perusteella pisara-vitrifikaatio-menetelmää voidaan soveltaa suhteellisen laajasti kasvullisesti lisättävillä, solukkoviljelyillä puutarhakasveilla. Hankkeen puitteissa sen osoitettiin toimivan kuuden eri vadelmalajikkeen lisäksi humalalla ja myös puuvartisilla kasveilla, kuten viherherukalla, hapankirsikoilla ja luumuilla.

Jatkotutkimuksissa tulee kiinnittää huomiota elpymisalustan hormonipitoisuuksien ja sokerin laadun sekä määrän optimointiin, joiden osalta tarpeet vaihtelevat merkittävästi eri kasvilajien ja lajikkeidenkin välillä. Jatkossa pisara-vitrifikaatiomenetelmä voidaan pyrkiä optimoimaan mahdollisimman laajasti eri kasvullisesti lisättäville puutarhakasveille. MTT:n kasvigeenivararyhmät ovat laatineet kasvigeenivarojen säilytysohjeistukset, joiden perusteella voidaan harkita eri kasvilajien, lajikkeiden, kantojen ja kloonien ottamista kryosäilytykseen ja arvioida sen kiireellisyyttä kunkin lajin kohdalla.



## 5 Kirjallisuus

- Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. Teoksessa: Bajaj, Y. P. S. (toim.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 32. Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. S. 3-28.
- Bremer K (1980) Hyviä satoja vadelman terveillä taimilla. *Puutarha* 83:526-527, 578.
- Brison M, De Boucaud MT, Pierronnet A, Dosba (1997) Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum pox potyvirus. *Plant Science* 123:189-196
- Ellis MA, Converse RH, Williams RN, Williamson B (eds). 1991. *Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects*. APS Press, St Paul, MN, USA
- Fabre, J. ja Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips. *Cryo-letters* 11: 413-426.
- Helliot B, Panis B, Poumay Y, Swennen R, Lepoivre P, Frison E (2002) Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic virus and banana streak virus from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports* 20:1117-1122
- Matsumoto, T., Sakai, A., Takahashi, C. ja Yamada, K. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryo-letters* 16: 189-196.
- Reed, B. M. 1998. Genotype considerations in temperate fruit crop cryopreservation. Teoksessa: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop. Tsukuba, Japan, 20.-23.10.1998. Keynote presentations. S. 200-204. Saatavissa internetistä: [www.ipgri.cgiar.org/publications/jircas/jircas3.htm](http://www.ipgri.cgiar.org/publications/jircas/jircas3.htm).
- Sakai, A. 1998. Development of cryopreservation techniques. Teoksessa: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop. Tsukuba, Japan, 20.-23.10.1998. Keynote presentations. S. 1-7. Saatavissa internetistä: [www.ipgri.cgiar.org/publications/jircas/jircas3.htm](http://www.ipgri.cgiar.org/publications/jircas/jircas3.htm).
- Sakai, A. ja Kobayashi, S. 1990. A simple and efficient procedure for cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. *Cryobiology* 27: 657.
- USDA-ARS. 2002. Germplasm Preservation Efforts at the PGRU. Saatavissa internetistä: [http://www.ars-grin.gov/gen/cryo\\_pres.html](http://www.ars-grin.gov/gen/cryo_pres.html)
- Tapio E, Bremer K, Valkonen JPT (1997) Viruses and their significance in agricultural and horticultural crops in Finland. *Agricultural and Food Science in Finland* 6:323-336
- Towill, L. E. 2002. Cryopreservation of plant germplasm. introduction and some observations. Teoksessa: Towill, L. E. ja Bajaj, Y. P. S. (toim.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 50. Cryopreservation of Plant Germplasm II. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. S. 3-21.
- Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I. ja Tanne, E. (2003). Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science* 165:321-327.

**TESTATTUJEN PUUTARHAKASVIEN PITKÄAIKAISVARASTOINTI  
KYLMSÄILYTYKSEN AVULLA****LONG-TERM STORAGE OF TESTED HORTICULTURAL PLANTS  
BY CRYOPRESERVATION**

---

<b>Vastuuorganisaatio</b>	MTT, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema Antinniementie1 41330 VIHTAVUORI puh. 014-339 6821                      fax 014- 633 835	Marjatta Uosukainen
<b>Muut osapuolet</b>	Helsingin yliopisto, soveltavan biologian laitos	Jari Valkonen
<b>Kesto</b>	2004 – 2006 (Loppuraportti 29.3.2006)	
<b>Rahoitus</b>	Kokonaiskustannukset                      251 147 euroa MMM:ltä saatu kokonaisrahoitus                      30 000 euroa Tutkimuslaitoksen oma rahoitus                      183 989 euroa Muista julkisista lähteistä saatu rahoitus                      33 092 euroa Muu rahoitus                      4 066 euroa	
<b>Avainsanat</b>	geenivarat, kylmäsäilytys, pitkäaikaisvarastointi, puutarhakasvit	

---

**Tiivistelmä****TAVOITTEET**

Hankkeen päätavoitteena oli vadelma mallikasvina ottaa käyttöön kylmäsäilytystekniikka tautivapaiden ja ilmastolliselta kestävyydeltään testattujen puutarhakasvien pitkäaikaisvarastoinnissa MTT:ssä. Tämä palvelee sekä varmennetun että tavanomaisen taimituotannon, Pohjoismaisen geenipankin, kansallisen kasvigeenivaraohjelman ja puutarhakasvinjalostuksen tarpeita.

**TULOKSET**

- Optimoitu menetelmä vadelman kylmäsäilytykselle ja pitkäaikaisvarastoinnille on kehitetty ja saatu toimimaan.
- Menetelmät luumun, kirsikan ja kriikunan sekä humalan kylmäsäilytykselle ja pitkäaikaisvarastoinnille on kehitetty, mutta

vaativat vielä tarkennuksia.

- Menetelmä herukan kylmäsäilytykselle on kehitetty, mutta vaatii vielä tarkennuksia.
- Hankkeen avulla on MTT:hen luotu kasvien kryosäilytystekniikkaan perehtynyt, eurooppalaisten ja kiinalaisten tutkijoiden kanssa verkottunut tutkimusryhmä, joka toimii aktiivisesti osana Suomen kansallisen kasvigeenivaraohjelman toimeenpanon toteuttamista.

## TULOSTEN ARVIOINTI

Kryosäilytys soveltuu testattujen kasvullisesti lisättävien puutarhakasvien pitkäaikaissäilytykseen, kunhan kryosäilytysmenetelmä tarkennetaan kullekin kasvilajille toimivaksi. Hankkeessa saatujen tulosten perusteella pisara-vitrifikaatiomenetelmää voidaan soveltaa suhteellisen laajasti kasvullisesti lisättävillä, solukkoviljelyillä puutarhakasveilla. Menetelmää voidaan soveltaa eri kasvilajeille optimoimalla esimerkiksi käsittelyaikaa kylmänkestävyyden parantamiseksi ennen pakastamista käytettävässä vitrifikaatioliuoksessa. Jatkossa soveltuvinta kryosäilytyksestä elvytettävien kasvupisteiden ravinnealustan koostumusta tulisi selvittää kasvilajikohtaisesti.

## Julkaisut

NUKARI, A. 2006. Kasvit vaipuvat ruususenuneen. Puutarha & Kauppa (2006):13, 8.

NUKARI, A., UOSUKAINEN, M., WANG, Q. 2005. Cryopreservation in quality plant production. In: Gabriela Libiaková & Alena Gajdosová (eds.). Book of abstracts: Cost 843 Final Conference, Cost 843 and Cost 851 Joint Meeting: June 28- July 3, 2005, Stará Lesná, Slovakia. p. 171-172.

WANG, Q., LAAMANEN, J., UOSUKAINEN, M., VALKONEN, J. P. T. 2005. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant cell reports (2005):24, 280-288.

NUKARI, A., UOSUKAINEN, M. 2004. Competence of *Prunus* shoot tip meristems for regeneration after cryopreservation. In: Cost 843, Quality enhancement of plant production through tissue culture : MC meeting and workshop on assessment of performance : physiological health and (epi-) genetic stability (WG 3) : Sept 30 - Oct 2, 2004, Saanen, Switzerland. p. 63-64.

- Posterisittely COST 843 -kokouksessa Stará Lesnássa Slovakiassa 29.6.-1.7. 2005.
- Posterisittely Pohjoismaisen geenipankin 25-vuotisjuhla-seminaarissa Hanasaaressa 13.10.2004
- Posterisittely COST 843-kokouksessa Saanenissa Sveitsissä 30.9.-2.10.2004.

Julkaisun päivämäärä  
28.3.2006

Tekijät (toimielimistä; toimielimen nimi, puheenjohtaja, sihteeri) Anna Nukari Marjatta Uosukainen		Julkaisun nimi <b>Loppuraportti</b>	
		Toimeksiantaja	
		Toimielimen asettamispäivämäärä	
Julkaisun nimi Loppuraportti, Testattujen puutarhakasvien pitkäaikaisvarastointi kylmäsäilytyksen avulla, Long-term storage of tested horticultural plants by cryopreservation			
Julkaisun osat			
Tiivistelmä <b>TAVOITTEET</b> Hankkeen päätavoitteena oli vadelma mallikasvina ottaa käyttöön kylmäsäilytystekniikka tautivapaiden ja ilmastolliselta kestävyydeltään testattujen puutarhakasvien pitkäaikaisvarastoinnissa MTT:ssä. Tämä palvelee sekä varmennetun että tavanomaisen taimituotannon, Pohjoismaisen geenipankin, kansallisen kasvigeenivaraohjelman ja puutarhakasvinjalostuksen tarpeita.  <b>TULOKSET</b> - Kehitettiin optimoitu menetelmä vadelman kylmäsäilytykselle ja pitkäaikaisvarastoinnille. Menetelmän toimivuus testattiin ja otettiin käyttöön suomalaisten vadelmalajikkeiden varastoinnissa. - Kehitettiin menetelmät luumun, kirsikan ja kriikunan sekä humalan kylmäsäilytykselle ja pitkäaikaisvarastoinnille. Menetelmien lajikekohtainen optimointi vaatii vielä tarkentamista. - Menetelmä herukan kylmäsäilytykselle on kehitetty, mutta vaatii vielä lajikekohtaisia tarkennuksia. - Hankkeen avulla MTT:hen muodostettiin kasvien kryosäilytystekniikkaan perehtynyt, eurooppalaisten ja kiinalaisten tutkijoiden kanssa verkottunut tutkimusryhmä, joka toimii aktiivisesti osana Suomen kansallisen kasvigeenivaraohjelman toimeenpanon toteuttamista.  <b>TULOSTEN ARVIOINTI</b> Kryosäilytys soveltuu kasvullisesti lisättävien puutarhakasvien pitkäaikaissäilytykseen. Menetelmän käyttöönotto eri kasvilajeilla edellyttää kuitenkin tapauskohtaista menetelmän tarkistamista. Hankkeessa saatujen tulosten perusteella pisara-vitrifikaatio-menetelmää voidaan soveltaa suhteellisen laajasti kasvullisesti lisättävillä, solukkoviljelyillä puutarhakasveilla. Menetelmää voidaan soveltaa eri kasvilajeille optimoimalla esimerkiksi käsittelyaikaa kylmänkestävyyden parantamiseksi ennen pakastamista käytettävässä vitrifikaatioliuoksessa. Jatkossa soveltuvinta kryosäilytyksestä elvytettävien kasvupisteiden ravinnealustan koostumusta tulisi selvittää kasvilajikohtaisesti.			
Avainsanat (asiasanat) geenivarat, kylmäsäilytys, pitkäaikaisvarastointi, puutarhakasvit			
Muut tiedot			
Sarjan nimi ja numero -		ISSN-numero -	ISBN-numero -
Kokonaismäärä	Kieli suomi	Hinta -	Luottamuksellisuus julkinen
Jakaja MTT, Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasema		Kustantaja -	

**Pitkäaikaissäilytykseen pisara-vitrifikaatio-menetelmällä otetut kasvupisteet**

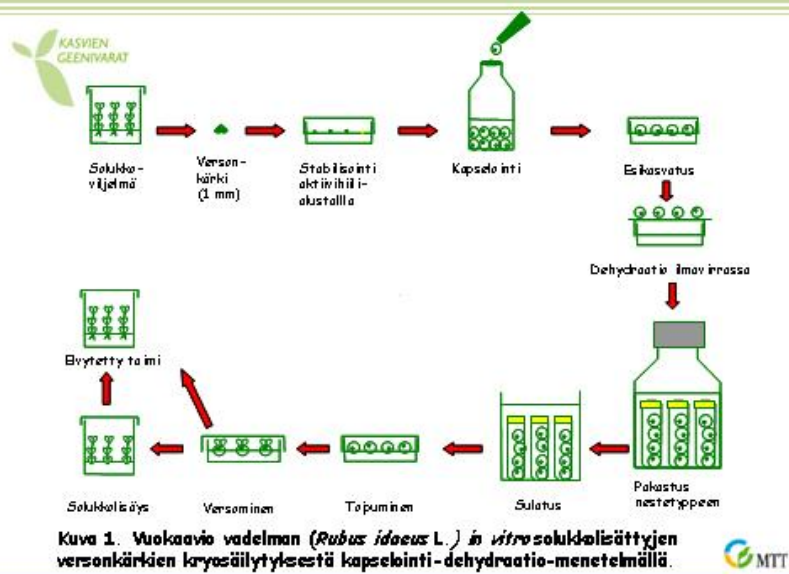
<b>Kasvilaji /Lajikkeen nimi</b>	<b>Putkia (kpl)</b>	<b>Kasvupisteitä säilötty yhteensä</b>	<b>Elävät kasvupisteet (%)</b>	<b>Versovat kasvupisteet (%)</b>	<b>Hyvin lisääntyvät viljelmät (%)</b>
<b>Hapankirsikat</b>					
Inkeröisten Kuulasmaarja	3	53	90-100	40-82	5-9
Yltöisten Kuulasmaarja	4	81	65-100	0-82	0-9
<b>Kriikunat</b>					
Yleinen Sinikriikuna	10	192	15-100	0	0
<b>Luumut</b>					
Kuntalan Punaluumu	3	37	40-75	0-20	0-20
Kuokkala	2	40	30-42	0	0
Savion Keltaluumu	2	41	45-72	5-11	0-5
Sinikka	4	80	40-89	0-67	0-67
<b>Vadelmat</b>					
Jatsi	5	103	43-80	37-75	10-75
Jenkka	8	164	25-76	25-71	25-71
Maurin Makea	2	39	80-84	47-53	47-53
Muskoka	2	30	80	47	47
Ottawa	6	89	30-100	15-100	15-86
Takalan Herkku	4	80	60	60	60
<b>Herukat</b>					
Viherherukkajaloste	4	82	53-62	21-46	0-45
<b>Yhteensä lajikkeita</b>	<b>putkia</b>	<b>kasvupisteitä</b>			
<b>14</b>	<b>59</b>	<b>1111</b>			

## Hankkeen suunniteltu ja toteutunut aikataulu

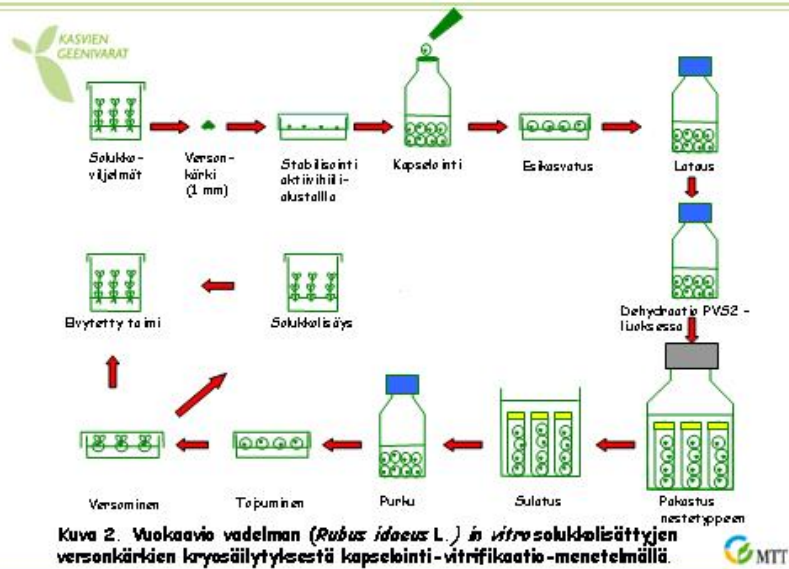
AIKATAULU		2004												2005												2006		
		kuukaudet																										
Teht. No	Tehtävän nimi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
1	Vadelman kylmäsäilytysmenetelmän sekä viruspuhdistuksen kehittäminen ja virustestaukset																											
2	Suomalaisten vadelmalajikkeiden varastointikokeilu																											
3	In vitro -kylmäsäilytysmenetelmien testaus ja kehittäminen Prunus -lajeilla																											
4	Varastointikokeilu Prunuksilla in vitro -kylmäsäilytysmenetelmien avulla																											
5	Menetelmäkoulutus ja uuden tutkijan perehdyttäminen projektiin																											
6	Kaksivaihejäädtyksen testaus ja menetelmien kehittäminen Prunuksen ja omenan lepotilaisille silmuille																											
7	Tieteellisen julkaisun kirjoittaminen vadelman kylmäsäilytyksestä ja viruspuhdistuksesta																											
8	Herukan kylmäsäilytyksen ja sen avulla tapahtuvan viruspuhdistuksen testaus																											
9	Hankkeesta kirjoittaminen puutarha-alan ammattilehtiin: esittely ja tulokset sekä käyttökelpoisuus																											
10	Tieteellisen julkaisun kirjoittaminen Prunus -lajien kylmäsäilytyksestä (Acta Agriculturae Scandinavica)																											

alkuperäinen tutkimussuunnitelma  
toteutunut tutkimustoiminta

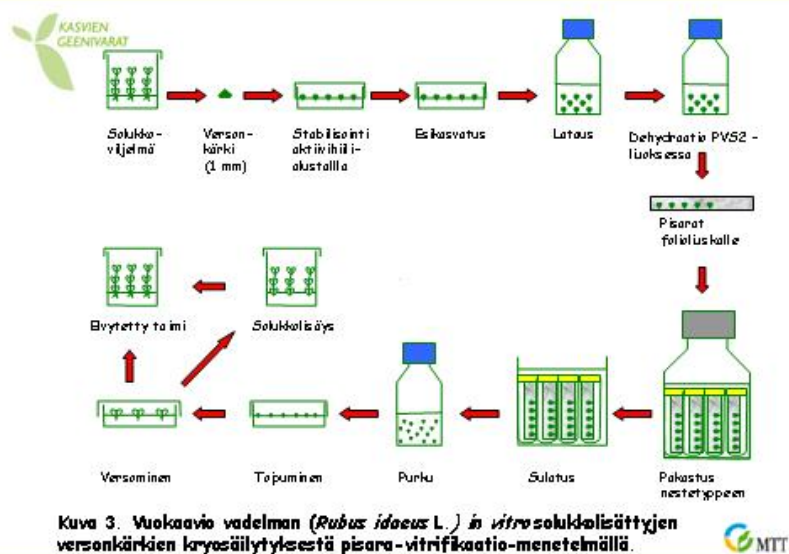
## Kryosäilytysmenetelmät



Kuva 1. Vuokaavio vadelman (*Rubus idaeus* L.) *in vitro*sokkoviijelmien versonkärkien kryosäilytyksestä kapselointi-dehydraatio-menetelmällä.



Kuva 2. Vuokaavio vadelman (*Rubus idaeus* L.) *in vitro*sokkoviijelmien versonkärkien kryosäilytyksestä kapselointi-vitrifikaatio-menetelmällä.



Kuva 3. Vuokaavio vadelman (*Rubus idaeus* L.) *in vitro*sokkoviijelmien versonkärkien kryosäilytyksestä pisara-vitrifikaatio-menetelmällä.