

# Kuusen solukkolisäys

Saila Varis, Susanne Heiska ja Tuija Aronen



Euroopan unioni  
Euroopan aluekehitysrahasto

Vipuvoimaa  
EU:lta  
2007–2013

Metlan työraportteja / Working Papers of the Finnish Forest Research Institute -sarjassa julkaistaan tutkimusten ennakkotuloksia ja ennakkotulosten luonteisia selvityksiä. Sarjassa voidaan julkaista myös esitelmiä ja kokouskoosteita yms.

Sarjassa ei käytetä tieteellistä tarkastusmenettelyä.

Sarjan julkaisut ovat saatavissa pdf-muodossa sarjan Internet-sivuilta.

<http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/>  
ISSN 1795-150X

**Toimitus**

PL 18  
01301 Vantaa  
puh. 029 532 2111  
sähköposti [julkaisutoimitus@metla.fi](mailto:julkaisutoimitus@metla.fi)

**Julkaisija**

Metsäntutkimuslaitos  
PL 18  
01301 Vantaa  
puh. 029 532 2111  
sähköposti [info@metla.fi](mailto:info@metla.fi)  
<http://www.metla.fi/>

<b>Tekijät</b> Varis, Saira, Heiska, Susanne & Aronen, Tuija			
<b>Nimeke</b> Kuusen solukkolisäys			
<b>Vuosi</b> 2014	<b>Sivumäärä</b> 50	<b>ISBN</b> 978-951-40-2500-6 (PDF) 978-951-40-2501-3 (paperback)	<b>ISSN</b> 1795-150X
<b>Alueyksikkö / Tutkimusohjelma / Hankkeet</b> Itä-Suomen alueyksikkö / Tulevaisuuden metsät ja metsänhoito / Kasvullinen lisäys – osaamista ja teknologiaa biotalouden tueksi			
<b>Hyväksynyt</b> Katri Kärkkäinen, professori, 24.10.2014			
<b>Tiivistelmä</b> Solukkoviljelymenetelmillä voidaan tuottaa halutunlaista ja tasalaatuista viljelyaineistoa erilaisiin käytötarkoituksiin. Hyvälaatuisia havupuiden taimia tarvitaan metsänviljelyyn, erikoistaimia koristepuiksi ja viherrakentajille tai lahon- ja taudinkestävää ”luomukestopuuta” esimerkiksi piharakenteisiin. Menetelmässä on kyse siemenalkiosta saadun solukon monistamisesta keinotekoisella kasvualustalla laboratoriossa. Alustan koostumusta muuttamalla solukosta saadaan kasvamaan taimia, jotka voidaan siirtää laboratoriokasvatusvaiheiden jälkeen kasvihuone turpeeseen.  Solukkoviljely on monistusteholtaan ylivoimainen menetelmä verrattuna muihin kasvullisen lisäyksen menetelmiin. Havupuiden kaupallisesta solukkolisäyksestä on joitakin esimerkkejä Kanadasta ja Keski-Euroopasta. Suomessa kiinnostus uusien menetelmien kehittämiseen ja käyttöönottoon on kasvussa. Tämän vuoksi kaupalliseen tuotantoon sopivien menetelmien kehitys kotimaisille havupuulajeille aloitettiin vuonna 2011. Erityisenä kiinnostuksen kohteena on ollut kehittää kuuselle massamonistukseen sopivat menetelmät, joilla voidaan tuottaa hyvälaatuisia taimia metsänviljelyyn. Samoja menetelmiä voidaan käyttää myös viherrakentamiseen soveltuvien kuusen erikoismuotojen lisäämiseen.  Menetelmäkehitystä ja lisäysaineiston tuotantoa on tehty Metsäntutkimuslaitoksen Punkaharjun toimipaikassa hieman yli kolmen vuoden mittaisessa ”Kasvullinen lisäys – osaamista ja teknologiaa biotalouden tueksi” –hankeessa. Hankkeen tuloksena on kehitetty laboratoriomittakaavaan soveltuva solukkoviljelymenetelmä kuuselle. Tässä oppaassa esitellään yksityiskohtaisesti sekä kehitetty menetelmä, että solukkolisäystyöhön tarvittavat tilat ja työvälineet. Menetelmäkehityksen ohessa Metlassa on myös tuotettu laboratoriokasvatukseen soveltuvaa lisäysmateriaalia. Lisäysmateriaalin tuotanto- ja testausmenetelmät on myös esitelty oppaassa.  Opas on tarkoitettu käsikirjaksi uusista tuotantomahdollisuuksista kiinnostuneille taimituottajille, mutta myös oppimateriaaliksi ammatilliseen täydennys- ja muuntokoulutukseen.			
<b>Asiasanat</b> solukkoviljely, kasvullinen lisäys, kuusi			
<b>Julkaisun verkko-osoite</b> <a href="http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/2014/mwp310.htm">http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/2014/mwp310.htm</a>			
<b>Tämä julkaisu korvaa julkaisun</b>			
<b>Tämä julkaisu on korvattu julkaisulla</b>			
<b>Yhteydenotot</b> Tuija Aronen. Osoite Metsäntutkimuslaitos, Punkaharjun toimipaikka, Finlandiantie 18, 58450 Punkaharju. Sähköposti <a href="mailto:tuija.aronen@metla.fi">tuija.aronen@metla.fi</a>			
<b>Muita tietoja</b> Metla yhdistyy Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus MTT:n ja Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos RKTL:n sekä Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskuksen TIKE kanssa Luonnonvarakeskukseksi 1.1.2015. <a href="http://www.luonnonvarakeskus.fi">www.luonnonvarakeskus.fi</a>  Taitto Anne Siika/Metla			

## Alkusanat

Tämä solukkoviljelyopas kokoaa yksiin kansiin Metsäntutkimuslaitoksen (Metla) Punkaharjun toimipaikassa tutkimus- ja kehittämistyössä saadut kokemukset kuusen solukkoviljelystä. Kuusen solukkoviljelyyn on kehitetty Suomen olosuhteisiin sopivat menetelmät vuosina 2011-2014 toteutetussa Kasvullinen lisäys –osaamista ja teknologiaa biotalouden tueksi –hankkeessa. Menetelmät on kehitetty tutkimuslaboratorion tarpeisiin ja tuotantomittakaavaan, mutta kehitystyössä on huomioitu menetelmien sovellettavuus käytäntöön.

Punkaharjun solukkoviljelylaboratoriossa on kymmenien vuosien kokemus useiden lehtipuulajien ja männyn kasvullisesta lisäyksestä sekä kryopreservoinnista. Kuusen solukkolisäystä ei kuitenkaan ollut ennen vuotta 2011 tehty menetelmien puuttuessa. Menetelmäkehitys kuuselle aloitettiin hyödyntämällä kansainvälisiä tiedonvaihtoverkostoja ja keräämällä muualla maailmassa kehitettyä osaamista havupuiden solukkoviljelystä. Seuraavassa vaiheessa muualla kehitettyä osaamista sovellettiin Punkaharjulla olevaan tutkimusympäristöön sekä Suomen olosuhteisiin testaamalla ja vertailemalla muualla toimivia menetelmiä sekä kokeilemalla uutta.

Kolmivuotisen menetelmäkehityksen tuloksena on saatu rakennettua työketju, jolla voidaan tuottaa kuusen solukkotaimia vaikka ympäri vuoden. Työketjuun sisältyy vielä lukuisia työvoimavaltaisia vaiheita, joiden tehostaminen tai automatisointi on välttämätöntä, jotta solukkotaimen tuotanto voi kilpailla kustannuksiltaan siementaimen tuotannon kanssa. Käytännön massamittakaavaan sopivat menetelmät eivät löydy tutkimuslaboratoriossa, vaan kehitystyöhön tarvitaan mukaan muita toimijoita. Tämän opaskirjan tarkoituksena on tarjota menetelmällinen perustieto, joka tarvitaan kuusen solukkoviljelyn käytäntöihin.

Opaskirja on tarkoitettu taimituotannon ammattilaisille, jotka etsivät uusia tuotantovaihtoehtoja tai mahdollisuuksia erikoistua. Se sopii myös materiaaliksi puutarha- ja metsäalan opintoihin tai ammatilliseen erikois-, muunto- ja täydennyskoulutukseen. Lukijan oletetaan ymmärtävän perusasiat aseptisestä työskentelystä ja hallitsevan steriililaboratorion perustyövälineiden käytön. Näihin asioihin voi motivoitunut lukija perehtyä omatoimisestikin. Suositus oheislukemistosta on oppaan lopussa.

Etelä-Savon maakuntaliitto tuki Kasvullinen lisäys – osaamista ja teknologiaa biotalouden tueksi – hanketta Euroopan aluekehitysrahastosta vuosina 2011-2014. Hankkeen kokonaisbudjetti oli noin 800 000 € ja se toteutettiin yhteistyössä Itä-Suomen yliopiston Luonnonainetutkimuslaboratorion ja Taimityöllilä Oy:n kanssa.

Metla yhdistyy Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus MTT:n ja Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos RKTL:n sekä Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskuksen TIKE kanssa Luonnonvarakeskukseksi 1.1.2015.

Maa- ja metsätalousministeriön hallinnon alla vuoden 2015 alusta toimintansa aloittava Luonnonvarakeskus (Luke) jatkaa hankkeessa käynnistettyä kuusen solukkoviljelymenetelmien kehitystyötä sekä ensiluokkaisen kuusen metsänviljelyaineiston tuottamista taimituotannon, metsänviljelyn ja puunjalostusteollisuuden tarpeisiin.

Punkaharjulla 30.10.2014

Saila Varis Susanne Heiska Tuija Aronen

## Sisällys

<b>Alkusanat</b> .....	4
<b>1 Havupuiden solukkolisäys ulkomailla</b> .....	7
1.1 Metsänviljelyaineistot.....	7
1.2 Joulupuiden tuotanto .....	9
<b>2 Kasvullisen lisäyksen ominaispiirteet</b> .....	11
2.1 Kasvullisen lisäyksen edut .....	11
2.2 Perinnöllinen monimuotoisuus kasvullisessa lisäyksessä .....	13
2.3 Kasvullisen lisäyksen menetelmät.....	14
2.4 Solukkoviljely.....	14
<b>3 Aineistot kuusen solukkolisäykseen</b> .....	17
3.1 Laki edellyttää kasvullisesti lisätyn metsänviljelyaineiston monimuotoisuutta .....	17
3.2 Kasvullisesti lisättyjen taimierien tuotannon enimmäismääriä on rajoitettu .....	18
3.3 Lähtöaineisto valikoidaan tarkoin .....	18
3.4 Linjojen laboratoriokasvatettavuus varmistetaan monivaiheisissa kokeissa.....	20
3.5 Kenttätesteissä selvitetään solukkolinjojen menestyminen .....	21
3.6 Testatut solukkolinjat käyttöön kasvullisen lisäyksen materiaalipalvelun kautta.....	21
<b>4 Solukkoviljelylaboratorion perustaminen</b> .....	24
4.1 Tilat .....	24
4.2 Laitteet ja käyttötavara.....	25
4.3 Kulutustavarat.....	29
4.4 Osaaminen.....	30
<b>5 Kuusen solukkolisäyksen työvaiheet</b> .....	32
5.1 Aseptisen työskentelyn perusteet .....	32
5.2 Kasvatusalustojen valmistus .....	33
5.3 Solukkoviljely.....	35
5.3.1 Viljelmien aloitus ja säilytys.....	35
5.3.2 Solukon monistaminen .....	37
5.3.3 Kasvullisten alkioden kypsytytys ja idätys .....	39
5.3.4 Taimien siirto multa ja kasvihuoneelle .....	40
<b>6 Kirjallisuutta ja lisätietoa aiheesta</b> .....	41
6.1 Aiheesta suomeksi kirjoitettua .....	41
6.2 Englanninkielistä kirjallisuutta .....	41
6.3 Hyödyllisiä nettisivuja .....	44
<b>LIITE 1. Esimerkkejä havupuiden solukkoviljelyssä käytetyistä alustoista</b> .....	45
<b>Liite 2. Laskelma esimerkkitoimittajan kemikaalien hinnoista</b> .....	48
<b>Liite 3. Laskelmia perustamis- ja tuotantokustannuksiksi</b> .....	49



# 1 Havupuiden solukkolisäys ulkomailla

## 1.1 Metsänviljelyaineistot

Kasvullisesti lisättyjä metsänviljelytaimia käytetään maailmassa vuosittain noin miljardi kappaletta. Joitakin havupuulajeja on viljelty jo pitkään käyttäen kasvullisesti lisättyä aineistoa. Hyvä esimerkki tästä on sugi (*Cryptomeria japonica*), jonka kasvatusta Japanissa on perustunut pistokaslisäykseen jo vuosituhansien ajan. Versopistokkaiden juurrutus onkin edelleen havupuilla eniten käytetty kasvullisen lisäyksen menetelmä, mutta myös solukkoviljelyä käytetään, joko yksin tai yhdistettynä pistokastuotantoon. Männyistä solukkolisäystä käytetään lähinnä loblolly- ja radiatamännillä mm. Yhdysvalloissa, Uudessa-Seelannissa ja Etelä-Amerikassa. Kuusilajeista lisätään eniten sitkankuusta ja valkokuusta, jonkin verran myös mustakuusta ja kotoista metsäkuustamme.

Englannissa ja Irlannissa tuotetaan vuosittain noin 7 miljoonaa sitkankuusen pistokasta, mikä on runsas viidennes viljelyaineistosta. Pistokkaat maksavat 1,5 x siementaimen verran, mutta menevät hyvin kaupaksi paremman kasvunsa ja laatunsa vuoksi. Irlannissa pistokkaiden emotaimina käytetään solukkoviljeltyjä taimia, joita valtion metsäyhtiö Coillte on tuottanut vuosittain noin 25 000 kpl. Yhdestä pistokasemoksi kasvatetusta solukkotaimesta saadaan pistokkaita 4-6 vuoden ajan, ja solukkoviljellyn emotaimen osuus pistokkaan hinnassa on pieni, vain 1,5 senttiä. Paikallisten suositusten mukaan pistokkaat istutetaan seoksena jalostamattoman aineiston kanssa, mikä pienentää kustannuksia. Coillten laskelmien mukaan kasvunlisäys tuottaa kuitenkin metsänomistajalle 985€/ha enemmän tuloa kuin jalostamattoman aineiston käyttö (42 v. kiertoaika, 5 % korko), eli yhden euron lisäpanoksella saadaan 6,3 € tuottoa lisää. Myös Englannissa tutkitaan mahdollisuuksia solukkolisättyjen sitkantaimien käyttöönottamiseksi pistokkaiden ohella.



**Kuva 1.1.** Sitkankuusen pistokastuotantoa Delameren taimitarhalla Englannissa: **a)** pistokkaiden emotaimia, **b)** pistokkaiden juurrutus kasvihuoneessa ja **c)** juurrutettuja pistokkaita Sitkankuusen pistokastuotannossa on käytetty solukkotaimia pistokasemoina. Kuvat T. Aronen.



Kanadassa käytetään metsänviljelyssä eri kuusilajien pistokastaimia 4-10 miljoonaa kappaletta vuosittain, mutta sen lisäksi viljelyaineistoksi tuotetaan myös solukkotaimia. Kasvullisesti lisättyä aineistoa käytetään ns. lajikemetsätaloudessa (engl. ”multi-varietal forestry”), jossa kasvullisesti lisättyjä taimia viljellään 10–30 eri kloonin seoksina. Lisäksi viljelyerässä voi olla mukana myös siementaimia, jopa eri puulajeista, monimuotoisuuden lisäämiseksi ja kustannusten alentamiseksi. Puulajista ja valittujen puiden lukumäärästä riippuen lajikemetsätaloudessa voidaan saavuttaa jopa 40 %:n kasvunparannus verrattuna jalostamattoman metsänviljelyaineiston käyttöön.

Kanadassa pääosin New Brunswickissa toimivalla JD Irving –yhtiöllä on kenttäkokeissa yli 2000 solukkolinjaa, ja näistä jo noin 100 on tuotannossa. Pääosa vuosittain tuotetuista 0,4-1,2 miljoonasta solukkotaimesta on valkokuusta, mutta yhtiöllä on kokemusta myös metsäkuusen solukkotaimista. Solukkotaimien tuotantoa ollaan paraikaa lisäämässä: suunnitteilla on uusi laboratorio taimien tuotantoon ja vuoden 2017 tavoitteeksi on asetettu 3 miljoonan taimen vuosituotanto. Myös Quebecissä ollaan panostamassa valkokuusen solukkotaimien tuotantoon: uusia tuotantotiloja rakentamalla provinssin taimitarha aikoo lisätä solukkotaimien vuosituotantoa nykyisestä noin 70 000:sta vähitellen neljään miljoonaan vuoteen 2019 mennessä.

Solukkotaimien tuotannon laajentamisen ohella Kanadassa odotetaan paljon valkokuusen solukkolisäyksen ja genomisen valinnan yhdistämiseltä. Genomisessa valinnassa parhaiden puiden valinta tehdään koko perimän kattavan DNA-tiedon varassa, tarvitsematta testata puita kentällä, mikä voi nopeuttaa uuden, jalostetun metsänviljelyaineiston saamista käytäntöön vuosikymmenellä tai kahdella. Genomisen valinnan edellytyksenä on kyllin kattava tieto lajin perimässä olevasta muuntelusta ja sen yhdistäminen testipopulaatioissa mitattuun ominaisuuksien vaihteluun. Genomisen valinnan mahdollisuuksia on tutkittu valkokuusella, ja saatu erittäin lupaavia tuloksia. Kanadassa on myös tutkittu kuusien hyönteiskestävyuden parantamista solukkolisäystä soveltamalla: Metsäkuusen solukkotaimien 12-vuotisessa kenttäkokeessa havaittiin, että valitsemalla 242 testattavasta linjasta viljeltäväksi 48 parasta, voitiin *Pissodes strobi* –hyönteisen aiheuttamia tuhoja vähentää merkittävästi (50 → 6 %) ja samalla parantaa puiden tilavuuskasvua 31 %.

Myös naapurimaassamme Ruotsissa panostetaan paraikaa kuusen kasvullisesti lisätyn metsänviljelyaineiston tuotannon kehittämiseen. Taimiyhtiöistä Södra tuottaa tällä hetkellä noin miljoona kuusipistokasta vuodessa, mutta määrä on tarkoitus tuplata. Pistokastaimilla saavutetaan 25 % kasvunparannus, mikä riittää hyvin kattamaan pistokastaimien siementaimia kalliimman hinnan (0,19 € lisäkulu per taimi).

Ruotsalaiset taimiyhtiöt Södra, Bergvik Skog, Holmen ja Sveaskog ovat myös yhdessä SweTree Technologies –biotekniikkayhtiön kanssa kehittämässä kuusen solukkotaimien massatuotantoa, ja tavoitteena on saada ”alkioetehtaan” tuotanto käyntiin lähivuosina. Ruotsalaisten laskelmien mukaan SweTreellä nyt käytössä olevan, bioreaktoreihin perustuvan pilottilaitteiston kaltainen tuotantolaitos olisi kannattava 10 miljoonan taimen vuosituotannolla. Yhtiö kertoo jo optimoineensa kasvullisten alkioiden tuotannon alkuvaiheet: solukon monistamisen ja alkioiden kypsytämisen bioreaktoreissa, sekä alkioiden automatisoidun poiminnan idätettäväksi. SweTreellä on patentti myös idätettyjen alkioiden automaattiselle istutukselle jatkokasvatukseen. Solukkotaimien koko tuotantoketjun testaaminen Uppsalaan rakennetussa pilottilaitoksessa alkaa 2015.

Ruotsissa kuusen solukkotaimia on tarkoitus käyttää metsänviljelyssä ns. valittujen perheiden massamonistuksen (engl. ”family forestry”) kautta. Mallissa taimierä koostuu noin 25 testaamattomasta kloonista, jotka ovat peräisin kuudesta hyväksi tunnetusta risteytysperheestä. Tarkoitus on istuttaa solukkotaimet parhaille maapohjille ja käyttää viljelyssä suurta määrää eri genotyyppisiä, niin että yhdestä puusta monistetaan taimia 0,1–1 milj. kpl.





**Kuva 1.2.** Valkokokuusen solukkotaimien tuotantoa JD Irving -yhtiön laboratoriossa ja taimitarhalla Kanadassa: **a)** Suodatinpapereilla solukkoviljelyalustalla kypsytettyjen kasvullisten alkioiden keräys idätykseen tapahtuu laminaarissa. **b)** Huuhdeltuja, kypsiä alkioita valmiina idätettäväksi. **c)** Alkioiden idätys kertakäyttöisissä muovirasioissa onnistuu sekä sinipunaisten LED-valojen että tavallisten loisteputkien alla. **d)** Koulintavalmiit solukkotaimet. **e)** Solukkotaimet koulitaan käsin GrowTech- tai Jiffy-potteihin jatkokasvatettavaksi kasvihuoneella. **f)** Solukkotaimien alkukasvatus tapahtuu sumukastelulla varustetussa kasvihuoneessa. Kuvat T. Aronen.

## 1.2 Joulupuiden tuotanto

Havupuita solukkoviljellään myös muuhun kuin metsätalouden tarpeisiin. Hyvä esimerkki on kaukaasianpihta, jota kasvatetaan erityisesti joulupuiksi Saksassa ja Tanskassa. Saksassa solukkolisättyjä kaukaasianpihtoja tuotetaan nykyisin vuosittain noin 120 000 kpl, käsityönä, jolloin yhden solukkotaimen hinnaksi on arvioitu 1,2 €. Solukkolisättyjen taimien osuus on kuitenkin vielä pieni, sillä joka joulu Saksassa myydään noin 20 miljoonaa joulupuuta.

Myös Tanskassa pyritään kaukaasianpihdan kasvulliseen lisäykseen. Syynä tähän on se, että siemenistä kasvatetut puut vaihtelevat laadultaan paljon, ja joulupuumarkkinoilla hyvälaatuisesta puusta saa moninkertaisen hinnan huonolaatuiseen verrattuna. Tällä hetkellä tutkimuksessa keskitytään uusien kenttäkokeiden perustamiseen yli 500 joulupuutuotantoon tarkoitetun linjan testaamiseksi. Solukkotaimia tuotetaan toistaiseksi vain muutamasta linjasta, 25 000–50 000 kpl vuosittain. Tanskassa on mm. kehitetty robotteja solukkoviljelmien käsittelyyn ja tuotettujen taimien koulumiseen. Kehitetty teknologia toimii hyvin, mutta pihtaviljelmien alkioden kehittymisen eriaikaisuus hankaloittaa automatiikan käyttöönottoa.

Kiinnostus havupuiden, erityisesti kuusen solukkolisäystä kohtaan on viime vuosina voimakkaasti lisääntynyt myös Suomessa. Tässä oppaassa on kerrottu kuusen solukkoviljelyn perusteista ja sen edellyttämistä tiloista, laitteista ja tarvittavasta osaamisesta. Tavoitteena on kuvata kuusen käsityönä toteutettua solukkoviljelyä havainnollisesti ja realistisesti, sekä antaa kuva mahdollisuuksista, joita menetelmän automatisointi ja massalisäyksen kehittäminen tarjoaa.

## 2 Kasvullisen lisäyksen ominaispiirteet

*Kunkin puun ominaisuudet perustuvat sen perintötekijöihin. Siihen, millaisia puista lopulta kasvaa, vaikuttaa myös kasvuympäristö. Jos halutaan tuottaa ominaisuuksiltaan samanlaisia puita, on puun perintötekijöiden muodostama kokonaisuus, **genotyyppi**, pystyttävä myös säilyttämään samana. Ainoa mahdollinen tapa tähän on puiden kasvullinen lisäys, monistaminen. Suvullisessa, siemenen kautta tapahtuvassa lisäämisessä perintötekijät järjestyvät aina uudestaan, ja mahdollisuus samanlaiset ominaisuudet tuottavan perintötekijöiden yhdistelmän syntymiseen on pieni. Jokainen siemensyntyinen taimi on siten oma yksilönsä, ja eroaa muista. Kasvullisessa lisäyksessä syntyvät taimet taas ovat perimältään monistetavan yksilön kopioita ja myös keskenään samanlaisia. Tällaista perimältään samanlaisten yksilöiden joukkoa kutsutaan **klooniksi**.*

### 2.1 Kasvullisen lisäyksen edut

Kasvullisesta lisäyksestä on hyötyä, kun halutaan kasvattaa tietynlaisia puita. Monistettavat puuyksilöt voidaan valita erilaisilla perusteilla, mutta kasvullisen lisäyksen perusidea on aina sama: tuottaa halutunlaisia puita, joiden ominaisuudet tunnetaan. Ominaisuuksia, joiden perusteella puut valitaan kasvullisesti lisättäviksi, on useita: hyvä kasvu tai jokin puuaineen laatuominaisuus, koristeellinen ulkomuoto tai taudinkestävyys, tai vaikkapa sopeutuneisuus tiettyihin ympäristöoloihin.

Joissakin tapauksissa kasvullinen lisäys on *ainoa mahdollisuus tuottaa viljelyaineistoa halutunlaisista puista*. Näin on usein esimerkiksi kuusen koristemuotojen tapauksessa: monessa tapauksessa erikoisen ja viehättävän ulkomuodon aikaansaa yhdessä perintötekijässä tapahtunut muutos, mutaatio, joka periytyy väistävasti eli ei ilmene puun jälkeläisissä. Siemenlisäyksellä ei silloin voida tuottaa samanlaisia puita.

Yksi kasvullisen lisäyksen eduista on siten *ennustettavuus*: Silloin kun monistettavan puun ominaisuudet tunnetaan, tiedetään jo ennalta millaisia puita siitä kasvullisesti lisätyistä taimista aikaan tulee, toisin kuin siementaimien tapauksessa. Kasvuympäristö luonnollisesti vaikuttaa myös kasvullisesti lisättyjen taimien ominaisuuksiin ja menestymiseen, mutta tästäkin voidaan saada tietoa kasvattamalla samasta yksilöstä monistettuja puita erilaisissa olosuhteissa. Näin voidaan ennakoita lisätyn materiaalin sopeutumista erilaisiin ympäristöoloihin. Kasvullisesti lisätty aineisto on alkuperäisen yksilön kaltaista ja myös keskenään samanlaista. *Viljelyaineiston yhtenäisyydellä* on merkitystä haluttaessa tuottaa *tasalaatuista raaka-ainetta* tai vaikkapa viherrakentamisen suunnittelussa.

Metsänviljelytaimet tuotetaan nykyisin lähes kokonaan siemenviljelyksillä lisäystä jalostetusta siemenaineistosta sekä valikoimattomasta metsikkökeräyssemenestä. Metsänjalostuksella saatujen parannusten siirtäminen käytäntöön vie melko pitkän ajan. Siemenviljelyyn valitut parhaat puut monistetaan vartteina siemenviljelyksille, joissa ne risteytyvät keskenään ja tuottavat jalostettua siementä metsänviljelyyn. Kuusella vie helposti 15–20 vuotta, ennen kuin siemenviljelykseltä saadaan keräyskelpoisia satoja. Siemenviljelysten perustamiseen ja satoikäiseksi varttumiseen kuluva aika jää kasvullisessa lisäyksessä pois, minkä johdosta metsänjalostuksen tulokset saadaan siirrettyä entistä nopeammin hyödyttämään metsätaloutta.



Siemenviljelyksiin valitut pluspuut tuottavat siementä, joka on mm. kasvuominaisuuksiltaan parempaa kuin valikoimaton metsikkösiemen. Siemenviljelyksillä kuitenkin menetetään osa (25–50 %) saavutettavissa olevasta jalostushyödyistä, koska suuri osa niillä tuotetusta siemenestä on saanut alkunsa ympäröivistä metsistä peräisin olevasta valikoimattomasta siitepölystä. Lisäksi suvullisessa lisääntymisessä tapahtuva perintötekijöiden uudelleenjärjestäytyminen hajottaa valituissa puissa olevat suotuisten geenien yhdistelmät, millä on merkitystä silloin jos puut on valittu siemenviljelyyn kloonitestauksen perusteella. Kasvullisessa lisäyksessä nämä ongelmat vältetään, joten ne tarjoavat lähtökohtaisesti mahdollisuuden siemenviljelyä suurempiin jalostushyötyihin.

Kasvullinen lisäys voi myös *nopeuttaa ja tehostaa metsänjalostuksen etenemistä*. Puiden testaamiseen ja valintaan on käytetty perinteisesti jälkeläiskokeita, eli puita on arvioitu perustuen niiden jälkeläisten ominaisuuksiin ja menestymiseen eri paikoilla tehdyissä kenttäkokeissa. Vaihtoehto jälkeläistestaukselle ovat kloonikokeet, joissa testattavat yksilöt monistetaan kasvullisesti suoraan kenttäkokeisiin. Kloonitestauksella puiden valinta nopeutuu, koska ei tarvitse odottaa niiden kukkimista ja jälkeläisten kasvamista. Valinta myös tarkentuu, koska kloonikokeissa arvioidaan suoraan genotyyppiä eikä sen sukulaisia.



**Kuva 2.1.** Kasvullisesti lisättävät puuyksilöt voidaan valita erilaisilla perusteilla. **a)** Hyvä kasvu on tärkeä ominaisuus metsänviljely-aineistolle. Kuvassa samanikäisiä kuusen pistokasklooneja Röykässä. Viherrakentamiseen ja koristepuiksi taas voidaan valita esim. **b)** kapeatvaisia surukuusia, **c)** säännöllisen kartion mallisia, kääpiöiviä tai pallomaisia kuusia, tai vaikkapa **d)** keltaneulaisia kultakuusia. Kuvat: a, Metsänjalostussäätiön arkisto, b-d, Teijo Nikkanen.

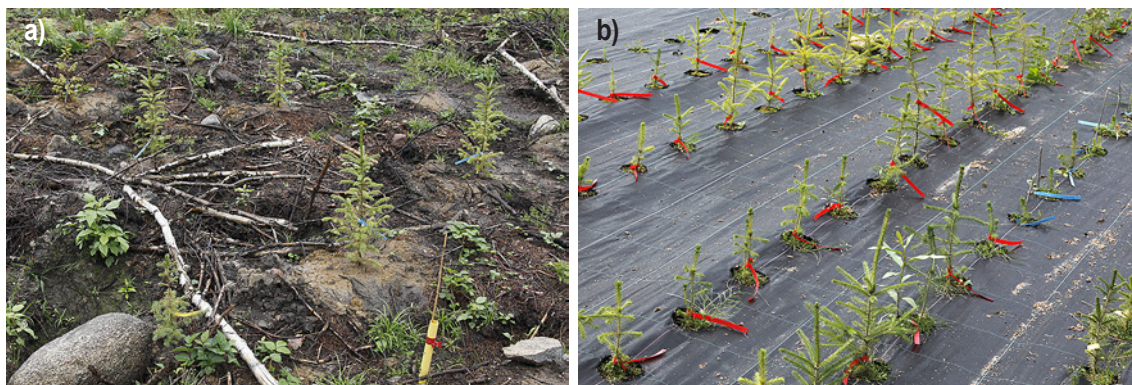
## 2.2 Perinnöllinen monimuotoisuus kasvullisessa lisäyksessä

Pohjoisten metsäpuidemme, kuten kuusen, luonnonpopulaatioissa on paljon perinnöllistä muuntelua. Suurin osa tästä muuntelusta on paikallisten populaatioiden sisällä, eli samassa metsässä kasvavien puiden välisiä eroja. Eri alueilla kasvavat populaatiot eivät puolestaan eroa perinnöllisesti toisistaan kovinkaan paljoa, vaikka voivatkin olla sopeutuneita erilaisiin olosuhteisiin.

Kun tarkastellaan kasvullisesti lisättyjen aineistojen perinnöllistä monimuotoisuutta, täytyy erottaa toisistaan kaksi käsitettä: geneettinen ja genotyyppinen monimuotoisuus. Geneettisellä monimuotoisuudella tarkoitetaan tarkasteltavan aineiston, vaikkapa taimierän, sisältämien geenimuotojen (alleelien) ja niiden yhdistelmistä syntyvää geneettisen vaihtelun määrää eri ominaisuuksissa. Genotyyppinen monimuotoisuus puolestaan viittaa perimältään erilaisten yksilöiden lukumäärään.

Kasvullisen lisäyksen ominaispiirteisiin kuuluu, että sen kautta tuotetussa taimierässä on juuri niin monta erilaista genotyyppiä kuin oli alkuperäisiä monistettavia yksilöitäkin, eli kasvullisessa lisäyksessä genotyyppinen monimuotoisuus pienenee. Sen sijaan geneettinen monimuotoisuus, erilaisten geenimuotojen määrä, ei välttämättä juurikaan vähene. Geneettisen monimuotoisuuden määrä riippuu kuitenkin myös alkuperäisten monistettavien puiden määrästä. Esimerkiksi kahdestakymmenestä yksilöstä monistettu taimijoukko sisältää saman verran geneettistä monimuotoisuutta kuin siemenerä, joka on tuotettu käyttäen näitä samaa kahtakymmentä puuta vanhemmina.

Perinnöllisen monimuotoisuuden määrällä on merkitystä metsänviljelyssä. Samanlaisen perimän omaavat yksilöt käyttävät ympäristön resursseja todennäköisesti samalla tavalla, jolloin puiden keskinäinen kilpailu voi teoriassa lisääntyä. Metsänhoidossa puiden kilpailua kuitenkin vähennetään ja säädelään toistuvilla harvennuksilla. On myös syytä muistaa että monistetut taimet ovat alkuperäisen kopioita kaikessa, niin hyvissä kun huonoissakin ominaisuuksissa: jos alkuperäinen puu osoittautuu esim. alttiiksi jollekin taudille tai tuholaiselle, ovat kaikki sen kopiotkin sitä. Tästä syystä kasvullisesti lisättyä aineistoa kannattaa kasvattaa seoksina, joissa on useita eri genotyyppiä. Lisäksi on tärkeää testata massaläisittävä aineisto huolellisesti kyllin pitkäkestoisissa kenttäkokeissa. Koetulosten perusteella monistettavaksi valitaan vain ominaisuuksiltaan toivottunlaisia, hyvin sopeutuneita ja terveitä puita.



**Kuva 2.2.** Kuusen solukkotaimien kasvua ja ominaisuuksia seurataan kenttäkokeissa: **a)** Metsänviljelyyn tarkoitetuista kuusilinjoista tuotettuja solukkotaimia Punkaharjulle 2014 istutetussa näytealassa. **b)** Kuusen erikoismuotolinjoista (surukuusen ja purppurakuusen risteymät) tuotettuja solukkotaimia Punkaharjun taimitarhalla. Kenttätestauksella valitaan haluttuja ominaisuuksia omaavat linjat lisääväksi. Kuvat Teijo Nikkanen.

Käytettäessä kasvullisesti lisätyjä taimia metsänviljelyyn, riittävä perinnöllinen monimuotoisuus voidaan varmistaa sisällyttämällä monistukseen lukuisia eri genotyyppisiä ja vaihtamalla niitä sekä alueellisesti että ajallisesti. Lainsäädännössä on määritelty rajat yhdestä yksilöstä monistetujen taimien tuotantomäärille ja taimierän genotyyppien vähimmäismäärälle riippuen siitä, kuinka pitkän kenttätestauksen aineisto on läpikäynyt. Lisäksi myös kasvullisesti lisätyillä taimierillä on määritelty käyttöalueensa, aivan kuten siementaimillakin – kullekin alueelle tuotetaan sinne sopeutunutta aineistoa. Perusideana on myös valita jatkuvasti uusia, hyviä puita monistettavaksi, jolloin kasvatuksessa olevien kasvullisten aineistojen perinnöllinen monimuotoisuus koko ajan lisääntyy.

### 2.3 Kasvullisen lisäyksen menetelmät

Kuusen taimituotantoon soveltuvia kasvullisen lisäyksen menetelmiä ovat varttaminen mukaan lukien silmustus, pistokasmonistus ja solukkoviljely. Tässä oppaassa käsitellään vain solukkoviljelyyn perustuvaa lisäystä. Verrattuna siementaimien tuotantoon kasvullisen lisäyksen menetelmät vaativat enemmän käsityötä ja erityistiloja toimiakseen, minkä vuoksi taimista tulee siementaimia kalliimpia. Yhteistä kaikille puulajeille ja monistusmenetelmille on, että puiden joukossa on aina yksilöitä, joiden kasvullinen lisäys onnistuu muita huonommin.

Lisäysmenetelmien tekniset vaatimukset ja taimien tuotantopotentiaali ovat sangen erilaisia. Varttaminen vaatii lähinnä käsityötaitoa, mutta vie paljon työaikaa yhtä tuotettua taimea kohden. Pistokastuotannossa on tarpeen sumukastelulla ja juurrutuspetien pohjalämmityksellä varustettu kasvihuone. Solukkolisäys edellyttää kasvihuoneen lisäksi myös laboratoriotilaa ja aseptisen työskentelyn hallitsevaa henkilöstöä. Toisaalta solukkoviljelyllä voidaan taimia monistaa paljon tehokkaammin kuin varttamalla tai pistokkainaan. Pistokaslisäys onnistuu vain nuoresta tai leikkaamalla pienenä pidetystä kuusesta, ja parhaimmillaankin yhdestä yksilöstä saa kerrallaan vain korkeintaan joitakin kymmeniä pistokkaita. Solukkoviljelyssä voidaan puolestaan yhdestä grammasta solukkoa tuottaa satoja taimia.

### 2.4 Solukkoviljely

Puiden solukkoviljely perustuu ns. totipotenssiin. Tämä tarkoittaa sitä, että erilaistumattomalla kasvisolulla on kyky muodostaa kokonainen uusi kasviyksilö. Solukkoviljelyssä puita monistetaan laboratoriossa viljelemällä siemenalkiosta tuotettua solukkoa keinotekoisella ravintoalustalla. Ravintoalusta sisältää veteen sekoitettuna kaikki kasvin tarvitsemat ravintoaineet ja sokeria. Sokeria solukko tarvitsee, koska se ei itse pysty yhteyttämällä tuottamaan tarpeeksi energiaa kasvuun ja erilaistumiseen. Alustassa on lisäksi kasvunsäätelyaineita, kasvihormoneja, joilla ohjataan solukon kasvua ja erilaistumista. Solukkoviljelyssä myös lämpö- ja valaistusolosuhteet ovat tarkoin säädetyt, ja myös niiden avulla voidaan vaikuttaa viljelmien kehitykseen.

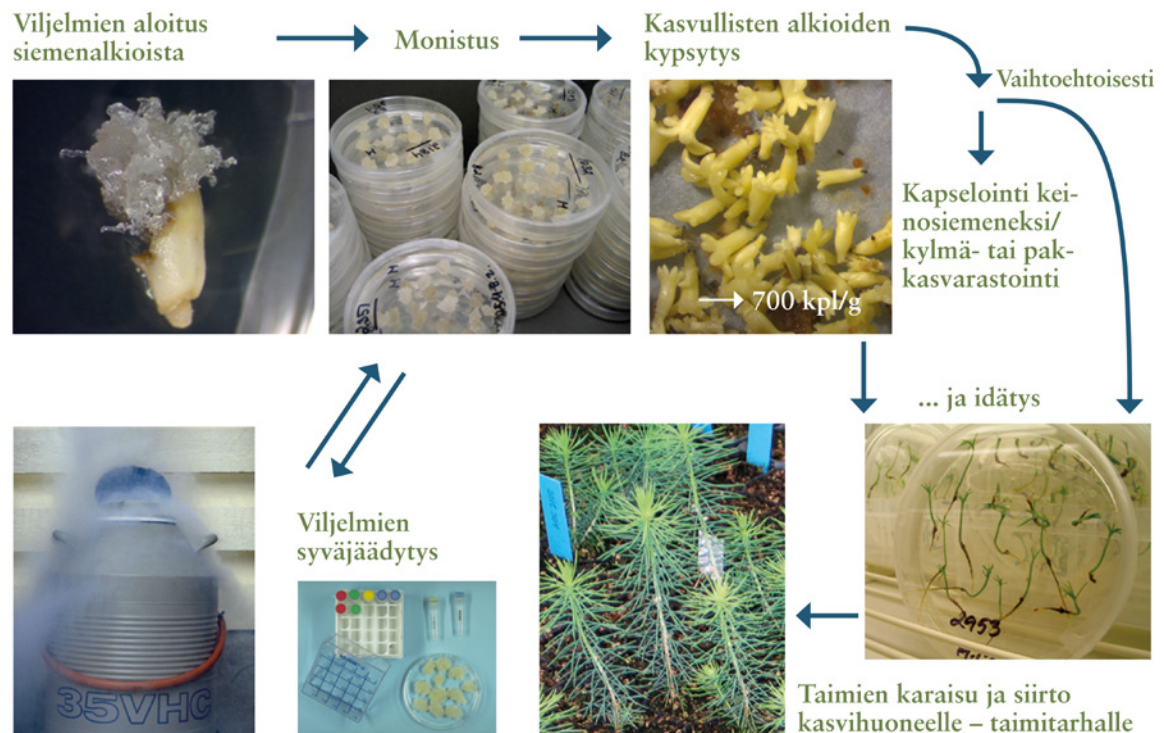
Solukkoviljelymenetelmiä on erilaisia. Tavallisimmat ovat organogeneettinen eli elinsyntyinen lisäysmenetelmä ja somaattiseen embryogeneesiin eli kasvullisten alkuiden muodostumiseen perustuva menetelmä. Jokaiselle puulajeille on oma solukkoviljelymenetelmänsä, koska lajien – ja joskus yksilöidenkin – vaatimukset niin ravintoalustan koostumuksen kuin viljelyolosuhteiden suhteen vaihtelevat. Lehtipuilla käytetään useimmiten elinsyntyistä solukkolisäystä, ja havupuilla kasvullisten alkuiden tuotantoa.



Vaikka kuusen solukkolisäys ei ole toistaiseksi onnistunut elinsyntyisesti, on syytä ymmärtää menetelmän pääpiirteet, jotta voi hahmottaa olennaiset erot lehtipuiden ja havupuiden solukkolisäyksessä. Elinsyntyisessä lisäysmenetelmässä viljelyssä olevaan kasvisolukkoon erilaistuu ensin versoja, jotka sitten yksitellen juurrutetaan. Menetelmää kutsutaan usein myös mikrolisäykseksi, koska siinä syntyvät taimet ovat pienikokoisia. Kasvihuoneelle siirrettynä ne saavuttavat nopeasti normaalin koon.

Monilla lehtipuulajeilla mikrolisäys onnistuu kaikenikäisistä puista, kunhan vain solukkoviljelmien aloittamiseen käytettävä lähtösolukko on oikeanlaista. Tavallisimmin käytetään lepotilaisia kasvullisia silmuja, joiden pinta steriloidaan esimerkiksi alkoholilla ennen silmusuomujen ja uloimpien lehtiaiheiden poistamista. Solukkoviljelyalustan kasvihormonien avulla kasvuun lähtenyt silmu saadaan tuottamaan pieniä versoja, joita lisätään joko versoryypäitä jakamalla tai pilkkomalla versot mikropistokkaiksi. Toisessa vaiheessa yksittäiset versot juurrutetaan joko solukkoviljelyoloissa tai kasvihuoneessa.

Kasvullisten alkioiden tuotannossa (= somaattinen embryogeneesi, SE) puolestaan matkitaan keinoisesti siemenen sisässä tapahtuvaa siemenalkion kehitystä. Solukkoviljelmään syntyy kuitenkin samanaikaisesti yhden alkion sijasta suuri määrä alkioita. Nimensä mukaisesti tässä lisäysmenetelmässä erilaistuvaan solukkoon kehittyvät yhtä aikaa varsi, lehdet ja juuri, toisin sanoen kokonainen alkio. Toisin kuin siemenalkioilla, kypsillä kasvullisilla alkioilla ei kuitenkaan ole ympärillään suojaavaa siemenkuorta ja itämiseen energiaa antavaa ravintosolukkoa. Tästä syystä kasvullisia alkioita ei voida kylvää suoraan kasvihuoneelle, vaan ne on idätettävä solukkoviljelyoloissa, ja koulittava sitten jatkokasvatukseen. Kuusen kasvullisten alkioiden tuotantoprosessin pääpiirteet on esitetty kuvassa 2-3.



Kuva 2.3. SE-prosessin vaiheet. (Taimiuutiset 1/2013).



Tällä hetkellä kuusella käytössä olevassa menetelmässä kasvullisten alkioiden tuottaminen edellyttää nuorta lähtösolukkoa. Viljelmät aloitetaan joko kehittyvistä tai kypsistä siemenalkioista, eli menetelmässä on oikeastaan kyse siementen monistamisesta. Monistettavan siemenaineiston vanhemmat voidaan valita, mutta tällä perusteella ei vielä tunneta lisättyjen taimien ominaisuuksia tarkkaan, sillä hyvienkin puiden jälkeläisissä on aina vaihtelua. Alkioita tuottavat solukkoviljelmät voidaan kuitenkin säilyttää syväjäädetytynä, kunnes niistä tuotettujen taimien kenttätestauksen perusteella tiedetään, mitä niistä halutaan monistaa lisää. Ilman syväjäädetytystä, jatkuvasti kasvatettuna viljelmät menettävät vuosien kuluessa vähitellen alkiontuotantokykynsä.

Havupuiden solukkolisäyksen soveltamisen kannalta olisi ihanteellista, jos viljelmät pysyttäisiin aloittamaan aikuisista, ominaisuuksiltaan jo tunnetuista puista. Kanadassa on onnistuttu tuottamaan kasvullisia alkioita käyttäen viljelmien aloitukseen 10-15-vuotiaista valkokuusista kerättyjä silmuja. Valkokuusen menetelmää tutkitaan parasta aikaa myös kotoisella kuusellamme, mutta tuloksia solukkoviljelmien onnistumisesta ei vielä ole.

Kuusen kasvullisten alkioiden tuotantoon perustuvaa solukkolisäystä ja sen edellytyksiä on kuvattu vaihe vaiheelta tämän oppaan eri luvuissa. Oppaan painopiste on menetelmän perusteissa ja eri vaiheiden toteuttamisessa käsityönä. Massamonistukseen pyrittäessä kasvullisia alkioita tuottavia solukkoviljelmiä voidaan myös kasvattaa ravintoliuksessa suurissa bioreaktoreissa, ja muodostuneet alkioit joko kapseloida keinosiemeneksi tai kylmävarastoida kylvettäväksi / idätettäväksi myöhemmin.

### 3 Aineistot kuusen solukkolisäykseen

Metlan Punkaharjun toimipaikassa tuotetaan, testataan ja säilytetään kuusen lisäsolukkoa taimituotannon ja tutkimuksen tarpeisiin. Solukkolinjojen tuotanto aloitettiin vuonna 2011 osana kuusen solukkolisäysmenetelmien kehitystyötä. Vuosien 2011 ja 2012 aloituksista kryosäilytykseen on valittu n. 300 laboratorioskavatukseen hyvin soveltuvaa linjaa. Jatkossa linjojen määrä on tarkoitus moninkertaistaa. Tavoitteena on, että tulevaisuudessa Luken linjatarjonnasta löytyy laboratorio- ja kenttätestein valikoituja vaihtoehtoja sekä hyväkasvuisten ja terveiden **metsänviljelytaimien** tuotantoon, että kestäviä ja kotimaisia koristekuusia **viherrakentamiseen**. Lisäysaineiston tuotannossa ja testauksessa painotetaan laatua ja monimuotoisuutta

#### 3.1 Laki edellyttää kasvullisesti lisätyn metsänviljelyaineiston monimuotoisuutta

Suomessa solukkoviljelymenetelmin tuotetun metsän viljelyaineiston kauppaa säätelevät:

- 241/2002 Laki metsänviljelyaineiston kaupasta
- 1055/2002 Maa- ja metsätalousministeriön asetus metsänviljelyaineiston kaupasta

Solukkolisätyn aineiston on täytettävä samat metsänviljelyaineistolle asetetut perusvaatimukset kuin siementaimiaineistonkin. Nykyiset säädökset asettavat vaatimuksia kasvulliseen lisäykseen tarkoitettulle perusaineistolle ja kasvullisesti lisätyille taimierille. Suomen metsä- tai ympäristölainsäädäntö ei kiellä kloonimetsätaloutta tai aseta rajoitteita kloonitaimilla viljellyille pintaaloille. Käytännön toimintamalleja sille, miten säädöksiä sovelletaan solukkoviljelyn aineiston markkinoinnissa, kehitetään parhaillaan Metlan ja Eviran yhteistyönä.

Solukkoviljeltyä metsänviljelyaineistoa voidaan markkinoida (i) yksittäisinä klooneina, (ii) klooniyhdistelminä, (iii) tunnettujen vanhempien risteytysperheenä, tai (iv) perheinä, joiden siementä saatuja alkioita on massamonistettu. Evira pitää yllä perusaineistorekisteriä, johon massamonistettavat aineistot merkitään. Kuusi voidaan merkitä testattu-luokkaan yksittäisinä klooneina tai vähintään neljästä kloonista muodostuva yhdistelmä. Alustavasti testattu-luokkaan voidaan merkitä vähintään 11:sta kuusikloonista muodostuva yhdistelmä.

Klooniyhdistelmän rekisteröinti testattu-luokkaan edellyttää vähintään 8–10 vuoden kenttätestausta. Tätä lyhyemmän kenttätestauksen tulosten perusteella klooniyhdistelmä voidaan rekisteröidä alustavasti testattu-luokkaan. Kenttätestaustulosten valmistuttua parhaat kloonit voidaan siirtää alustavasti testattu-luokasta testattu-luokkaan ja niistä voidaan muodostaa klooniyhdistelmiä.

Kuusen risteytysperheiden massalisäyksessä monistetaan testattujen puiden risteytyksestä saatujen siementen alkioita. Lisättävää aineistoa ei tarvitse testata, sillä vanhempien geneettinen arviointi on tehty samoin periaattein ja menetelmin, kuin testatuilla siemenviljelyksillä. Tunnettujen puiden risteytyksestä valitaan monistukseen niin paljon siemeniä, että joukko kattaa riittävän osan perheen sisäisestä vaihtelusta. Perusaineistorekisteriin merkitään tiedot perheen vanhemmista.

### 3.2 Kasvullisesti lisättyjen taimierien tuotannon enimmäismääriä on rajoitettu

Alustavasti testattu-luokkaan kuuluvasta kuusikloonista voi tuottaa miljoona tainta, mutta testattu-luokkaan hyväksytyjen kloonien määrää ei ole rajoitettu. Lisävaatimuksena klooneyhdistelmistä kasvatettujen taimierien geneettistä koostumusta valvotaan: alustavasti testattu-luokassa vähintään 90 % yhdistelmän klooneista tulee olla edustettuina taimierässä ja kloonien osuuksien ero saa olla vähintään 5 prosenttiyksikköä. Testattu-luokassa yksittäisten kloonien osuuksien ero saa olla enintään 10 prosenttiyksikköä.

Yhdestä alustavasti testattu-luokkaan kuuluvasta perheestä saa tuottaa enintään neljä miljoonaa kloonitainta. Testatuista vanhemmista tuotettujen kuusen taimien määrää ei kuitenkaan ole rajoitettu. Nykyiset säädökset eivät ota kantaa siihen, kuinka monesta eri siemenestä (yksilöstä) olevaa aineistoa massamonistetussa perheessä tulee olla.

Ruotsissa kuusen solukkotaimien tuotantoa on suunniteltu siten, että perusaineistorekisteriin merkittäisiin kuusi perhettä, joista valittaisiin yhteensä 25 yksilöä.

Säädökset edellyttävät solukkotaimia tuottavalta taimitarhalla kloonien riittävää erillään pitoa ja yksilöintiä, jotta säädösten rajoitteita ja tuotetun metsänviljelyaineistolle asetettuja vaatimuksia pystytään seuraamaan. Evira saa tiedon tuotetun aineiston määrästä saadaan kloonitaimille myönnettyistä kantatodistuksista.

Määrälliset rajoitukset klooneille ja klooneyhdistelmien koostumukselle on säädetty kansallisesti metsänviljelyaineiston kaupasta annettussa asetuksessa. Määrärajoitukset eivät ota huomioon solukkotaimien kasvatuksen erityispiirteitä. Näitä säädöksiä voidaan tarvittaessa tarkentaa solukkoviljelyn yleistyessä ja uusien käytäntöjen muotoutuessa.

### 3.3 Lähtöaineisto valikoidaan tarkoin

Lähtöaineisto kuusen **metsänviljelyaineiston** solukkolisäykseen saadaan kuusen jalostusohjelmasta, jota Metla toteuttaa. Risteytysvanhemmiksi valitaan jalostuspopulaation parhaat pluskuuset. Kuusen jalostuskokoelmissa ja siemenviljelyyksissä on tarkoitus tehdä valvottuja risteytyksiä joka kevät kukinnan salliessa. Valvotuista risteytyksistä saadaan siemenet solukkolinjosten tuotantoa varten. Risteytyskävyt toimitetaan Punkaharjun solukkoviljelylaboratorioon, jossa siemenistä tehdään ns. aloitukset (ks. kappale 5.3.1). Yhdestä siemenestä saadaan yksi perimältään yhtenäisen solukkolisäysin, josta voidaan monistaa taimia metsänviljelyyn.

Solukkolisättyä metsänviljelyaineistoa on ajateltu käytettäväksi parhailla metsänviljelyalueilla, joilla metsän kasvuun halutaan panostaa erityisesti. Toistaiseksi solukkolinjosta on tuotettu metsänviljelyn I- ja II –vyöhykkeille.

Lähtöaineisto **viherrakentamiseen** ja koristekäyttöön tarkoitettujen kuusten solukkoviljelyyn saadaan erikoismuotojen lisästarhoilta. Kuusen kotimaisia erikoismuotoja on kerätty vuosikymmenten ajan osana metsänjalostusta ja -tutkimusta. Metlalla on useita erikoismuotokokoelmia, joista merkittävimmät ovat Haapastensyrjässä ja Punkaharjulla. Näiden lisäksi kuusen kotimaisia erikoismuotoja on jonkin verran yksityisissä kokoelmissa.

**Valvotussa I. kontrolloidussa risteytyksessä** kehittyvä emikukinto eristetään kuitupussiin, joka estää ilmassa leijuvan siitepölyn kulkeutumisen kukkaan. Kun emikukinto on valmis, se hedelmöitetään toisesta valikoidusta pluspuusta kerätyllä siitepölyllä. Näin voidaan sulkea pois taustapölytyksen mahdollisuus ja varmistua, että molemmat vanhemmat ovat haluttuja, risteytykseen valikoituja pluskuusia.

Yhdestä risteytyksävystä saadaan useita siemeniä, joilla kaikilla on samat kaksi vanhempaa. Perintötekijöiden uudelleen järjestymisen vuoksi kaikilla siemenillä on kuitenkin erilainen, yksilöllinen perimä. Risteytys-siemenistä kasvatetut taimet muodostavat yhdessä ns. täyssisarperheen.



**Kuva 3.1.** Metsänviljelyaineiston risteytys. Kuva Teijo Nikkanen.

Lisästarhojen puita käytetään yleensä pistokas- ja vartetuotantoon. Puut kukkivat harvoin, mutta kukinnan onnistuessa tehdään erikoismuotojen välisiä risteytyksiä tarkoituksena saada risteytys-siemenet uusien solukkolinjojen tuotantoon. Näin voidaan saada aikaiseksi uusia ominaisuusyhdistelmiä. Myös erikoismuotojen vapaapölytyksävyyistä voidaan löytää kaupallisesti kiinnostavia linjoja.

Vuosina 2011 ja 2012 tehtiin risteytyksiä kahden erityyppisen erikoismuodon välillä: kapealatvainen kuusi risteytettiin punaneulasisen kuusen siitepölyllä. Osa risteytysjälkeläisistä on punaneulasisia, mutta kapealatvaisuuden selvittäminen vaatii vielä useampivuotista kasvatusta. Linjojen tuotantoa jatketaan kuusen kukkimisen asettamissa rajoissa. Erityisenä tavoitteena on saada aikaiseksi linjoja, joista voidaan tehokkaasti lisätä latvukseltaan kartiomaisia tai pallomaisia kuusia. Aiemmin tehdyt markkinaselvitykset ovat osoittaneet, että kotimaisille kartiomaisille havupuille olisi kysyntää.

**Kuusen erikoismuoto:** Meillä luontaisesti esiintyvistä havupuista kuusi on ulkoasultaan vaihtelevin. Perimästä johtuvaa vaihtelua esiintyy kuusella niin kasvutavassa, neulasten värissä, rungon ja kuoren kuin käpyjen rakenteessakin. Erikoismuodosta puhutaan, kun jokin ominaisuus on niin poikkeava, että se ei kuulu enää tavanomaisen lajin sisäisen vaihtelun piiriin.

Koristeelliset erikoisominaisuudet, kuten neulasten poikkeava väri tai latvuksen pallomainen kasvutapa, johtuvat perintötekijöissä tapahtuneesta mutaatiosta. Usein kyseessä on ns. väistyvä ominaisuus, jolloin erikoismuotoa on hyvin vaikea lisätä suvullisesti ts. siemenestä. Kasvullinen lisäys onkin usein ainoa vaihtoehto erikoismuotojen taimituotannossa.



**Kuva 3.2.** Kapealatvaisen kuusen ja punaneulasisen kuusen risteytyksestä saatuja solukkotaimia. Kuva Tuija Aronen.

### **3.4 Linjojen laboratoriokasvatettavuus varmistetaan monivaiheisissa kokeissa**

#### **Embryogeenisyys**

Kun risteytysiememenestä saatu alkio asetetaan keinotekoiselle alustalle, se alkaa kasvattaa solukkoa muutaman viikon kuluessa (ks. kappale 5.3.1). Kaikki solukko ei tuota alkioita, eikä siitä näin ollen voida kasvattaa uusia kasviyksilöitä solukkoviljelymenetelmillä. Linjan embryogeenisyys eli kyky kasvattaa alkioita tuottavaa solukkoa voidaan selvittää jo tässä vaiheessa mikroskopoimalla. Vain embryogeenistä solukkoa kasvattavat linjat valitaan kryopreservoitavuuden testaamiseen.

#### **Kryopreservoitavuus**

Kun solukkolinja ei ole viljelyssä, se kryopreservoidaan, eli sitä säilytetään syväjäädetyttynä nestetyypeissä Punkaharjun kylmälaboratoriossa. Käytössä on havupuille optimoitu kryopreservointimenetelmä, jossa solukko esikasvatetaan sokeripitoisilla alustoilla, käsitellään suoja-aineilla ja syväjäädetytetään hitaasti -40 °C:een. Esijäädetytetty solukko siirretään pitkäaikaiseen säilytykseen nestetyyppiä sisältävään kryotankkiin. Kun kyseinen solukkolinja halutaan ottaa takaisin tuotantoon, se sulatetaan nopeasti lämpimässä vesihauteessa.

Syväjäädetytys- ja sulatuskäsittelyt ovat elävälle solukolle rankkoja, ja havupuilla kryopreservoitavuus vaihtelee suuresti linjojen välillä. Kaikki solukkolinjat eivät kestä sulatusta, mutta toisaalta niillä linjoilla, joilla kryopreservointi onnistuu, käsittely voidaan yleensä myös menestyksekkäästi toistaa. Vain kryopreservoitavat linjat valitaan alkiontuotantokapasiteetin testaukseen.

#### **Alkiontuotantokapasiteetti**

Solukon alkiontuotantokapasiteetti eli monistumiskyky on vahvasti perintötekijöiden säätelämä ominaisuus, joka on testattava. Monistumiskykyä mitataan suurella, joka ilmoittaa laboratoriokasvatuksessa yhdestä grammasta kypsytyshalustalle siirretystä tuoreesta lisäysselästä saatujen alkioiden lukumäärän (ks. kappale 5.3.3.).

Metlassa vuosina 2011–2012 tuotettujen solukkolinjoiden alkiontuotantokapasiteetissa on suuria eroja. Vuoden 2011 risteytyksistä aloitettujen linjojen keskimääräinen alkiontuotantokapasiteetti oli 114 kpl / 1g tuoretta solukkoa, mutta vuoden 2012 risteytyksistä saadut linjat tuottivat keskimäärin vain 35 alkioita / 1g tuoretta solukkoa. Vuosien välisen suuren vaihtelun vuoksi voidaan arvela, että perimän lisäksi alkiontuotantokapasiteettiin vaikuttavat voimakkaasti muutkin seikat. Parhaimmillaan alkioita on monistunut noin 700 kpl yhdestä grammasta solukkoa.

Tehokkaan massatuotantomenetelmän edellytyksenä olisi, että tuotantoon saadaan monistuskyvyltään parhaat linjat. Kun tuotetaan linjayhdistelmiä, myös linjojen tasaisuudella on merkitystä. Raja-arvot alkiontuotantokapasiteetille voidaan asettaa tuotantomenetelmän vaatimusten ja kasvatettavan taimen käyttötarkoituksen mukaan. Metsänviljelyaineiston linjavalinnoissa tavoitellaan korkeampaa monistumiskapasiteettia kuin viherrakentamiseen tarkoitettujen erikoismuotojen linjavalinnoissa.

#### **Alkioiden itäminen**

Alkioiden kunnollinen itäminen ja juuren muodostus on edellytys niiden selviämiseksi siirrosta laboratorion kasvihuoneelle (ks. kappale 5.3.3.). Myös näissä ominaisuuksissa on linjakohtaisia eroja. Tavoitteena on, että massatuotantoon valittavat linjat tuottaisivat alkioita, joista on kehittyy tasalaatuisia taimia laboratoriokasvatuksen viimeisessä vaiheessa, idätyksessä. Itämistä voidaan

pitää hyvänä, kun alkio muodostaa vähintään neljä tasakokoista, vihreää sirkkalehteä ja alkiossa ei ole havaittavissa epämuodostumia. Myös juuren tulisi kehittyä idätysvaiheen aikana. Hyvän juuren koko on tasapainossa vihreän verso-osan kanssa. Juurikarvojen muodostuminen tai juuren haaroittuminen ovat myös hyvän itämisen tuntomerkkejä. Laboratoriotestausvaiheen aikana kasvihuoneella ja kentällä tehtäviin kokeisiin valitaan itävyydeltään hyvät linjat.

### 3.5 Kenttätesteissä selvitetään solukkolinjojen menestyminen

Laboratoriokasvatettavuudeltaan parhaat **metsänviljelyyn** tarkoitetut linjat valitaan kenttätestaukseen. Kustakin linjasta kasvatetaan taimitarhalla joukko koetaimia, jotka istutetaan kenttäkokeisiin noin kaksivuotiaina. Solukkotaimien kenttäkokeet toteutetaan jalostusohjelman kenttätestausmenetelmän mukaisesti. Tavoitteena on testata jokainen linja vähintään neljällä paikkakunnalla ja vähintään kymmenellä solukkotaimella / klooni / paikkakunta. Kenttäkokeissa mitataan taimien pituuskasvua ja tehdään havaintoja niiden kasvurytmistä, jälkikasvusta sekä taudin- ja tuholaisenkestävyydestä.

Ensimmäinen solukkoviljelyllä metsänviljelyaineistolla tehtävä kenttäkoe perustetaan keväällä 2015. Testaustoimintaa olisi resurssien salliessa tarkoitus laajentaa tulevina vuosina. Ensimmäisistä kenttäkokeista saadaan kokemusta ja tietoa, joiden pohjalta voidaan arvioida, kuinka kauan testausta on jatkettava, ennen kuin voidaan varmuudella osoittaa linjojen erinomaisuus ja valita monimuotoisuuden kannalta riittävä linjayhdistelmä metsänviljelyyn.

Kun tulokset kenttätestauksesta valmistuvat, valituille klooneille haetaan niiden perusteella Evi-rasta rekisteröintiä metsänviljelyaineistoksi joko alustavasti testattuina – tai myöhemmin, tulosten valmistuttua, testattuina – klooniyhdistelminä. Mikäli massamonistettavien perheiden tuotanto toteutuu, Metla hakee myös niiden rekisteröintiä. Metsänviljelyaineistoksi rekisteröidyt linjat voidaan sulattaa kryosäiliöstä ja toimittaa edelleen lisättäväksi kaupallisiin tarkoituksiin.

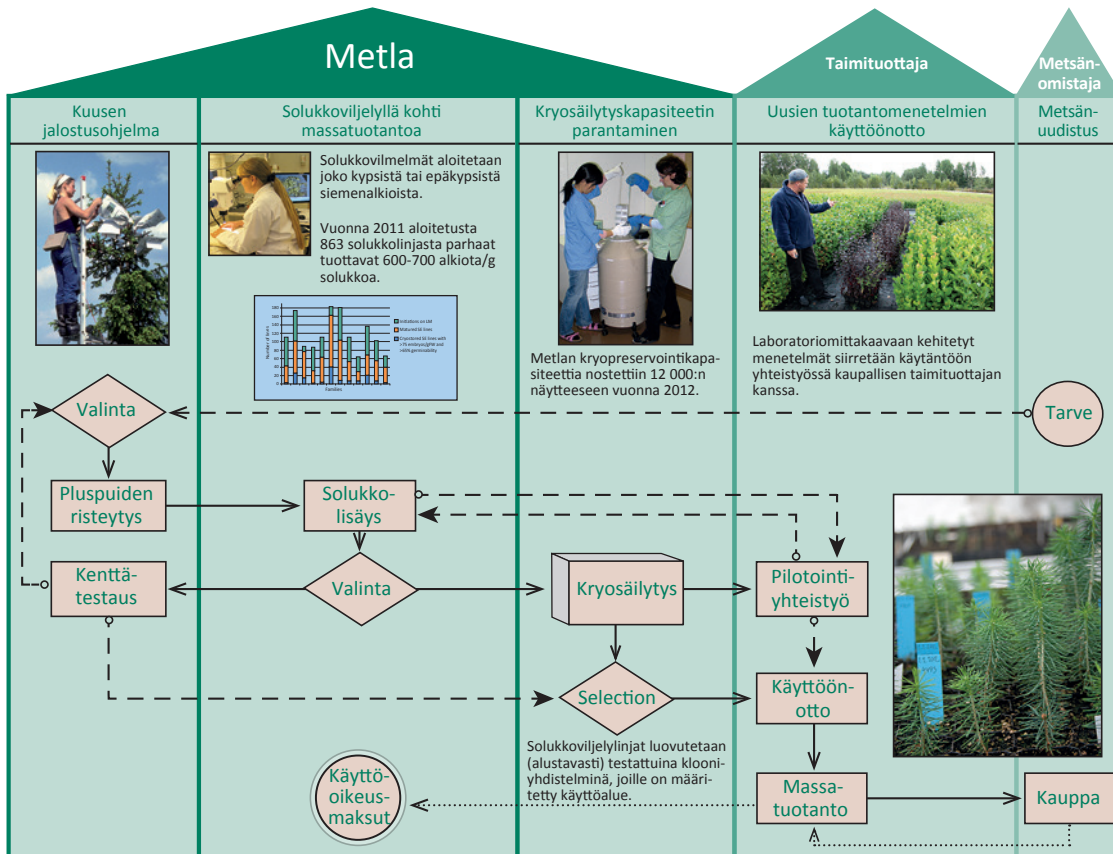
Myös **viherrakentamiseen** ja koristekäyttöön tuotetut erikoismuotolinjat testataan ulkokasvatuksessa. Testausmenetelmä vaihtelee halutun koristeominaisuuden mukaan. Nuorten neulasten punainen väri ilmenee jo ensimmäisenä kasvukautena, mutta erikoisen kasvutavan, kuten kapealatvaisuuden ilmeneminen edellyttää useampivuotista kasvatusta ulkona.

### 3.6 Testatut solukkolinjat käyttöön kasvullisen lisäyksen materiaalipalvelun kautta

Tällä hetkellä Suomessa ei solukkoviljellä havupuita kaupallisiin tarkoituksiin. Solukkoviljelyyn kehitetyt ja testatut aineistot ovat Metlassa. Myös suomalaisten havupuiden solukkolisäykseen liittyvä osaaminen on keskittynyt Metlaan, jatkossa Lukeen, Punkaharjun solukkoviljelylaboratorioon. Aineisto on tuotettu kansallisin varoin ja siksi siitä saatavat hyödyt olisi saatava mahdollisimman monipuolisesti käytännön taimituotannon käyttöön.

Aineistoa on suunniteltu tarjottavaksi Metlan kasvullisen lisäyksen materiaalipalvelun kautta. Palvelunkehitystyötä on tehty yritys-tutkimuslaitosyhteistyössä toteutettuina pilotteina viherrakentamiseen ja koristekäyttöön tuotetuilla linjoilla. Palvelumuotoilussa tärkeinä tavoitteina on pidetty potentiaalisten asiakkaiden tasa-arvoista kohtelua, lisäysselokun laatua ja lisättävyyttä, osaamisen jouhevaa siirtämistä tutkimuslaboratoriosta käytännön taimituotantoon.





Kuva 3.3. Prosessikaavio kasvullisen lisäyksen materiaalin tuotannosta ja eri toimijoiden roolit.

Toistaiseksi Metlan tarjoama palvelu sisältää kolme osiota: (i) testatun ja laadukkaan solukon, (ii) erinomaiseksi todettujen ja haluttujen linjojen ylläpito- ja pitkäaikaissäilytyspalvelun sekä (iii) konsultoinnin ja tiedon siitä, kuinka solukko saadaan kasvamaan taimiksi. Kaikille asiakkaille tarjotaan samoin periaattein testatut ja valitut linjat. Lisäyssopimukset ja sopimukset linjojen käyttöoikeuksista tehdään myös kaikkien asiakkaiden kesken samoin periaattein. Konsultointi voidaan kuitenkin räätälöidä asiakkaan tarpeisiin sopivaksi. Räätälöitäviä tuotteita voivat olla esim. koulutukset, lisäkonsultointi, muokatut reseptit, menetelmäkehitykseen liittyvät testaukset.

Tällä hetkellä materiaalipalvelun kautta voidaan tarjota viherrakentamiseen ja koristekäyttöön tuotettuja linjoja, sillä laki ei edellytä tältä aineistolta pitkää kenttätestausta. Aineiston kaupallistamisen suunnittelussa on ajateltu myös uuteen tuotantomenetelmään siirtymisen riskejä ja kannattavuutta. Koristekäyttöön tuotetun taimen hinta taimimarkkinoilla on metsänviljelytaimen hintaa suurempi ja näin ollen on ajateltu erikoismuotolinjojen sopivan uuden teknologian käyttööntöväiheeseen. Kokemusten karttuessa menetelmien kustannustehokkuutta voidaan parantaa ja korvata käsityövaltaisia työvaiheita automaatiolla.

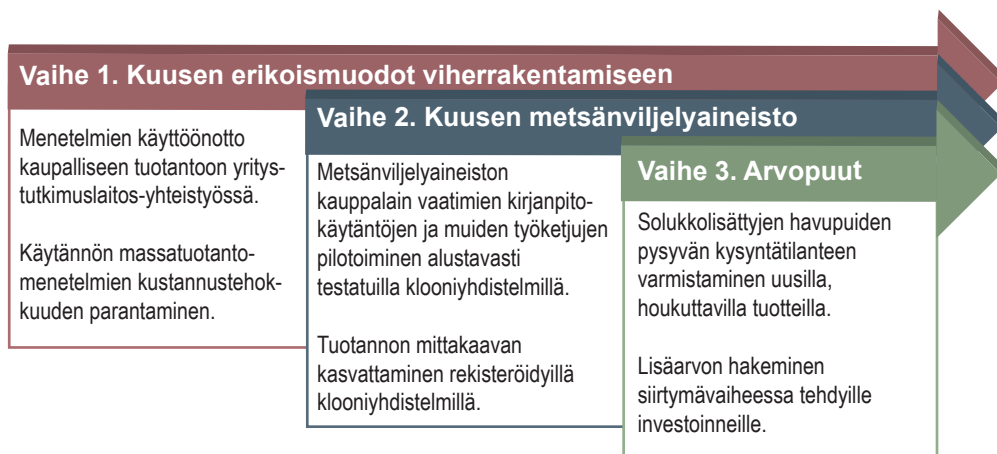
Kun menetelmät on saatu kustannustehokkaiksi ja riittävä määrä linjoja on saatu testattua ja rekisteröityä, voidaan siirtyä solukkoviljelymateriaalin kaupallistamisen toiseen vaiheeseen, metsänviljelyaineiston tuottamiseen. Kauempana tulevaisuudessa voidaan solukkolisäysmenetelmillä tuottaa arvopuuta, joilla hyvän kasvun ja kasvinterveyden lisäksi on muita arvokkaita laatuominaisuuksia. Esimerkkinä arvopuista mainittakoon korkean stilbeenipitoisuuden johdosta luontaisesti lahonkestävää sydänpuuta tuottava mänty, joiden tuotantomahdollisuuksia tutkitaan parhaillaan.



### **Kasvullisen lisäyksen materiaalipalvelun asiakaslupaus**

- *Lisäysselukko*
  - *Tuoreustakuu, taimituottajalle toimitettava selukko on tuoretta*
    - *alkiontuottokyky on testattu*
    - *kryopreservoitavuus on testattu,*
    - *vakuutus siitä, että selukko ei ole pilaantunut ylläpidon ja kryosäilytyksen aikana*
  - *Takuuvarmasti sovittua linjaa / yhdistelmää*
    - *valikoitu parhaimmistosta*
    - *linja tai yhdistelmä soveltuu todistetusti selukkoviljelyyn*
    - *kenttätestattu, rekisteröity (metsänviljelyaineisto)*
    - *ominaisuuksien ilmeneminen ja pysyvyys testattu (erikoismuodot)*
    - *linjat tunnistettavissa DNA-markkereilla*
- *Selukon ”varmuuskopiointi” ja ylläpitopalvelu*
  - *Lupaus siitä, että lisäysaineistoa on jatkossakin saatavilla kysynnän tarpeen mukaan*
- *Lukesta löytyy tieto, kuinka selukko saadaan kasvatettua taimiksi*
  - *Luken asiantuntija auttaa asiakasta onnistumaan, asiantuntija käy asiakkaan tiloissa näyttämässä jokaisen työvaiheen erikseen, asiantuntijan avustuksella voidaan soveltaa ohjeita taimituottajan tuotantoympäristöön*
  - *Tuotekansio ”käyttöohje” – työohjeet eri vaiheisiin, muu materiaali*

Materiaalipalvelu on edelleen pilotointivaiheessa ja sitä kehitetään Punkaharjun selukkoviljelylaboratoriossa. Kehitystyöhön kaivataan lisää pilotointikumppaneita ja selukkoviljelylaboratorion tutkimushenkilökunta toivoo yhteydenottoja kiinnostuneilta kumppaneilta.



**Kuva 3.4.** Solukkotaimien markkinoille viennin kolmiportainen malli (Taimiuutiset 2/2013).

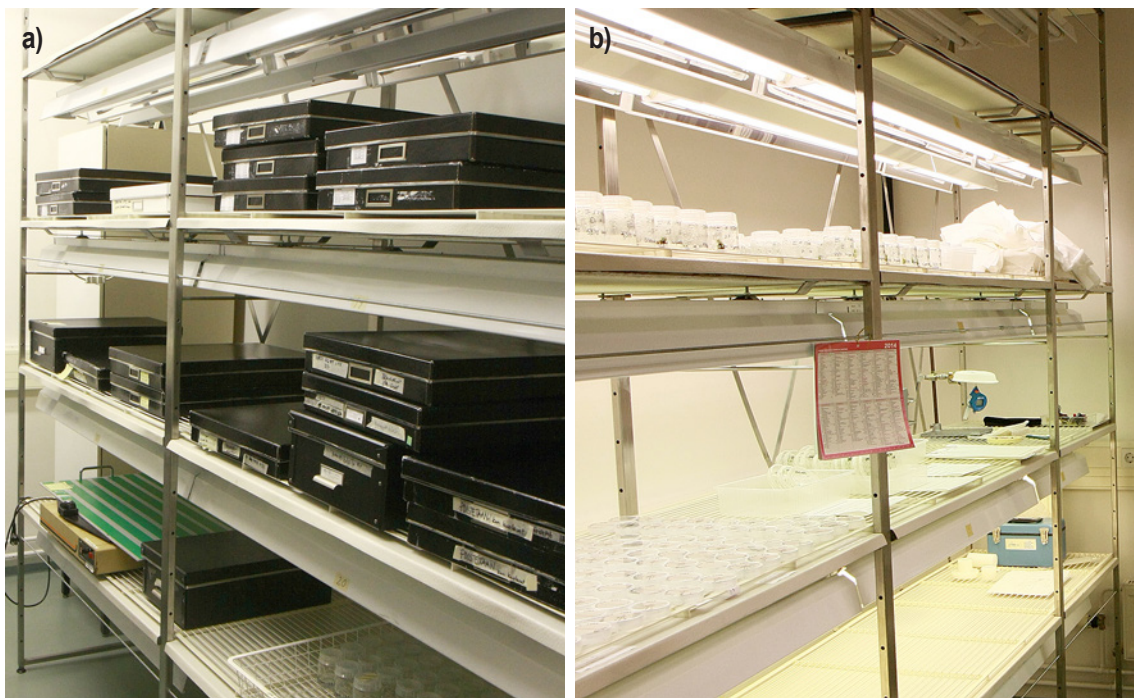
## 4 Solukkoviljelylaboratorion perustaminen

### 4.1 Tilat

Solukkoviljelylaboratorion tilavaatimukset eivät välttämättä ole kooltaan suuret, mutta tietyt perustoiminnot tiloihin olisi saatava mahtumaan. Tilojen ja pintojen tulisi olla helposti siivottavat, ja kun tilaa kaikille laitteille ja toiminnoille on riittävästi, myös siivous on helppoa. Myös hyvään ilmanvaihtoon, ja tarvittaessa ilmastointiin, on syytä kiinnittää huomiota. Varsinaisen laboratorion lisäksi on työntekijöille varattava tila, jossa voi peseytyä ja vaihtaa vain laboratoriossa käytettävät vaatteet ja jalkineet.

Jos mahdollista, erityyppiset toiminnot olisi hyvä jakaa eri tiloihin, tai keskittää samanlaiset toiminnot tiettyyn osaan tilasta. Esimerkiksi likaisten tavaroiden tiskaus ja tarvikkeiden sterilointi olisi hyvä erottaa niin sanotusta puhdastilatyöskentelystä, joko erilliseen huoneeseen tai isomman tilan eri osiin. Puhdastilassa keskitytään solukkolinjojen käsittelyyn välttäen bakteerien tai sienien pääsyä viljelmiin.

Solukkolinjat vaativat kasvaessaan pimeän tilan, jonka voi saada aikaan erillisellä pimeähuoneella. Toisaalta valoa läpäisemättömät *laatikot* voivat olla hyvä vaihtoehto erilliselle pimeänä pidettävälle huoneelle. Juurrutettavat alkiot sen sijaan tarvitsevat valoa, ja siihen erillinen kasvatushuone hyllyihin kiinnitettyine *kasvilamppuineen* on tärkeä. Kasvatushuoneiden ja laatikoiden lämpötila ei saisi vaihdella kovin paljoa, joten esimerkiksi kesähelteillä ilmastointilaitte olisi hyvä olla käytettävissä. Huoneiden lämpötilaa on syytä tarkkailla päivittäin. Valaistuksen yö/päivä säädetään ajastimen avulla, ja valon määrää voidaan rajoittaa kasvatuksen alussa esimerkiksi asettamalla juurrutettavien alkioiden päälle harsoja.



**Kuvat 4.1.** Kasvatushuone **a)** solukkoviljelmien säilytykseen pimeässä ja **b)** kasvatushuone alkioiden juurrutukseen valoisassa. Kuvat Lassi Palmujoki.

Varastotilaa on myös syytä varata, kuten myös hyllyjä, kaappeja ja vetolaatikoita itse laboratorio-tilaan. Työtasoja on oltava riittävästi, ja niiden, kuten myös muun tilan, pintamateriaalien on oltava kestäviä ja helposti puhdistettavia. Lattia ei saa olla liukkaasta materiaalista, ja muutenkin työturvallisuusseikkoihin on hyvä paneutua laboratorion perustamista suunniteltaessa.

## 4.2 Laitteet ja käyttötavara

Yksi tärkeimmistä, ja kallein, laitehankinta on *autoklaavi*. Se on eräänlainen höyrypaine kattila, jonka toiminta perustuu korkeaan lämpötilaan, riittävään käsittelyaikaan, ylipaineeseen sekä kylmään vesihöyryyn. Sillä steriloidaan kaikki käytettävät välineet ja liuokset, eli tuhoetaan niistä mm. bakteerit ja homeet. Sitä ennen tarvikkeet pestään laboratoriokäyttöön soveltuvassa *astianpesukoneessa*. Pesun jälkeen, ennen autoklavointia, tavarat pitää kuivata joko ajan kanssa, koneellisesti tai käsin pyyhkimällä. Kuivauksen jälkeen tavarat laitetaan autoklavoinnin kestävään, tiiviisti suljettavaan *autoklaavipussiin*. Pussi on toiselta puolelta muovia ja toiselta puolelta vesihöyryn läpäisevää paperia. Pussi suljetaan *vakuumilaitteen* avulla. Väliaikaisesti tavaroiden sterilointiin voidaan käyttää myös *lämpökaappia*, johon saadaan vähintään 120°C:a neljän–kuuden tunnin ajaksi, mutta joka tapauksessa tarvittavat liuokset on steriloitava autoklaavissa.

Tutkimuslaboratorioissa solukkoviljelyssä käytettävä vesi puhdistetaan kaksivaiheisesti sekä tislamalla, että suodattamalla se ionivaihtopatruunoiden läpi. *Vedenpuhdistuslaitteistot* ja niihin vuosittain vaihdettavat osat ovat melko kalliita, ja hyvälaatuinen, vähän epäpuhtauksia sisältävä vesijohtovesi voi soveltua käytettäväksi joko sellaisenaan tai vain tislattuna.

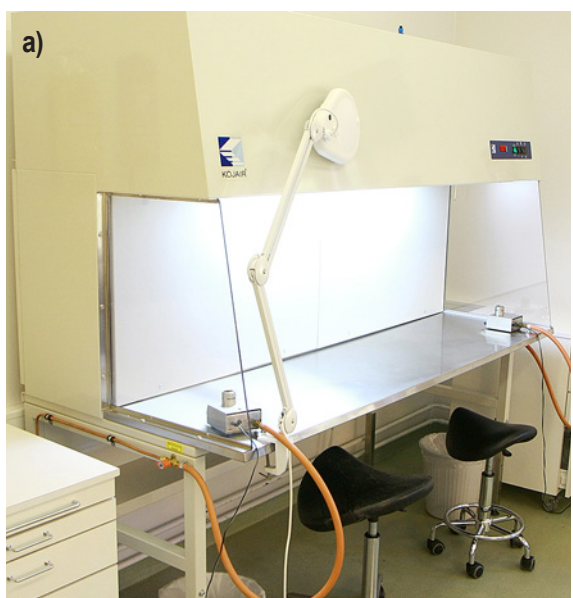


Kuva 4.2. a) Vedenpuhdistuslaite ja b) autoklaavi. Kuvat Lassi Palmujoki.



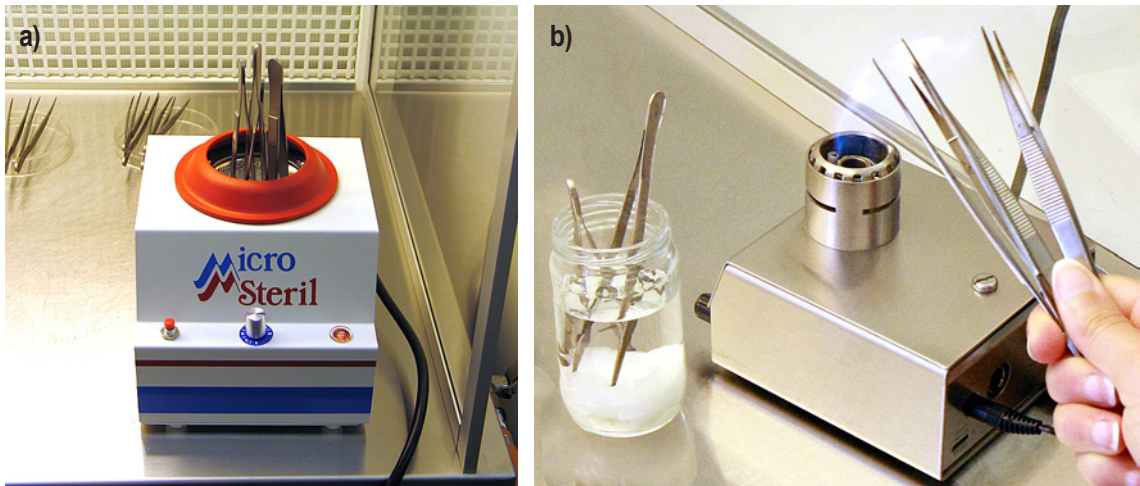


**Kuva 4.3.** Pientarvikkeet autoklavoidaan kuumentamalla suljettavissa pusseissa. Kuva Lassi Palmujoki.

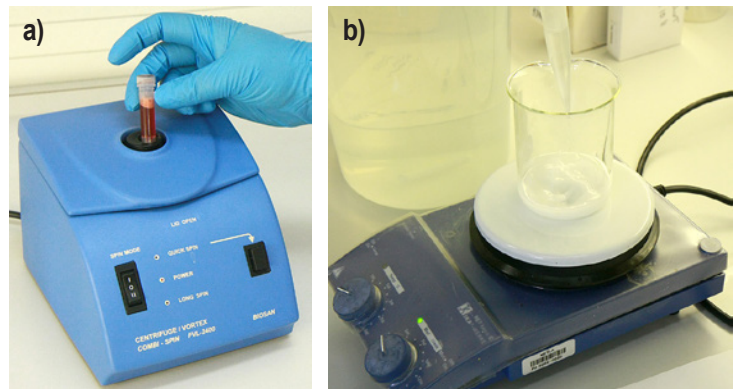


**Kuvat 4.4.** Vaakavirtauslaminaareja ja kaasuletkun päässä olevat bunsenliekittimet. **a)** Kahden hengen laminaarissa myös pöytätasoon kiinnitettävä luuppilamppu, **b)** yhden hengen laminaarissa stereomikroskooppi. Kuvat Lassi Palmujoki.

Solukkolinjojen käsittely tapahtuu ns. *vaakavirtauslaminaarissa*. Vaakavirtauslaminaari puhaltaa suodattimilla puhdistettua ilmaa laminaarista ulospäin, niin että mahdolliset huoneilmassa olevat bakteerit ja homeitiöt eivät pääse laminaariin. Laminaarissa on oltava välineiden puhdistusta varten mahdollisuus käyttää *bunsenliekkiä*, joko irrallisella kaasusäiliöllä tai kiinteällä kaasuyhteydellä. Työvälineet, kuten pinsetit, käytetään ensin etanolissa ja etanoli poltetaan pois liekittämällä bunsenliekissä. Vaihtoehtoisesti välineiden puhdistukseen työn aikana voi käyttää *helmihaudetta*, jossa pienet lasihelmet kuumennetaan 200 °C asteeseen niin, että lika ja bakteerit pinseteissä ja muissa välineissä palavat pois kuten liekitettäessä. *Stereomikroskooppi* tai *luuppilamppu* helpottaa viljelmien käsittelemistä erityisesti alkioiden poimintavaiheessa.



**Kuva 4.5. a)** Pinsettejä helmihauteessa. **b)** Välineiden sterilointia alkoholilla ja bunsenliekillä. Kuvat Lassi Palmujoki.



**Kuva 4.6. a)** Putkisekoittaja. **b)** Lämpölevyllä varustettu magneettisekoittaja. Kuvat Lassi Palmujoki.

Kasvatusalustojen valmistuksessa tarvitaan *pipettejä*, joilla voidaan mitata liuoksia 0,5  $\mu$ l – 5 ml tarkkuuksilla. Myös erikokoisia *mittalaseja* ja *-pulloja* tarvitaan. Kasvatusalustaliuoksen pH on tarkistettava *pH-mittarilla*. Kiinteiden aineiden mittaamiseen tarvitaan *spaatteleita* tai *lusikoita*, sekä *vaaka* jonka mittaustarkkuus on vähintään 0.01 g. *Lämpölevyllä varustettu magneettisekoittaja* on hyvä liuoksen sekoittamiseen niin, että kiinteät aineet liukenevat kunnolla. *Putkisekoittaja* eli vortex on hyvä kun sekoitetaan pienen purkin tai putken sisältö ennen kuin sieltä pipetoidaan haluttu määrä nestettä.

Liuosten ja niiden ainesosien säilytykseen tarvitaan *pakastin* sekä *jääkaappi*, *lukittavat* kuiva-aine- ja alkoholikaapit kuuluvat myös laboratorion varustuksiin. Jos kasvatusalustoja tehdään käsityönä suuria määriä kerrallaan, liuoksen annosteluun voi hankkia *pumppuannostelijan*, joka jalan polkaisulla tai kevyellä käden painalluksella annostelee tietyn määrän liuosta. Kasvatusalustojen valmistuksessa voidaan myös hyödyntää automatiikkaa: saatavilla on laitteistoja, jotka sekä steriloiivat kasvatusalustan että annostelevat sen valmiiksi merkittyihin kasvatusastioihin kuten petriimaljoihin.

Alkion kypsytysvaiheen aloitus ja / tai solumassan tehokasvatus on suositeltavaa tehdä ns. vesi-imulaitteella, jossa erikoisvalmisteisessa *kartiopullossa* on mansetin tukemana ns. *Büchner-suppilo*. Kartiopullo liitetään haaroitetun vesipisteen sivuhaaraan *muoviletkulla*, ja kun veden anne-

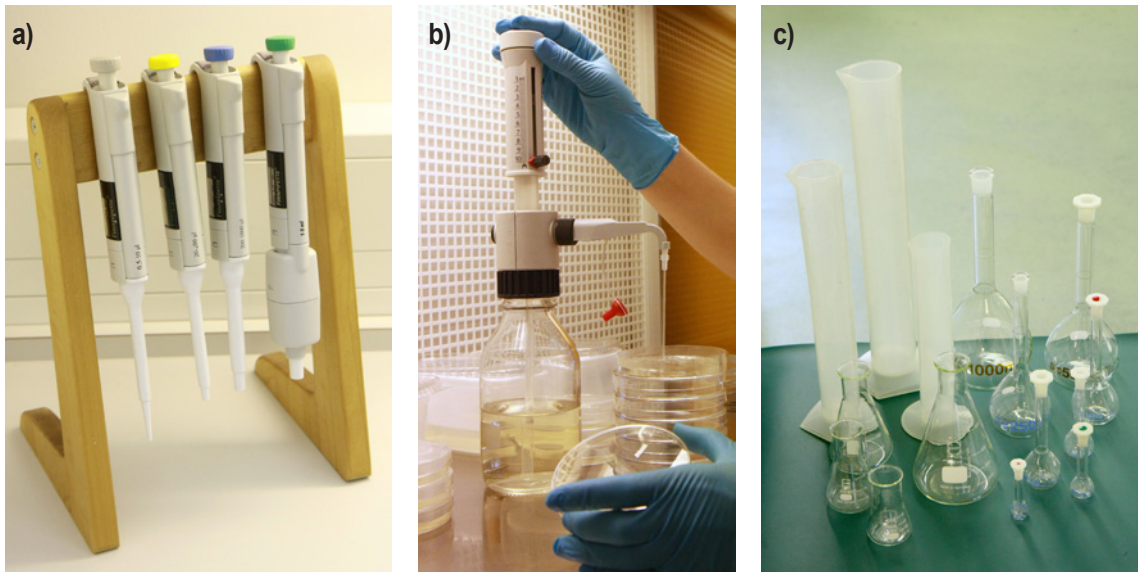


taan valua, muodostuu kartiopulloon alipaine, joka imee nesteen suppilossa olevan steriloidun, kertakäyttöisen *suodatinpaperin* läpi pulloon. Vesi-imulaitteessa suositellaan käytettäväksi Whatmanin suodatinpapereita numero 2. Numero kertoo filteripaperin läpäisykyvystä, ja numero 2 on todettu parhaaksi solukkoviljelyssä, jossa ravinteiden pitää imeytyä filtringin läpi solujen käyttöön.

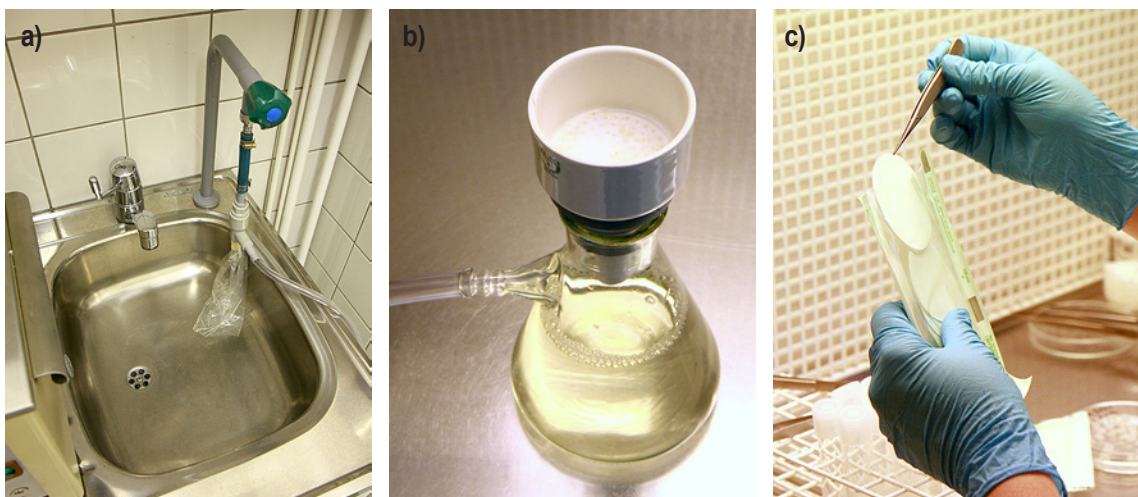
Laitteiden toimintavarmuutta ja käyttöikää lisäävät niille määräajoin tehtävät *huollot*. Laitteiden ja laboratorion pientarvikkeiden toimittajia on useita, mm. Labnet Oy, Sarstedt Oy, VWR International. Hintavertailua ja kilpailutusta kannattaa harrastaa säännöllisesti.



**Kuva 4.7. a)** Alustan pH mitataan ja säädetään tarvittaessa miedolla hapolla tai emäksellä. **b)** Vaako- ja kiinteiden aineiden punnitsemiseen. **c)** Automaattinen alustanvalmistuslaitteisto: oikealla alustaliemen autoklaavi eli sterilointilaitte, keskellä printteri jolla saadaan teksti maljan kylkeen ja vasemmalla maljojen täyttöyksikkö. Kuvat Lassi Palmujoki.



**Kuva 4.8. a)** Pipettejä nestemäisten aineiden annosteluun. **b)** Käsikäyttöinen pulloon liitettävä annostelija. **c)** Lasi- ja muovitavaraa. Kuvat Lassi Palmujoki.



**Kuva 4.9. a)** Vesi-imulaitteen letku kiinnitetään soveltuvaan vesihanaan. **b)** Vesi-imuletkuun liitetty kartiopullo, Büchner-suppilo ja sen sisällä oleva suodatinpaperi. **c)** Kertakäyttöiset suodatinpaperit steriloidaan autoklaavissa. Kuvat Lassi Palmujoki.

### 4.3 Kulutustavarat

Aseptinen työskentely vaatii jonkin steriloivan aineen käyttöä, halvin ja turvallisin on etanoli. Etanolia toimittaa Altia, mutta sen käyttö vaatii luvan, jossa määritellään kuinka sitä on säilytettävä (lukitussa kaapissa) ja kuinka käytön kirjanpito on hoidettava. Denaturoimattomien ja lievästi denaturoitujen etanolien (Altian nimikkeet NatuClear ja Etax) käyttö lupiin ja valvontaan liittyvistä asioista (esim. maksuista) lisätietoja antaa Valvira.

Kasvatusalustoihin käytetään erilaisia kemikaaleja, kuten kivennäisaineita, vitamiineja sokeria, yms. Niitä voi ostaa usealtakin toimittajalta, joista Suomessa toimivat mm. VWR ja Sigma-Aldrich. Monia eri kasvilajien solukkoviljelyssä käytettyjä kasvatusalustoja voi myös ostaa valmiina kivennäisaineet ja vitamiinit sisältävinä seoksina, joihin tarvitsee lisätä vain vesi, sokeri ja kasvi-



hormonit. Valmiitakin kasvatusalustoja on saatavilla, niitä valmistaa esim. Duchefa. Hintavertailua ja kilpailutusta on syytä tehdä myös kemikaalien hankinnassa.

Useasta kemikaalista valmistetaan erilaisia laatuja erilaisilla puhtausasteilla, solukkoviljelyssä riittää esimerkiksi  $\geq 98$  % puhtausaste, jolloin tuote voi olla huomattavasti halvempi kuin  $\geq 99$  % puhtausasteen tuote. Kemikaaleja tilatessa ja käytettäessä on syytä tutustua niiden käyttöturvallisuustiedotteisiin, joissa kerrotaan niiden turvallisuudesta, käytöstä, säilytyksestä ja vanhentuneiden kemikaalien hävittämisestä. Kemikaalit on säilytettävä käyttöohjeen mukaan joko huoneenlämmössä, jääkaapissa tai pakastimessa. Purkin kylkeen on hyvä kirjoittaa milloin se on tullut ja milloin purkki on avattu, näin tiedetään poistaa vanhentuneet aineet. Kasvatusalustat tehdään esimerkiksi kaupasta tai tukusta saataviin *kertakäyttöpakasterasioihin*, tai ns. *petrimaljoille*.

Kasvavan solumassan käsittelyyn tarvitaan *pinsettejä*. Niitä löytyy erilaisia malleja, joista jokainen voi valita itselleen sopivimmat. Yleensä pinsettejä on käytössä lyhyttä ja pitkää mallia, esimerkiksi n. 13 ja 18 cm pitkiä. Jos kasvatusalustat on tehty petrimaljoille, kietaistaan sen ympärille pätkä parafiinia (Parafilm® M), joka on muovista valmistettu, venyvä ja kaasuja läpäisevä materiaali. Se estää maljoja avautumasta liikuteltaessa ja bakteerien tai muiden haitallisten eliöiden pääsyn maljalle.

Alustojen valmistuksessa käytettäviin *pipetteihin* tarvitaan lisäksi muovisia *irtokärkiä*. Jotkin kasvatusalustan ainesosat, kuten L-glutamiini, tuhoutuvat yli yli +60 asteessa, joten ne on autoklavoinnin jälkeen, nesteen jäähdytyttyä lisättävä alustaliemeen kertakäyttöisillä *ruiskuilla* ja niihin kiinnitettävillä *steriilisuodattimilla*.



**Kuva 4.10. a)** Eri valmistajien ja maahantuojien kemikaaleja. Kuva Lassi Palmujoki. **b)** Parafilmiä käytetään petrimaljojen sulkemiseen. Kuva Timo Kilpeläinen

#### 4.4 Osaaminen

Solukkoviljely vaatii toisaalta erikoisosaamista ja kokemuksen kartuttamaa tietoa esimerkiksi alkioiden kasvusta, toisaalta itse tekninen suorittaminen ei vaadi kuin hiukan sorminäppäryyttä. Solukkoa käsiteltäessä tärkeintä on erottaa tuorein solukko vanhasta, ja alkioiden ”kypsyyden” taso

on hyvä oppia tunnistamaan, jotta itämään saadaan sopivan kehitysasteen saavuttaneita alkioita. Itäneiden alkioiden istutusvaihekin on arvioitava enemmän taimien ulkonäön kuin kalenterin perusteella. Aseptinen työskentely on omaksuttava, ja riskitekijät, kuten etanolin ja tulen käsittely, on tiedostettava. Henkilöstön kouluttamisesta voidaan sopia Luonnonvarakeskuksen kanssa.

On olennaista, että solukkotaimia tuottavassa yrityksessä on ainakin yksi henkilö, joka ymmärtää hyvin koko prosessin. Kun tuotantoa laajennetaan, käyttökelpoista osaamista eri työvaiheisiin voidaan saada lisätyövoiman lyhyaikaisella työssäoppimisella. Henkilöstön kouluttamisesta voidaan sopia Luonnonvarakeskuksen kanssa.

## 5 Kuusen solukkolisäyksen työvaiheet

### 5.1 Aseptisen työskentelyn perusteet

Solukkoviljelmien suojaamiseksi bakteeri- ja sienikasvustoilta on hyvä noudattaa steriilin eli aseptisen työskentelyn periaatteita. Huolellisella aseptisellä työskentelyllä turvataan solukkoviljelmiä myös ristikontaminaatiolta, eli eri kasvatuslinjojen sekoittumiselta. Myös työntekijän turvallisuus otetaan huomioon aseptisesti työskennellessä.

Solukkolinjojen käsittely tapahtuu erillisessä puhdistilassa, esimerkiksi muulta toiminnalta rauhoitetussa tilassa olevassa vaakavirtauslaminaarissa. Laminaarissa käytettävät välineet pestään ensin hyvin, kuivataan ja steriloidaan mieluiten autoklaavilla, jossa paineen ja lämmön vaikutuksesta haitalliset mikrobit kuolevat. Myös tarvittava vesi steriloidaan autoklavoimalla. Steriloinnin onnistumista seurataan tavaroihin kiinnitettävän indikaattoriteipin tai erillisen indikaattoriliuskan (bowie dick-testi) avulla.

Ennen työskentelyn aloittamista työntekijä pukeutuu laboratoriotyöskentelyyn varattuihin vaatteisiin ja kenkiin. Koska työskennellessä käytetään puhdistusaineena ihoa kuivattavaa etanolia, on hyvä käyttää suojakäsineitä, tai suojata kädet suoja-aineella (esimerkiksi Pinline, Würth). Tarvittaessa voi käyttää myös hengityssuojaimia.

Työpäivä aloitetaan laittamalla laminaari päälle, sillä ilmavirtauksen pitää antaa tasaantua n. 30 minuuttia ennen työskentelyn aloittamista. Työskentely aloitetaan pyyhkimällä laminaarin sisäpinnat huolellisesti 70 % etanolilla kastellulla liinalla, paperilla tai pumpulilla. Myös kaikki tarvikkeet, pullot yms. puhdistetaan etanolilla ennen laminaariin vientiä. Pyyhkimiseen tarkoitettu liina kastellaan ensin kauttaaltaan, ja etanolia lisätään esimerkiksi suihkepullosta aina tarvittaessa. Kädet pyyhkitään etanolilla aina kun työskentely aloitetaan ja aika ajoin työskentelyn kuluessa.



**Kuva 5.1.** Laminaari ja siellä olevat tavarat pyyhkitään 70 % etanolilla. Kuva Lassi Palmujoki.

Työskentelyn aikana käsiteltävään kasvisolukkoon ja steriloituihin kasvatusalustoihin kosketaan vain steriloiduilla välineillä.

Laminaarissa käytössä olevia tarvikkeita, esimerkiksi pinsettejä, joudutaan puhdistamaan myös käytön aikana. Se tapahtuu kastamalla ne 96 % etanolissa ja polttamalla kaasuliekissä. Puhdistuksessa on noudatettava varovaisuutta, liekki ei saa polttaa kättä tai alkoholi päästä syttymään! Laminaarin läheisyyteen onkin syytä sijoittaa sammutuspeite. Tarvikkeiden puhdistus tehdään jokaisen käsitellyn solukkolinjan, rasian, tai maljan välillä. Vaihtoehtoisesti voi käyttää myös helmihaudetta. Laminaari puhdistetaan pyyhkimällä sisäpinnat 70 % etanolilla myös ennen sen sulkemista työpäivän päätteeksi.

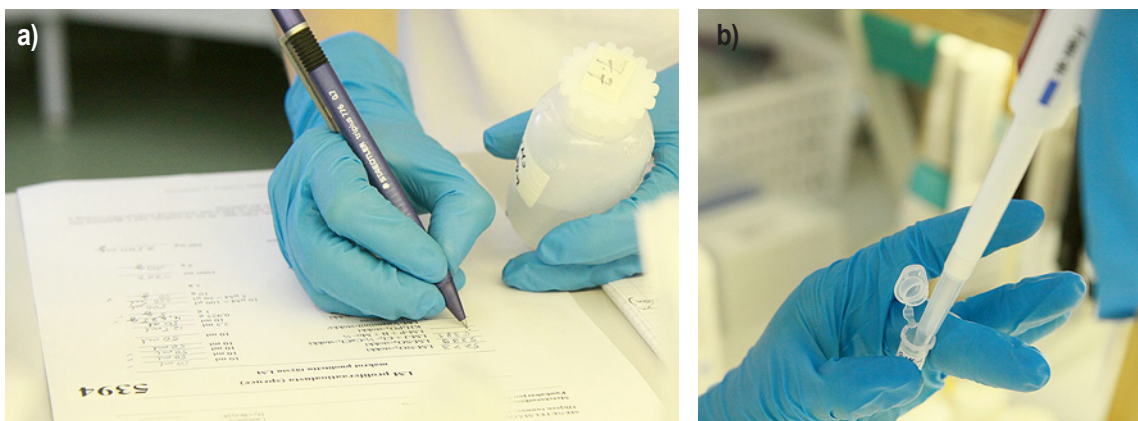
## 5.2 Kasvatusalustojen valmistus

Kasvisolukko tarvitsee elääkseen ja kasvaakseen kasvualustan, jossa on tarpeellinen määrä sokeita, vitamiineja ja kivennäisaineita, sekä kasvuvaiheeseen sopivia hormoneja. Solukon lisäämisvaiheessa kasvualustaan lisätään kasvuhormoneista auksiinia (esim. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) ja sytokiniiniä (esim. BA, 6-Benzylaminopurine). Kun solukosta halutaan kypsyttää alkioidia, vaihdetaan kasvunsäätelijäksi abskissihappo (ABA, (±)-2-Cis-4-trans-Abscisic acid). Alkioiden juurrutus tapahtuu hormonittomalla alustalla. Tarkemmat tiedot alustojen koostumuksesta ovat liitteessä 1.

Kuusen alkiota tuottavaa solukkoa on perinteisesti kasvatettu puolikiinteällä alustalla, mutta myös liemikasvatusta on tutkittu. Kasvatusalustan kiinteyttämiseen on tarjolla erilaisia vaihtoehtoja, joista perinteisin on agar. Jotkin agarit saattavat kuitenkin osittain nesteytyä varsinkin jos kasvatusalustoja pidetään pystyasennossa, kuten alkioiden idätysvaiheessa tehdään. Suositeltava vaihtoehto on Phytigel™ (Sigma-Aldrich), jota käytetään yleisesti havupuiden solukkoviljelyssä. Kasvatusalustat voidaan valaa esimerkiksi pyöreille petrimaljoille (halkaisija 9 cm), 250 tai 500 ml pakasterasioihin, tai vaikkapa salaattirasioihin. Tärkeintä on, että alustat tehdään puhtailta materiaaleilla ja valetaan puhtaisiin astioihin.

Alustan tekoa varten kannattaa tehdä ns. varastoliuoksia, eli liuottaa kiinteät aineet ohjeiden mukaiseen liuottimeen, yleensä veteen. Yhdessä varastoliuoksessa voi olla useita kivennäisaineita ja vitamiineja. Varsinainen kasvatusalusta valmistetaan sitten yhdistämällä ja laimentamalla varastoliuoksia. Alustan tekoa varten varataan riittävän kokoinen astia, johon pipetoidaan tai mitataan mittalasilla tarvittava määrä liuoksia, ja punnitaan ne kiinteät aineet joista ei ole tehty varastoliuoksia, kuten esimerkiksi sokeri. Lopuksi lisätään vettä lopulliseen tilavuuteen ja sekoitetaan hyvin niin, että kiinteät aineet liukenevat kunnolla.

Ennen autoklavointia liuksesta mitataan pH, ja tarvittaessa säädetään laimealla hapolla (esim. suolahappo, HCl) tai emäksellä (esim. natriumhydroksidi, NaOH). Jotkut ainesosat, kuten aminohappo L-glutamiini, hajoavat kuumennettaessa, joten ne on lisättävä liuokseen vasta autoklavoinnin jälkeen. L-glutamiinin liuottamista varten kannattaa ottaa riittävä määrä alustalientä sivuun ennen autoklavointia, sillä lisäys tapahtuu ruiskuttamalla liuos steriilisuodattimen läpi autoklavoituu alustaan.



**Kuva 5.2 a)** Alustaan tarvittavat varastoliuoserät on numeroitu ja käytetyn erän numero siirretään valmistusohjeissa olevan alustan kirjainpöytäkirjaan. Myös valmistettava alustat numeroidaan. **b)** Esimerkiksi hormoneja käytetään pieniä määriä ja mikrolitrat on pipetoitava tarkasti. Kuvat Lassi Palmujoki.

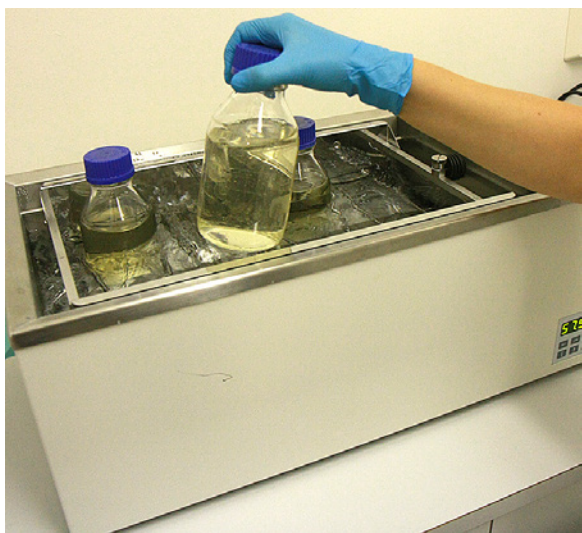




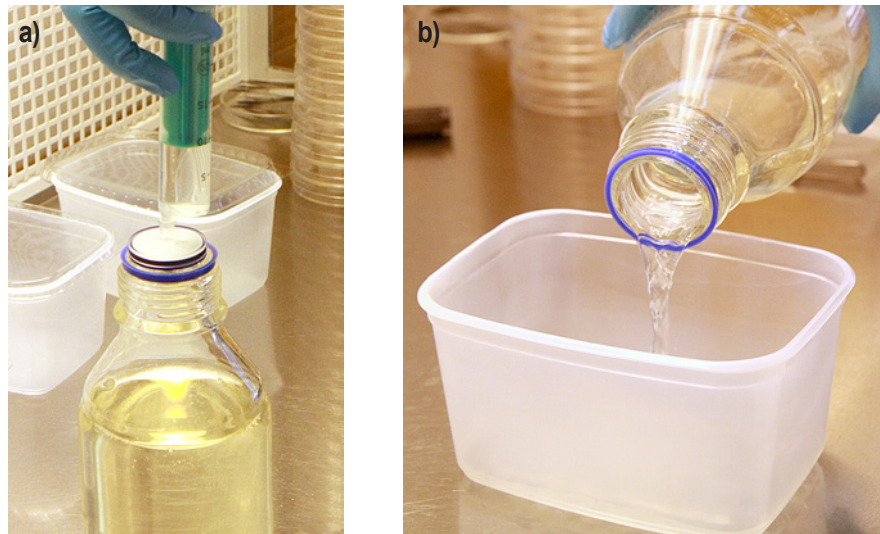
**Kuva 5.3. a)** Osa alustan ainesosista on jauheita ja ne punnitaan analyysivaa'alla. **b)** Kun kaikki ainesosat on lisätty, täytetään astia haluttuun tilavuuteen vedellä. Kuvat Lassi Palmujoki.

Maljojen tai rasioiden valuuun voidaan käyttää automatiikkaa, mutta valaminen onnistuu myös pullostasta kaatamalla, tai käsikäyttöistä annostelijaa käyttäen. Kasvatusalustojen valmistuksesta kannattaa pitää kirjaa, ja esimerkiksi numeroida alustaerät sekä varastoliuokset. Tämä helpottaa seuranta ja esimerkiksi mahdollisesti ilmaantuneen kontaminaation vaikutusten rajaamista, kun tiedetään, mitä alustaerää ja liuoksia on milloinkin käytetty.

Jäähtyneet kasvatusalustat säilytetään hyvin suljettuina pimeässä, kuivassa, viileässä ja mieluiten muovipusseissa kuivumisen ehkäisemiseksi. Jos alustat käytetään alle 2 viikkoa valmistuksen jälkeen, niitä voidaan säilyttää myös huoneenlämmössä. Muutama malja jokaisesta valmistuserästä voidaan viedä lämpökaappiin tai muuhun tilaan jossa on n. +37 asteen lämpötila, jotta mahdolliset kontaminaatiot tulevat esiin nopeammin kuin huoneenlämmössä. Solukon lisäys- ja alkioiden idätysalustat säilyvät käyttökelpoisina n. 2 kk, mutta alkioiden kypsytyshalustan ABA-hormoni on helposti hajoava, ja kypsytyshalustat onkin syytä käyttää mahdollisimman pian. ABA on erityisen herkkä hajoamaan valon vaikutuksessa, joten alustoja ei kannata tehdä ja säilyttää valonlähteen vieressä, mieluummin tulisi käyttää mahdollisimman vähäistä valaistusta valmistuksen aikana.



**Kuva 5.4** Autoklavoinnin jälkeen alustaliemi voidaan jäädyttää tasaisesti lämpöhauteen avulla. Kuva Lassi Palmujoki.



**Kuva 5.5. a)** Aineet jotka eivät kestä kuumennusta lisätään autoklavoinnin jälkeen jäähtyneeseen alustaliemeen steriilisuodattimen läpi ruiskuttamalla. **b)** Alusta voidaan valaa kaatamalla suoraan pullostasta. Kuvat Lassi Palmujoki.

## 5.3 Solukkoviljely

### 5.3.1 Viljelmien aloitus ja säilytys

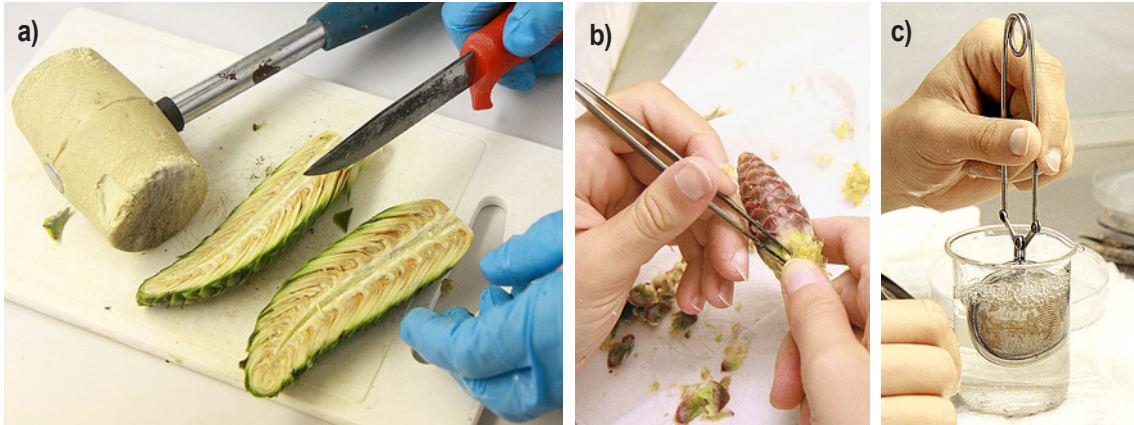
Kuusen solukkolinjojen aloitukset on tehty epäkypsistä siemenistä, jotka saadaan Metsänjalostusohjelman mukaisista risteytyksistä. Myös jatkossa Luonnonvarakeskus hoitaa aloitusten teon testatusta ja valikoidusta materiaalista.

Kävyt kerätään kun lämpösummaa on kertynyt 700–900 (kasvukauden vuorokausien keskilämpötilojen summa, jossa huomioidaan keskilämpötiloista viiden asteen ylittävä osa). Kävyt halkaistaan ja siemenet kerätään petrimaljalle jossa on vähän vettä. Aluksi siemenet pestään lisäämällä veteen tippa asianpesuainetta ja hujuttelemalla maljaa, astianpesuainevesi kaadetaan pois maljan kantta raottaen, tai kaatamalla siemenet teesiivilään tai teepalloon, jonka avulla huuhtelut ja jatkosteriloinnit on helppo tehdä. Pesun jälkeen siemenet huuhdellaan kolme kertaa, jonka jälkeen ne steriloidaan 70 % etanolissa n. 3 minuutin ajan. Steriloinnin jälkeen ne huuhdellaan steriloidulla vedellä.

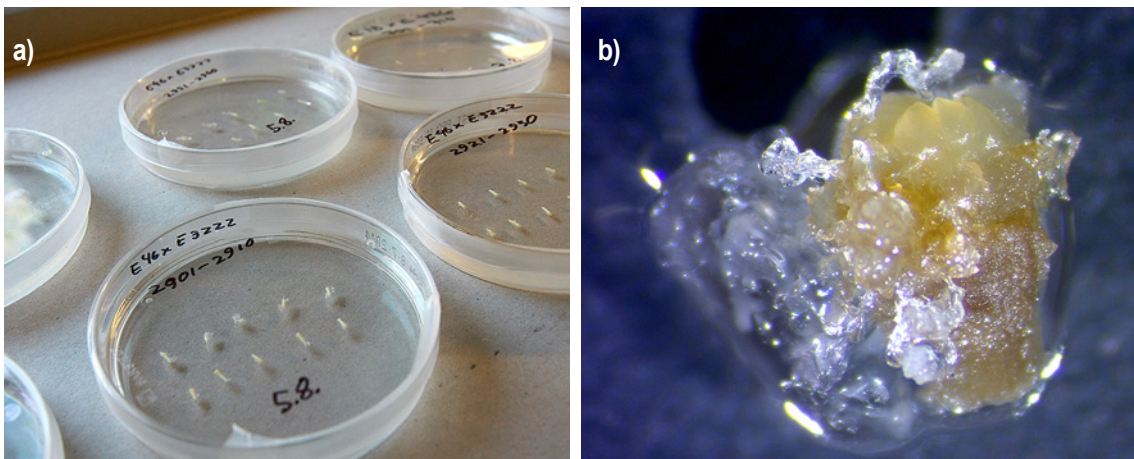
Siemenkuori ja siemenvalkuainen aukaistaan varovasti, ja niiden sisällä oleva kehittyvä siemenalkio siirretään kasvatusalustalle. Tässä vaiheessa stereomikroskooppi tai suurentava luuppilamppu on hyvä apu. Alkioiden annetaan olla pimeässä ja huoneenlämmössä kunnes ne alkavat tuottaa alkiontuottokykyistä eli embryogeenistä solukkoa. Jokainen solukkoviljelmän aloitukseen käytetty siemenalkio saa yksilöidyn numeron. Yhdestä siemenalkiosta kasvanut solukko siirretään omalle uudelle alustalleen, ja edelleen kasvaneesta solumassasta siirretään uusinta kasvustoa tuoreelle alustalle 12–14 vrk välein. Näin yhdestä alkiosta syntyy yksi numeroitu solukkolinja.

Kun solukkoa on kasvanut riittävästi, sitä säilötään kryopreservoimalla eli upottamalla hitaasti jäädytetyt näytteet nestemäiseen tyypeen. Kryopreservoiduista solukkolinjoista sulatetaan näyteerät, tarkoituksena selvittää solukkolinjan kyky selviytyä pakastamisesta, ja selviytyneen linjan kyky tuottaa alkioita. Vain kryopreservoinnin kestävä ja hyvin alkioita tuottava linja säilytetään nestetyypessä taimituotantoa varten.





**Kuva 5.6.** a) Aluksi epäkypsä, etanolilla pyyhitty käpy halkaistaan. b) Siemenaiheet irrotetaan käpysuomujen alta. c) Siemenaiheet steriloidaan etanolissa. Kuvat Lassi Palmujoki.



**Kuva 5.7.** a) Kuusen epäkypsiä siemenalkioita kasvatusalustalla. Kuva Lassi Palmujoki. b) Siemenalkiosta kasvamaan lähtenyt alkiontuottokykyistä solukkoa. Kuva Saila Varis. c) Solukkonäytteet säilötään -196 asteiseen nesteeseen useiksi vuosiksi. Kuva Tuija Aronen.



### 5.3.2 Solukon monistaminen

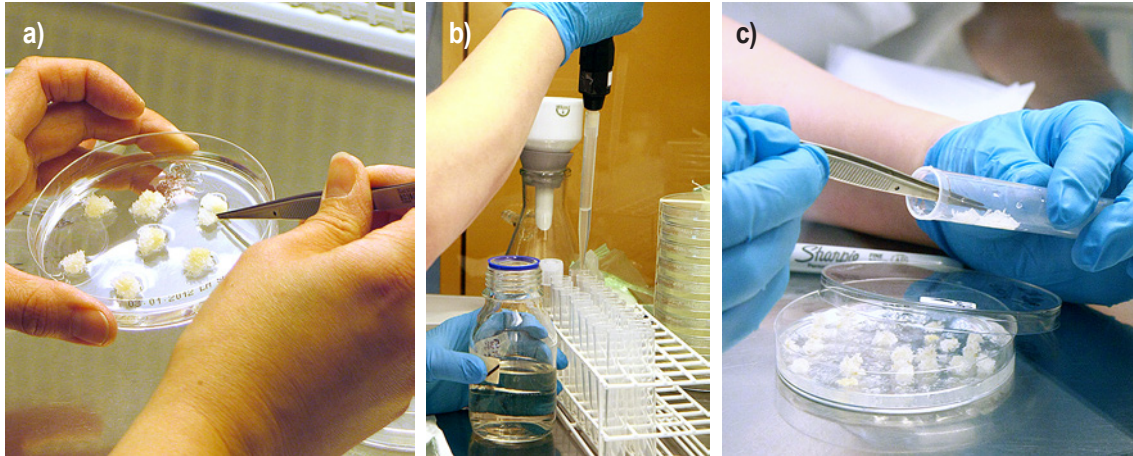
Siirrostuksessa ja muussakin työssä noudatetaan aseptisen työskentelyn periaatteita. Ennen kannen avaamista jokainen kasvatusrasia tai -malja on syytä tarkastaa mahdollisen bakteeri- tai homekasvuston varalta. Saastunutta maljaa ei käsitellä samanaikaisesti puhtaiden kasvustojen kanssa, ja jos siltä yritetään pelastaa solukkoa tai alkioita jotka eivät ole bakteeri- tai homekasvuston kanssa kosketuksissa, se tehdään esimerkiksi päivän päätteeksi.

Kasvuun lähtenyttä solukkoa lisätään siirrostamalla tuoreinta solukkoa uusille kasvatusalustoille 12-14 vrk:n välein. Eri linjat voivat kasvaa eri tahtia, ja joskus siirrostusväli on syytä olla vieläkin lyhyempi. Siirrettävä tuore solukko on valkeaa, ilmavaa ja se irtoaa helposti vanhemmasta solukosta. Oikeanlaisen alkioita tuottavan solukon tunnistaminen vaatii pienen harjoittelun. Yleensä solukkoa kasvatetaan kiinteällä alustalla pieninä paloina, joiden reunoilta tai alta tuorein solukko löytyy. Tämä on kuitenkin käsityövaltaista työtä, ja soveltuu tutkimustyöhön, jossa solumassan määrä / linja on pieni ja linjamäärä suuri. Kaupallisessa tuotannossa linjamäärä on huomattavasti pienempi, mutta solumassaa pitää kasvattaa enemmän / linja.

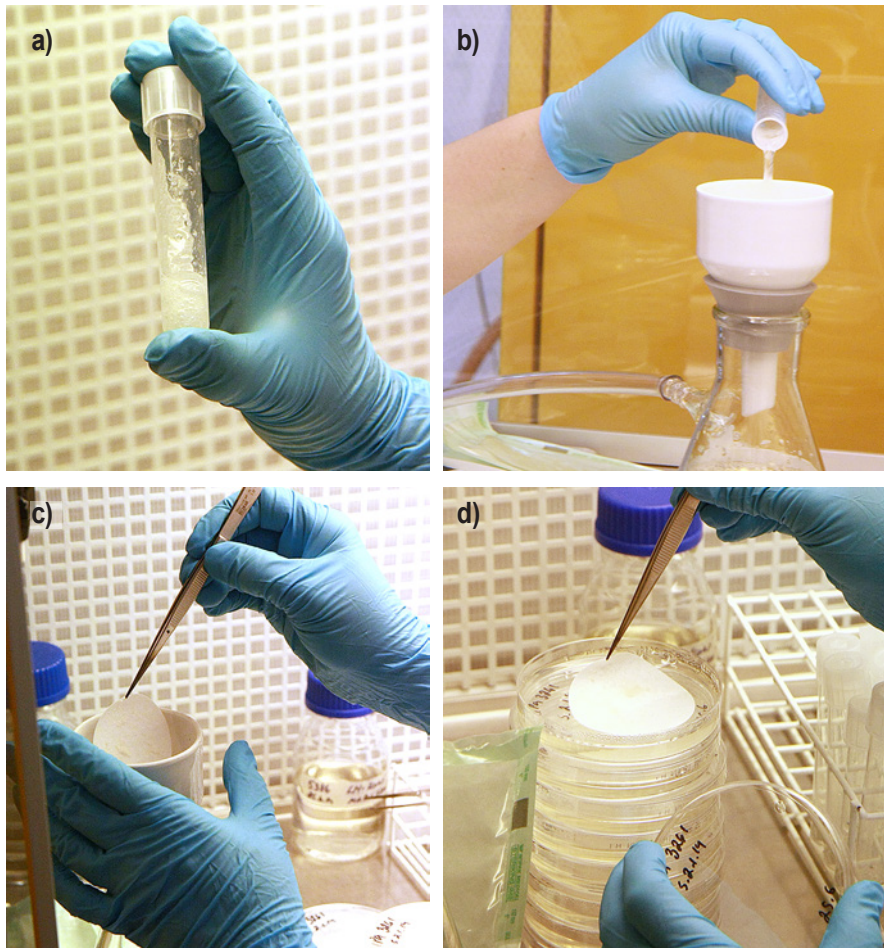
Solukkoa voidaan tehokasvattaa kiinteällä alustalla levittämällä se suodatinpaperille vakuumisuodatuksen avulla ja sijoittamalla suodatinpaperi tuoreelle kasvatusalustalle. Vakuumisuodatus aloitetaan siirtämällä noin 150–200 mg tuoreinta solukkoa putkeen tai purkkiin, jossa on kasvatusalustalientä n. 3 ml. Putkea tai purkkia ravistellaan kevyesti niin että solumassa hiukan hajoaa, jonka jälkeen putken sisältö kaadetaan reiälliseen ns. Büchner-suppiloon jossa on siihen sopiva suodatinpaperi. Suppilo on liitetty mansetin avulla kartiosäiliöön, joka puolestaan on kiinnitetty letkun avulla vesihanaan (kuvat 4.20–4.22). Juoksevan veden vaikutuksesta muodostuva alipaine imee nesteen suppilosta suodatinpaperin läpi alapuoliseen säiliöön, ja suodatinpaperille jää tasainen kerros solumassaa. Suodatinpaperi siirretään kasvatusalustalle, ja lisäystä jatketaan 12–14 vrk:n kuluttua, tai tuorein kasvusto käytetään 5–7 vrk kuluttua siirrostuksesta alkioiden kypsytykseen. Jokaisen solukkolinjan jälkeen büchner-suppilo huuhdellaan steriilillä vedellä ja pyyhitään steriilillä paperilapulla.

Solukkolinjat eivät ole ikuisia, vaan niiden alkiontuottokyky laskee ajan myötä. Eri linjojen välillä on tosin eroja, maailmalla on myös usean vuoden ikäisiä, jatkuvasti uudistettuja linjoja, jotka edelleen tuottavat alkioita. Kun siirrostusvälit pidetään lyhyinä ja olosuhteet ovat oikeat, voidaan hyviä linjoja kasvattaa ja alkioita tuottaa useita kuukausia, jopa vuosia, mutta joku linja saattaa hyvistäkin ponnisteluista huolimatta kuolla muutamassa viikossa.

Kasvisolukkojen tehokasvatukseen on kehitelty myös erilaisia liemikasvatukseen perustuvia ns. bioreaktoreja. Malleja ja valmistajia on monia (esim. RITA®, PlantForm®, SETIS®), mutta yleisimmissä kasvatuslientä annostellaan solukolle tasaisin väliajoin paineilman avulla). Liemen koostumusta vaihtaen kasvatusta voidaan jatkaa nopeasti ja ilman käsityötä seuraavaan vaiheeseen, eli alkioiden kypsytykseen.



**Kuva 5.8. a)** Solukkoa siirretään uudelle kasvatusalustalle pinsettien avulla. Kuva Susanne Heiska. **b)** Steriiliä kasvatusliettä pipetoidaan kertakäyttöisiin koeputkiin. **c)** Solukkoa lisätään liemeen. Kuvat b ja c Lassi Palmujoki.



**Kuva 5.9. a)** Koeputkea ravistellaan. **b)** Koeputken sisältö kaadetaan büchner-suppiloon. **c)** Kasvatusliemi on imeytynyt suodatinpaperin läpi. **d)** Suodatinpaperi siirretään kiinteälle kasvatusalustalle. Kuvat Lassi Palmujoki.

### 5.3.3 Kasvullisten alkoiden kypsytytys ja idätys

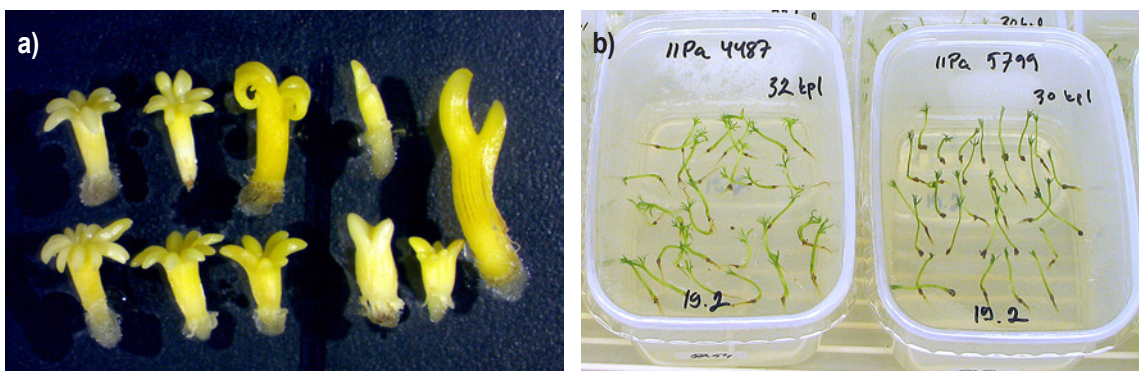
Kasvullisten alkoiden kypsytyksen aloitus, eli maturaatio, tehdään samalla tavalla kuin embryogeenisen solukon tehokasvatuksen aloitus. Tuoreinta eli 5-7 vrk:n ikäistä solukkoa otetaan 150-200 mg putkeen tai purkkiin jossa on n. 3 ml alkoiden kypsytysalustaa liemenä, mutta ilman ABA-kasvihormonia. Putkea tai purkkia ravistellaan napakasti, ja sisältö kaadetaan suppiloon jossa on suodatinpaperi. Vesi-imulaite toimii kun putken neste on levinnyt suodatinpaperille tasaisesti. Muutaman sekunnin kuluttua, kun kaikki näkyvä neste on imeytynyt alapuoliseen säiliöön, suodatinpaperi siirretään suppilosta alkoiden kypsytykseen tarkoitetulle kasvatusalustalle, jossa on ABA-kasvihormonia.

Alkioita kypsytetään pimeässä, huoneenlämmössä linjasta riippuen n. 8 viikkoa. Kypsä alkio on n. 2 mm pitkä ja siinä on kehityksen alussa olevia sirkkalehtiä, ja sen varsi on tasainen. Alkion ulkomuoto kuitenkin vaihtelee linjasta riippuen; toisilla sirkkalehtien alut ovat paksummat ja lyhyemmät kuin toisilla, ja varsi saattaa olla maljamainen, tai hiukan käyrä. Koko saattaa vaihdella linjan sisälläkin, alkio saattaa olla muuten hyvin kehittyneen oloinen, mutta pieni. Paitsi laatu, myös määrä voi vaihdella linjojen välillä, mutta myös linjan sisällä eri maljoilla ja eri kerroilla. Metlassa ja tulevassa Luonnonvarakeskuksessa panostetaan sellaisten solukkolinjojen valintaan, jotka tuottavat laadukkaita alkioita riittäviä määriä kaupalliseen tuotantoon, mutta vaihteluun on silti varauduttava myös itse tuotannossa.

Kypsät alkiot voi siirtää kylmään (n. +4°C) odottamaan idätystä. Alkoiden itämiskyky säilyy hyvänä jopa 6kk säilytyksessä, ja itse asiassa itävyys jopa paranee.

Kypsyneet alkiot siirretään itämään alustalle, jossa ei ole hormoneja. Idätysalustalle voidaan siirtää koko maturaatioalustan sisältö sellaisenaan, tai alkioista valitaan vain parhaimman näköiset. Kummassakin tapauksessa alkiot levitetään idätysalustalle tasaisesti niin, että niillä on tilaa kasvaa.

Alkoiden idätys on hyvä tehdä niin, että valon määrä lisääntyy idätyksen aikana, ja yön pituus on korkeintaan 8 tuntia. Alkioita voi idättää myös jatkuvassa valossa. Valon määrää voi säädellä esimerkiksi harsokankailla, joiden kerrosmäärää juurtuvien taimien päällä vähennetään viikoittain. Alkoiden idätys tapahtuu huoneenlämmössä. Riippuen kasvatusalustan määrästä pakasterasiassa tai maljalla, itävät alkiot on hyvä siirtää n. 4-5 viikon iässä tuoreelle alustalle. Alkoiden annetaan itää kunnes niillä on vahvat, valkoiset juuret ja hyvät tummanvihreät sirkkaneulaset.



**Kuva 5.10. a)** Hyvin kehittyneellä alkioilla on neljä tai useampi sirkkalehden alku, suora varsi ja ehjä juuripää. Oikealla olevien alkoiden kehitys ei ole onnistunut. **b)** Alkioita itämässä. Kuvat Saila Varis.



### 5.3.4 Taimien siirto multa ja kasvihuoneelle

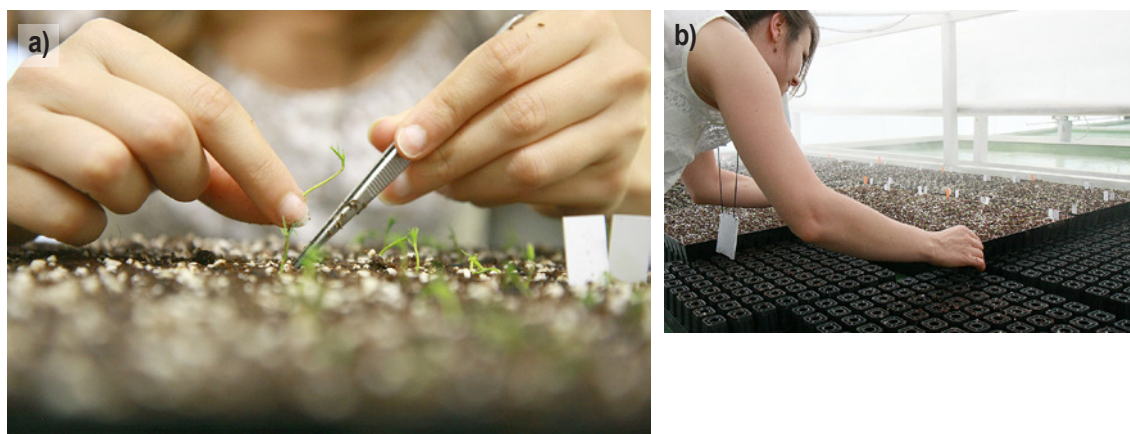
Kun taimille on kasvanut hyvät juuret ja sirkkalehdet, ne istutetaan turpeen ja perliitin seokseen (50:50), tai muuhun hyväksi havaittuun kasvualustaan. Ennen kasvihuoneelle siirtoa taimia voi karaista kasvustasioissaan poistamalla petrimaljojen ympäriltä parafilmin tai tekemällä reikiä rasioiden kansiin. Siirrettäessä taimia täytyy pitää huolta siitä, etteivät ne pääse missään vaiheessa kuivumaan, niinpä kun pakasterasian tai maljan kansi aukaistaan, suihkutetaan tai kaadetaan rasiaan tai maljalle huoneenlämpöistä vettä niin, että taimet peittyvät. Turvealustaan tehdään kolo esimerkiksi pinseteillä, ja taimi asetellaan koloon varovasti niin että juuret varmasti peittyvät. Apuna käytetään pinsettejä, mutta on varottava puristamasta tai muuten vahingoittamasta herkkiä taimia. Työpisteen tulee olla hyvin valaistu, mutta valonlähde pitää olla sellainen, ettei se tuottamallaan lämmöllä polta taimia.

Istutettuja taimia suihkutellaan usein työn aikana, ja valmis kennosto viedään kasvihuoneeseen tai sen osaan, jossa on korkea, n. 90 % ilman suhteellinen kosteus. Ilmankosteutta alennetaan tasisesti ensimmäisen viikon jälkeen.

Valon määrä ei saa olla kasvihuoneella pienempi kuin se oli taimia idätettäessä, ja päivän pituuden olisi oltava vähintään yhtä pitkä kuin idätystilassa. Näin varmistetaan, ettei taimi ala tehdä päätesilmua kasvihuoneella.

Myös lämpötilan olisi hyvä olla sama kuin maljalla idätettäessä, ainakaan se ei saisi nousta kovin korkealle. Istutusta lämpiminä kesäkuukausina tulisi välttää.

Taimien siirto pois suljetuista astioista ja kasvustalustalta, jossa sokerit ja muut kasvuun tarvittavat ainekset ovat helposti saatavilla, on niille iso stressi. Tämä vaihe onkin kasvatuksen ehkä kriittisin vaihe, ja sen onnistumiseen kannattaa kiinnittää huomiota.



**Kuva 5.11. a)** Itäneet pikkutaimet istutetaan hellävaroen turpeen ja perliitin seokseen. **b)** Taimikennostot pidetään ensimmäisinä päivinä istutuksen jälkeen tilassa, jossa ilman suhteellinen kosteus on n. 90 %. Kuvat Lassi Palmujoki.



## 6 Kirjallisuutta ja lisätietoa aiheesta

### 6.1 Aiheesta suomeksi kirjoitettua

- Aronen, T. 2011. Kasvullisen lisäyksen mahdollisuudet havupuiden taimituotannossa. *Metsätieteen aikakauskirja* 1/2011: 53–59.
- 2011. Erikoismuotojen lisäysmenetelmät. Julkaisussa: Nikkanen, T. & Velling, P. (toim.). *Metsäpuiden erikoismuodot - koristepuita viherrakentamiseen*. Metsäkustannus Oy, Helsinki. s. 92–117.
- 2013. Siemenalkioita monistamalla lisää kuusen jalostettua metsänviljelyaineistoa - katsaus metsäpuiden kasvullisen lisäyksen hankkeeseen. *Taimiuutiset* 1: 13–15.
- 2014. Tulevaisuuden metsänviljelyaineistot viettävät 10 vuotta syväjäässä. *GeeniVarat. Kansallisten geenivaraohjelmien tiedotuslehti* 2014: 6.
- Haapala, T. & Niskanen, A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. VAPK-Kustannus, Helsinki. 93s.
- Heiska, S. 2013. Tulevaisuusraportti: Tie kasvullisen taimituotannon tulevaisuuteen 2025. *Taimiuutiset* 2: 16–22.
- 2014. Solukkoviljelyllä huippuluokan taimia metsänviljelyyn. *Taimiuutiset* 3: 24–25.
- Nikkanen, T., Aronen, T. & Lehtonen, J. 2011. Jalostuksella uusia koristelajikkeita. Julkaisussa: Nikkanen, T. & Velling, P. (toim.). *Metsäpuiden erikoismuodot - koristepuita viherrakentamiseen*. Metsäkustannus Oy, Helsinki. s. 132–145.
- Nikkanen, T., Aronen, T. & Heiska, S. 2012. Kuusikon kummajaisista kestäviä koristepuita pistokaslisäyksellä. *Taimiuutiset* 1: 18–23.

### 6.2 Englanninkielistä kirjallisuutta

- Anon. 2014. News and Views from Nordic Forest Research. Close to application of somatic embryogenesis. *Scan. J For. Res.* 6 (2014): 615–616.
- Aronen, T., Nikkanen, T. & Tynkkynen, T. (eds.). 2009. Vegetative propagation of conifers for enhancing landscaping and tree breeding. Proceedings of the Nordic meeting held in September 10th–11th 2008 at Punkaharju, Finland. *Metlan työraportteja/Working Papers of the Finnish Forest Research Institute* 114. 80 p.
- Attree, S. & Fowke, L. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35(1), 1–35.
- Bonga, J.M.; Klimaszewska, K.; von Aderkas, P. 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 241–254.
- Bozhkov, P.V. & von Arnold, S. 1998. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia plantarum* 104(2), 211–224.
- Businge, E., Brackmann, K., Moritz, T. & Egertsdotter, U. 2012. Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). *Tree Physiology* 32(2), 232–244.
- Businge, E., Bygdell, J., Wingsle, G., Moritz, T. & Egertsdotter, U. 2013. The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia plantarum* DOI:10.1111/ppl.12039( ).
- Chalupa V. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* L. Karst. *Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca*, 14: 65–90.
- Egertsdotter, U. & Arnold, S. 2008. Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia plantarum* 93(2), 334–345.

- Egertsdotter, U. & Clapham, D. (2011). METHOD FOR MATURING AND SYNCHRONIZING CONIFER SOMATIC EMBRYOS. In. WO Patent 2,011,123,038.
- Egertsdotter, U., Mo, L.H. & Arnold, S. 2006. Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia plantarum* 88(2), 315–321.
- Egertsdotter, U. & von Arnold, S. 1998. Development of somatic embryos in Norway spruce. *Journal of Experimental Botany* 49(319), 155–162.
- Filonova, L.H., Bozhkov, P.V. & von Arnold, S. 2000a. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51(343), 249–264.
- Find, J.I. 1997. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Science* 128(1), 75–83.
- Gupta, P.K., Durzan, D.J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugarpine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports* 4:177–179.
- Hakman, I., Fowke, L.C., von Arnold, S., Eriksson, T. 1985. The development of somatic embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci* 38:53–59.
- Heiska, S., Jaakola, L., Varis, S. & Aronen, T. 2013. Towards mass-propagation of Norway spruce in Finland. In: Park, Y.S. Bonga, J.M. (ed.). Proceedings of the IUFRO Working Party 2.09.02 conference on “Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management”, June 25–28, 2012, Brno, Czech Republic. p. 148–150.
- Helmersson, A., Von Arnold, S., Burg, K. & Bozhkov, P.V. 2004. High stability of nuclear microsatellite loci during the early stages of somatic embryogenesis in Norway spruce. *Tree Physiology* 24(10), 1181–1186.
- Högberg, K-A., Ekberg, I., Norell, L., von Arnold, S. 1998. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 1536–1545
- Klimaszewska, K., Lachance, D., Pelletier, G., Lelu, A-M., Seguin, A. 2001. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant* 37:748–755.
- Larsson, E., Sitbon, F., Ljung, K. & Von Arnold, S. 2008. Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytologist* 177(2), 356–366.
- Larsson, E., Sitbon, F. & von Arnold, S. 2012. Differential regulation of Knotted1-like genes during establishment of the shoot apical meristem in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Reports* 31(6), 1053–1060.
- Litvay, J.D., Verma, D.C., Johnson, M.A. 1985. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) *Plant Cell Rep.* 4:325–328.
- Klimaszewska, K., Overton, C., Stewart, D., Rutledge, R.G. 2011. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta* 233:635–647.
- Kvaalen, H., Johnsen, Ö. 2008. Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis. *New Phytol.* 177:49–59.
- Nikkanen, T., Heiska, S. & Aronen, T. 2013. New ornamental conifers for harsh northern conditions through cutting propagation of special forms of Norway spruce. In: Park, Y.S. Bonga, J.M. (ed.). Proceedings of the IUFRO Working Party 2.09.02 conference on “Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management”, June 25–28, 2012, Brno, Czech Republic. p. 98–109.
- Pagues, L.E. (ed.). 2013. *Forest Tree Breeding in Europe. Current State-of-the-Art and Perspectives.* Springer, Dordrecht. 527 p.
- Ragonezi, C., Klimaszewska, K., Castro, M.R., Lima, M., de Oliveira, P., Zavattieri, M.A. 2010. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Trees* 24: 975–992.
- Rutledge, R.G., Stewart, D., Caron, S., Overton, C., Boyle, B., MacKay, J., Klimaszewska, K. 2013. Potential link between biotic defense activation and recalcitrance to induction of somatic embryogenesis in shoot primordia from adult trees of white spruce (*Picea glauca*). *BMC Plant Biol.* 13:116.

- Smertenko, A.P., Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Arnold, S. & Hussey, P.J. 2003. Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. *The Plant Journal* 33(5), 813–824.
- Sonesson J, Bradshaw R, Lindgren D, Ståhl P. 2001. Ecological evaluation of clonal forestry with cutting-propagated Norway spruce. Forestry Research Institute of Sweden, Report No. 1. 2001.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E.C. & Thorpe, T.A. 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38(2), 93–105.
- Strengbom J, Dahlberg A, Larsson A, Lindelöw Å, Sandström J, Widenfalk O, Gustafsson L. 2011. Introducing intensively managed spruce plantations in Swedish forest landscapes will impair biodiversity decline. *Forests* 2:610–30.
- Sun, H., Aidun, C.K. & Egertsdotter, U. 2010. Effects from shear stress on morphology and growth of early stages of Norway spruce somatic embryos. *Biotechnology and bioengineering* 105(3), 588–599.
- Sundås-Larsson, A., Svenson, M., Liao, H. & Engström, P. 1998. A homeobox gene with potential developmental control function in the meristem of the conifer *Picea abies*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(25), 15118–15122.
- Svobodova, H., Albrechtova, J., Kumstyrova, L., Lipavska, H., Vagner, M. & Vondrakova, Z. 1999. Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(3), 209–221.
- Tremblay, L. & Tremblay, F.M. 1991. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) BSP) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27(1), 95–103.
- Vestman, D., Larsson, E., Uddenberg, D., Cairney, J., Clapham, D., Sundberg, E. & von Arnold, S. 2011. Important processes during differentiation and early development of somatic embryos of Norway spruce as revealed by changes in global gene expression. *Tree Genetics & Genomes* (7), 347–362.
- von Arnold, S., Eriksson, T. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Botany* 59:870–874.
- Von Arnold, S., Clapham, D. 2008. Spruce embryogenesis. In: Suarez MF, Bozhkov PV (eds) *Plant embryogenesis: methods in molecular biology*, Human Press, Totowa, NJ, 427:31–47.

### 6.3 Hyödyllisiä nettisivuja

Metlan kasvullisen lisäyksen tutkimuksen esittely

<http://www.metla.fi/hanke/7479/>

<http://www.metla.fi/hanke/3537/>

Tietoa metsänjalostuksesta

<http://www.metla.fi/metinfo/jalostus/>

Tietoa metsänviljelyaineiston tuotannosta sekä sitä koskevasta lainsäädännöstä ja valvonnasta

<http://www.evira.fi/portal/fi/kasvit/viljely+ja+tuotanto/metsanviljely/>

Kenelle geenit kuuluvat? - Kasvinjalostajanoikeuksista haetaan työkalua erikoisten puiden kaupallistamisesta saatavien hyötyjen jakoon. Blogikirjoitus, Susanne Heiska.

<http://www.metla.fi/keskustelu/2014-01-07-kasvinjalostajaoikeudet.htm>

<http://www.tiedeseura.es/2013/12/kenelle-geenit-kuuluvat.html>

A report and presentations from one-day workshop in Uppsala, on 19th May 2014 on the topic “Somatic embryogenesis for future forestry - capturing the genetic gains from the breeding program and securing elite plant deployment for production and climate adaptability; status, implementation and expected results.”

<http://www.nordicforestresearch.org/adapcar/meetings/>

World-wide research on somatic embryogenesis and other vegetative propagation techniques. The web site contains information on the unit, as well as links to three international conferences organized by the unit and the proceedings of these conferences.

The main objective of the IUFRO Working Party named “Somatic Embryogenesis and other Vegetative Propagation Technologies” is to foster the development and application of somatic embryogenesis (SE) and other vegetative propagation technologies in woody plants. Research areas of this unit include: the development and refinement of propagation systems for commercially and ecologically important tree species; the application of vegetative propagation in tree breeding and deployment in multi-varietal forestry balancing genetic gain and diversity; the use of vegetative propagation in genetic resource conservation, biotechnology, genomics, molecular biology, and insect and disease resistance; and the study of related disciplines such as cryopreservation, molecular genetics, and epigenetic effects.

<http://www.iufro20902.org/>

A report and presentations from a TreeBreedEx meeting “Vegetative propagation and deployment of varieties (a.k.a. clonal forestry) - the scope for Europe” held at 21.-23.4.2009 at Liverpool, England.

<http://www.forestry.gov.uk/fr/INFD-7KHHFW>



## LIITE 1. Esimerkkejä havupuiden solukkoviljelyssä käytetyistä alustoista

Tässä liitteessä on esitetty esimerkiksi valituissa solukkoviljelyalustoissa käytettävät kivennäisaineet, vitamiinit, mahdolliset orgaanisen typen lähteet (aminohapot) ja sokeri. Ohjeet ovat liuosmaiselle alustalle. Tarvittaessa alusta kiinteytetään lisäämällä siihen esimerkiksi agaria tai Phytageeliä® 4–6 g/l. Viljelmän kasvatusvaiheesta riippuen alustoihin laitetaan lisäksi solukon kasvun ja erilaistumisen säätelyä kasvihormoneita. Solukon lisäämisvaiheessa kasvualustaan lisätään kasvuhormoneista auksiinia (esim. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) ja sytokiniiniä (esim. BA, 6-Benzylaminopurine). Kun solukosta halutaan kypsyttää alkioita, vaihdetaan kasvunsäätelijäksi abskissihappo (ABA, (±)-2-Cis-4-trans-Abcisic acid). Alkioiden idätys tapahtuu hormonnittomalla alustalla.

**Taulukko 1.1. LM-alusta**, joka on muunneltu Litvay-alustasta niin, että osa ravinteiden määristä on puolitettu alkuperäisestä (Litvay et al. 1985. Plant Cell Reports 4: 325–328).

Ainesosa	mg/l	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	
KNO <sub>3</sub>	1900	
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1850	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	22	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	31	
MnSO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	21	
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	43	Ympäristölle vaarallinen
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,25	
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,50	Ympäristölle vaarallinen
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,125	Myrkyllinen
KJ	4,15	
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,80	
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,30	
Myo-inositol	100	
Nicotinic acid	0,5	
Pyridoxine HCl	0,1	
Thiamine HCl	0,1	
Sakkaroosi	10-60 g/l kasvatusvaiheesta riippuen	

pH 5.8

Autoklavoinnin jälkeen L-glutamiini 500 mg/l.

**Taulukko 1.2. DCR-alusta** (Gupta & Durzan Plant Cell Rep. 4:177-179, 1985).

Ainesosa	mg/l	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	
KNO <sub>3</sub>	340	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	556	
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	85	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	
MnSO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	22,3	
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6	Ympäristölle vaarallinen
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,25	Ympäristölle vaarallinen
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025	Myrkyllinen
KJ	0,83	
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,80	
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,30	
Myo-inositol	200	
Nicotinic acid	0,5	
Pyridoxine HCl	0,5	
Thiamine HCl	1,0	
Glycine	2,0	
Sakkarooosi	20–60 g/L kasvatus- vaiheesta riippuen	

pH 5.8

Autoklavoinnin jälkeen L-glutamiini 250 mg/l.

**Taulukko 1.3.** ½ LP-alusta (von Arnold and Eriksson, Canadian Journal of Botany 59:870–874, 1981).

Ainesosa	mg/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	
KNO <sub>3</sub>	950	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	600	
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	185	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	90	
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,1	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,315	
Zn-EDTA x 4H <sub>2</sub> O	2,36	
NaFe-EDTA	10	
KI	0,375	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,0125	
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,00125	Ympäristölle vaarallinen
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,00125	Myrkyllinen
L-Glutamine	0,2	Lisää autoklavoinnin jälkeen
L-Alanine	0,025	Lisää autoklavoinnin jälkeen
L-Cysteine-HCl	0,01	Lisää autoklavoinnin jälkeen
L-Arginine	0,005	Lisää autoklavoinnin jälkeen
L-Leucine	0,005	Lisää autoklavoinnin jälkeen
L-Phenylalanine	0,005	Lisää autoklavoinnin jälkeen
L-Tyrosine	0,005	Lisää autoklavoinnin jälkeen
Glycine	1	
D-Sucrose	10,3 g/l	
D-Glucose	90	
D-Xylose	75	
L-Arabinose	75	
Nicotinic acid	1	
Pyridoxine-HCl (B6)	0,5	
Tiamine-HCl (B1)	2,5	
Myo-inositol	50	

pH 5.8

## Liite 2. Laskelma esimerkkitoimittajan kemikaalien hinnoista

**Taulukko 2.1.** Laskelma esimerkkitoimittajan kemikaalien hinnoista sekä niiden vaikutukset kasvatusalustan, kypsytyshalustan ja idätysalustan litrahintoihin

Kemikaali	Myyntipakkaus		Kasvatusalusta		Kypsytyshalusta		Idätysalusta	
	hintaa €	koko g	tarve g/l	hintaa €/l	tarve g/l	hintaa €/l	tarve g/l	hintaa €/l
KNO <sub>3</sub>	112	1000	0,9500		0,9500		0,9500	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	62	500,0	0,8250		0,8250		0,0000	
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	64	500,0	0,0210		0,0210		0,0210	
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	100	500,0	0,0430		0,0430		0,0430	
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	61	250,0	0,0005		0,0005		0,0005	
KJ	91	100,0	0,0042		0,0042		0,0042	
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	36	25,00	0,0001		0,0001		0,0001	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	60	500,0	0,0110		0,0110		0,0110	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	37	500,0	0,1700		0,1700		0,1700	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	43	500,0	0,0310		0,0310		0,0310	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	80	100,0	0,0013		0,0013		0,0013	
Tiamiini HCl (B1)	35	25,00	0,0001		0,0001		0,0001	
Nikotiinihappo	30	100,0	0,0005		0,0005		0,0005	
Pyridoksiini (B6)	42	10,00	0,0001		0,0001		0,0001	
Myo-inositoli	67	100,0	0,1000		0,1000		0,1000	
NaFe-EDTA	56	250,0	0,0400		0,0400		0,0400	
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	58	500,0	0,9250		0,9250		0,9250	
Kaseiini hydrolysaatti	80	500,0	1,0000		1,0000		1,0000	
Sakkaroosi / Sucrose	36	1000	20,000		60,000		20,000	
Phytigel	151	500,0	6,0000		6,0000		6,0000	
L-glutamiini	66	100,0	0,5000		0,5000		0,5000	
ABA	125	0	0		0,0159		0	
2.4-D	36	0	0,0022		0		0	
BA	28	1,000	0,0011		0		0	
<b>Yhteensä</b>				<b>3,80</b>		<b>12,82</b>		<b>3,35</b>



### Liite 3. Laskelmia perustamis- ja tuotantokustannuksiksi

**Taulukko 3.1.** Esimerkkilista tärkeimmistä solukkoviljelylaboratorion perustamiseen tarvittavista laite- ja kalustehankinnoista sekä mahdollisista kiinteistön muuntotoista sekä kustannusarvio (alv 0%) esimerkkiyrityksessä.

	Perustamisvuoden hankintatarve	Yksikköhinta	Pesrustamisvuoden hankintakustannus
		€	€
<b>Laitehankinnat</b>			
laminaari	1 kpl	8 500	8 500
Fireboy liekki	1 kpl	800	800
vesi-imulaitteisto	2 kpl	50	100
autoklaavi	1 kpl	25 000	25 000
vaaka	1 kpl	1 500	1 500
pH mittari	1 kpl	1 100	1 100
magneettisekoittaja	1 kpl	500	500
<i>Perustamisvuoden laiteinvestoinnit yht.</i>			<i>37 500</i>
<b>Kalustehankinnat</b>			
säilytysjärjestelmä kasvatuhuoneisiin	2 yks.	250	500
työtuolit	1 kpl	150	150
tiskipöytä ja -kaapisto	1 kpl	700	700
kivipöytä	1 kpl	1 700	1 700
<i>Perustamisvuoden kalustehankinnat yht.</i>			<i>3 050</i>
<b>Kiinteistön muutostyöt*</b>			
lvi-työt			
sähkötyöt			
paineilma- ja kaasuedot			
ilmastointityöt			
eristys			
valaistus			
pintaremontti			

\* Lista asioista, jotka on otettava huomioon solukkoviljelylaboratorion perustamiskustannuksia arvioitaessa. Kustannusten suuruus vaihtelee suuresti riippuen siitä, mitä tiloja muunnetaan.

**Taulukko 3.2.** Laskelma tarvike- ja käyttökustannuksista (alv 0%) esimerkkirytyksessä kuusen solukkoviljelyn tuotantokustannusten arvioimisen tueksi.

Tarvikekustannukset	Hankinta-	Yksikköhinta	Perustamisvuoden
	kustannus		kustannus
	kpl	€/kpl	€
<b>Työvälineet*</b>			
pinsetit	5	20,00	100,00
pipetit, sarja	1	1 200,00	1 200,00
mittapullo	4	20,00	80,00
dekanterilasi	20	1,20	24,00
mittalasi	2	9,00	18,00
säilöpullo (500 ml)	10	2,00	20,00
säilöpullo (1000 ml)	10	10,00	100,00
magneetit sekoittajaan	10	6,00	60,00
laatikot viljelmien säilyttämiseen	30	2,50	75,00
<i>Työvälinekustannukset yhteensä</i>			<i>1 677,00</i>
<b>Kulutustavara**</b>			
kasvatusastiat (pakasterasiat)		0,02	
suodatinpaperi (100 kpl/paketti)		9,15	
parafilmi (76 m/rulla)		80,00	
pipetinkärjet (1000 kpl/paketti)		31,07	
sterilointipussi 300x500 mm		0,78	
sterilointipussi 190x400 mm		0,36	
<b>Reagenssit ja kemikaalit**</b>			
alustat (l)***		6,65	
etanoli sterilointiin (l)		10,84	
nestekaasu liekkilaitteeseen (pullo)		11,42	

\* Työvälineiden hankintakustannus on laskettu yhden solukkoviljelyä ympärivuotisesti tekevän työntekijän mallilla

\*\* Vuosikustannusten laskeminen vaihtelee tapauskohtaisesti riippuen tuotannon tavoitemäärästä ja -toteumasta

\*\*\* Keskimääräinen litrahinta. Alustanteon kustannukset on selvitetty tarkemmin liitteessä 2.