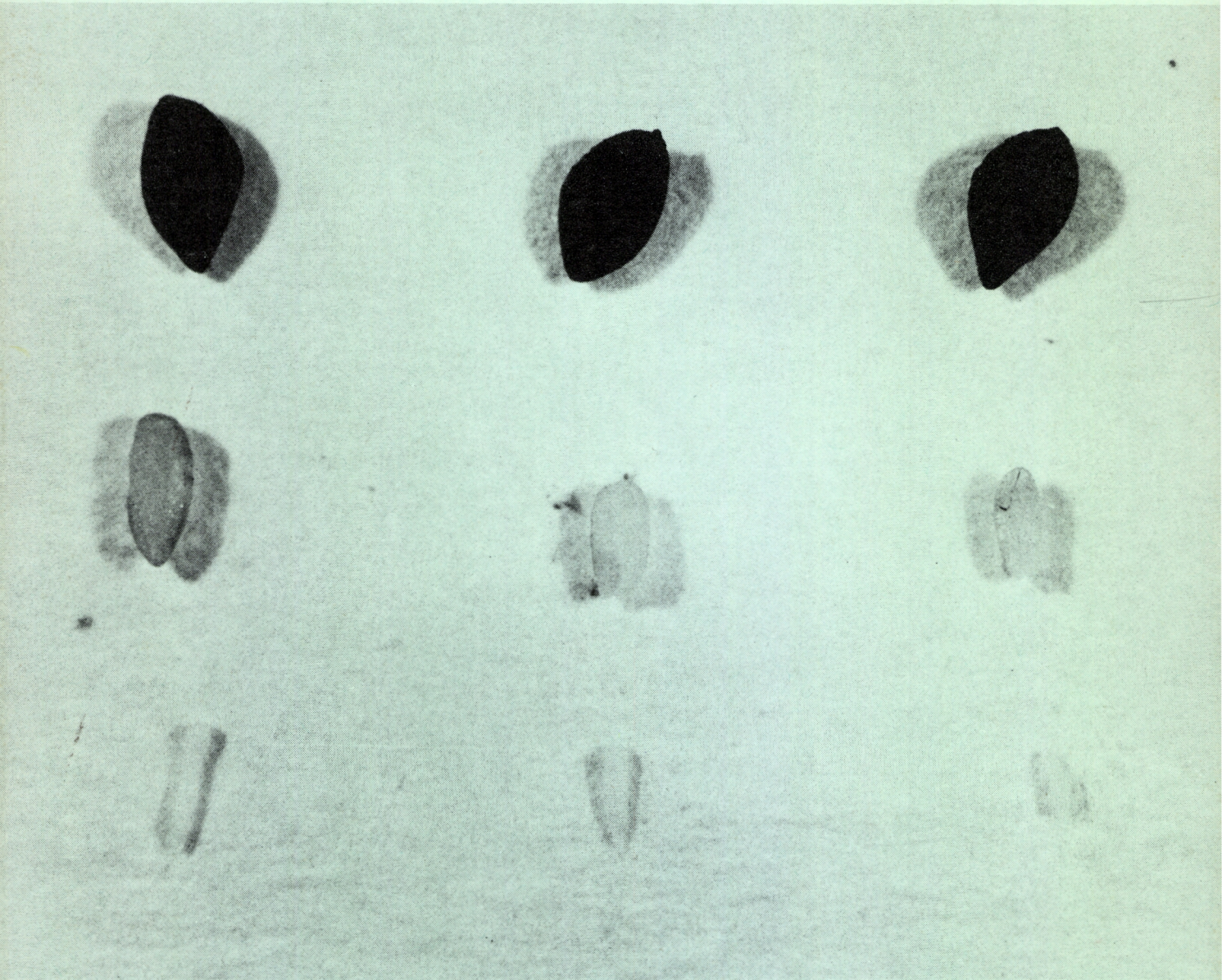


Kolarin tutkimusaseman tiedonantoja

27. 12. 1973



Martti Ryyänen

Vajaasti tuleentuneiden männyn alkioiden  
luokittelu ja kasvatus



## A l k u s a n a t

Pohjois-Suomessa ja erityisesti Lapissa männyn siemenen kehittyminen ei yleensä ole vielä päättynyt kasvukauden lopussa. Epäedullisten ilmasto-olojen vaikutuksesta suuri, usein suurin osa Lapin männyn siemensadosta on vajaasti tuleentunutta. Metsäntutkimuslaitoksen Kolarin tutkimusaseman työohjelmaan kuuluu laaja tutkimus geneettisen informaation ja ilmaston vuorovaikutuksista marginaalipopulaatioissa. Vajaasti tuleentuneen siemenen käyttöarvon tutkiminen katsottiin sopivaksi lähtökohdaksi männyn siemenen tuleentumista koskevaan selvitykseen ja samalla se on alkuosa edellä mainitusta isommasta tutkimuksesta.

Tutkimus on tehty osaksi Helsingin yliopiston kasvitieteen laitoksella ja osaksi Metsäntutkimuslaitoksen Kolarin tutkimusasemalla. Aiheen ovat antaneet professori V e i j o W a r t i o v a a r a ja dosentti V e i k k o K o s k i , ja heiltä olen saanut ratkaisevasti tukea työssäni. Maat. metsät. lisensiaatti E r k k i N u m m i n e n on esimiehenäni suhtautunut hyvin myötämielisesti työhöni, ja hän on myös tarkastanut käsikirjoituksen kieliäsun. Vaimoni LuK L e e n a R y y n ä n e n on auttanut suuresti laboratoriotöissä. Yllämainituille ja kaikille muille työssä avustaneille esitän parhaimmat kiitokseni.

Kolarissa 1973-12-15

Martti Ryynänen

## Sisällysluettelo

1.	Johdanto . . . . .	1
2.	Tutkimusaineisto ja menetelmät .	2
2.1.	Siementen luokittelu ja idätys . . . . .	2
2.2.	Alkioiden kasvatuskokeet . . . . .	4
3.	Tulokset ja niiden tarkastelu . .	5
4.	Yhteenveto . . . . .	17

Liitteet

KIRJALLISUUTTA

## 1. J o h d a n t o

Kotimainen mänty (*Pinus silvestris* L.) kasvaa Fennoskandiassa laajan levinneisyysalueensa pohjoisimmalla rajalla. Pohjois-Suomessa karut ilmasto-olot vaikeuttavat suuresti männyn uudistumista. Lapissa männyn siemenen tuleentuminen on yleensä vielä kesken kasvukauden päättyessä ja siemen jää laadullisesti heikoksi, vajaasti tuleentuneeksi.

Usein toistuvien huonojen siemenvuosien takia on varsinkin Skandinavian pohjoisosissa jo varhain kiinnitetty huomiota siemenen laatuun. Siemeniä on luokiteltu niiden käyttöarvon mukaan pääasiallisesti rakenteellisten, anatomisten ominaisuuksien avulla. Suomen olojen osalta HEIKINHEIMO (1921) ja KUJALA (1927) luokittelivat siemenet alkion l. embryon ja siemenvalkuaisen l. endospermin keskinäisten suhteiden mukaan.

Ruotsissa kehitettiin siementen röntgenkuvaus 1950-luvun alussa (SIMAK ja GUSTAFSSON 1953 a ja b). Vuonna 1954 SIMAK ja GUSTAFSSON paransivat ja tarkensivat omaa luokitustaan. He luokittelivat siemenet alkion pituuden ja alkio-ontelon pituuden suhteen perusteella. Tyhjä siemen kuuluu luokkaan 0, luokan I siemenissä on alkio-ontelo mutta ei alkiota, II-luokassa alkio on pituudeltaan alle puolet alkio-ontelosta, III-luokassa  $1/2 - 3/4$  alkio-ontelosta, ja täydet siemenet kuuluvat luokkaan IV.

Yleisesti voitaneen sanoa, että siemenluokkien 0-IV esiintyminen ja varsinkin vaihtelu on osoitus häiriintyneestä alkion kehityksestä. DOGRAN (1967) mukaan varhaisalkioiden kuoleminen on todennäköisesti tärkein syy tyhjien siementen muodostumiseen. Embryologisissa tutkimuksissaan hän ei löytänyt yhtään täysin tyhjää edes 0-luokan siemenistä. I-luokkaan kuuluvissa siemenissä

oli kehittynyt endospermi ja alkio-ontelo, mutta röntgenkuvissa alkiota ei näkynyt. Todellisuudessa monet (30-50 %) näistä siemenistä sisälsivät alkioita, jotka olivat varhaisalkiovaihetta pitemmälle kehittyneitä.

Metsänuudistus pohjoisella marginaalialueella on suuresti riippuvainen sopivan männynsiemenen saannista. Sopivana voitaneen pitää näihin oloihin geneettisesti mahdollisimman hyvin sopeutunutta materiaalia, jota käytännössä on paikallinen siemen. Hyviä siemenvuosia on tällä alueella harvoin, noin kymmenen vuoden välein. Metsänuudistusta vaikeuttaa vielä se, että näiden hyvien vuosien jälkeen tulisi ilmasto-olojen olla suotuisia myös taimien kunnolliselle kehittämiselle.

Siemenen kehityksen ja tuleentumisen riippuvuus ilmastosta lienee katsottava fysiologiseksi tapahtumaketjuksi. Fysiologian menetelmiä on havupuiden siementen tutkimisessa käytetty jo muutamien vuosien ajan varsinkin Japanissa, Kanadassa ja USA:ssa. Taimituotannon fysiologista taustaa selvittäväillä tutkimuksilla ja tutkimusmenetelmillä on todennäköisesti tulevaisuudessa merkitystä myös ns. siemenviljelyssiemenen geneettisten ominaisuuksien selvittämisessä.

Tässä tutkimuksessa on pyritty selvittämään männyn siementen vajaatuleentuneisuusastetta ja eri kehitysasteella olevien siementen itämistä ja alkuiden kasvua fysiologisten kasvatusmenetelmien avulla.

## 2. Tutkimusaineisto ja menetelmät

### 2.1. Siementen luokittelu ja idätys

Vajaasti tuleentuneen materiaalin saamiseksi kerättiin

syksyllä 1969 siemeniä arvioidun männynsiemenen tuleentumisrajan molemmin puolin Kolarista, Kittilästä, Sallasta, Suomussalmelta ja Sodankylästä. Siemenet röntgenkuvattiin ja luokiteltiin Metsäntutkimuslaitoksella käytettävän luokituksen mukaan (liite 1). Huonon tuleentumisen takia siementen itävyys oli hyvin alhainen vaihdellen nolasta (Sodankylä, Vuotso) 27 prosenttiin (Kolari, Pohjasenvaara). Jatkokokeisiin kerättiin siemeniä puittain Kolarista, Pohjasenvaarasta, numeroiduista puista.

Karistuksen jälkeen siemenet röntgenkuvattiin Ruotsinkylän jalostusasemalla. Esikokeissa oli todettu, että käytettäessä sekä SIMAK ja GUSTAFSSONin (1954) että Metsäntutkimuslaitoksen luokittelua varsinkin luokan II siemenillä hajonta oli suuri. Tästä syystä tarkennettiin siementen luokittelu tutkimukseen sopivaksi jakamalla täydet siemenet alkion koon mukaan seitsemään luokkaan liitteen 2 mukaisesti.

Idätyskokeet tehtiin Helsingin yliopiston kasvitieteen laitoksella. Siemeniä valaistiin 12 tuntia vuorokaudessa valaistuksen ollessa n. 1000 luksia ja lämpötilan  $+20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Tulokset on esitetty taulukossa 1. Saman erän siemeniä idätettiin myös petrimaljassa ravintoagaralustalla. Alustana oli MS-alusta solukoviljelyä varten (MURASHIGE ja SKOOG 1962, liite 3). Alkuperäisestä valmistusohjeesta poikettiin sikäli, että huonosti säilyvän IAA:n ( $\beta$ -indolyylitikkahappo) tilalla käytettiin vastaavaa synteettistä auksiinia 2,4-D:a (2,4-dikloorifenoksietikkahappo). Tulokset ovat taulukossa 2.

Sopivan kasvuaineyhdistelmän löytämiseksi tutkittiin sekä kuorittujen että kuorimattomien siementen itämistä erilaisilla MS-alustoilla. Siemenet steriloidtiin 2 min 3,3 %:isella natriumhypokloriitilla. Osa kuorittiin aseptisesti ns. laminaari-siirrostaustaapissa ja siirrettiin petrimaljoihin, osa siirrostet-

tiin kuorimattomina. Kokeiltavina oli kolme alustaa, joista MS 1 sisälsi makro- ja mikroravinteiden ja vitamiinien lisäksi 0,1 ppm kinetiiniä ja 2 ppm 2,4-D:a. MS 2:ssa oli näiden asemesta 10 % (V/v) kookosmaitoa ja MS 3:sta kasvuaineet puuttuivat. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Alustoihin käytetyistä kemikaaleista pääosa oli E.Merck AG Darmstadt -valmisteita. Pyridoksiinin ja tiamiinin oli valmistanut F. Hoffman - La Roche & Co, Basel, mesoinositolin ja 2,4-D:n Fluka AG, Buchs SG. Kinetiinin toimitti Sigma Chem. Co.USA. Agarina oli Difcon (USA) Bacto-agar, sakkaroosi oli BDH:n (Englanti) Analar-valmiste. Käytettyjen reagenssien puh-  
tausaste oli yleensä pro analysi tai purissimum, 2,4-D oli purum  
-astetta.

Kasvualustaa varten tehtiin makroravinteista 10-kertainen kantaliuos, jota säilytettiin jääkaapissa +4°C. Mikroravinteiden kantaliuos oli 100-kertainen ja säilytys samoin +4°C. Vitamiinit, glysiini ja mesoinositoli olivat 2000-kertaisena kantaliuoksena, jota säilytettiin jäädytettynä -18°C. 2,4-D- ja kinetiiniliuokset tehtiin uudelleen joka kerran.

## 2.2. Alkioiden kasvatuskokeet

Siementen vitaliteetti selvitettiin taustatiedoksi yksittäisten alkioiden kasvatuskokeisiin määrittämällä siementen itävyys ja itämistarmo (taulukko 4).

Kahden puun (73 ja 69) siemenillä tutkittiin eri siemenluokkiin kuuluvien alkioiden kasvamista sekä pelkällä agar-alustalla, että erilaisilla MS-alustoilla. Siemenet kuorittiin ja steriloiitiin 2 min 3,3 %:isella NaOCl:lla. Vesihuuhtelun (3-4 t) jälkeen siemenet halkaistiin preparointimikroskoopin alla



siirrostoputkaapissa. Alkiot preparoitiin esille ja siirrettiin kasvamaan koeputkiin, yksi alkio kuhunkin, yhteensä 160 putkea puuta kohden. Alkioiden kasvaminen on esitetty taulukossa 5.

Lisämateriaaliksi kerättiin v. 1971 Kolarista ns. vaippasiementä, erä n:o G3-71-094. Siemenerän laatutiedot ovat taulukossa 7, itäminen agar-alustalla ja preparoitujen alkioiden kasvaminen MS1-alustalla taulukoissa 8 ja 9.

Alkioiden kasvun riippuvuutta endospermistä ja sen laadusta tutkittiin kasvattamalla embryoita siten, että alkion viereen aivan siihen kiinni asetettiin endospermin kappale. Kokeessa käytettiin sekä siemenen omaa että vierasta endospermiä. Tulokset kasvatuksista koeputkessa ja erlenmeyerpullossa ovat taulukossa 10.

### 3. Tulokset ja niiden tarkastelua

Röntgenkuvaus sopii hyvin siementen luokitteluun ja varsinkin tyhjien siementen osuuden selvittämiseen. Tottunut tulkitsejä pystyy arvioimaan alkion koon suhteessa alkio-onteloon varsin tarkasti ja nopeasti.

Taulukko 1. Siementen itäminen siemenluokittain imupaperilla (2 x S&S n:o 489) petrimaljassa. Siemenen alkuperä Kolari, Pohjansenvaara. Siemenet kymmenestä puusta yhdistetty siemenluokittain.

Siemenluokka	Siemeniä kpl	Idätys vrk					
		10		21		30	
		kpl	%	kpl	%	kpl	%
4	355	228	64,2	300	84,5	315	88,7
3	600	261	43,5	469	78,2	510	85,0
3-	190	56	29,5	115	60,5	144	75,8
2+	112	1	0,9	10	8,9	32	28,6
2	73	0	0,0	2	2,7	9	12,3

Taulukko 2. Siementen itäminen siemenluokittain M&S-alustalla (MURASHIGE & SKOOG 1962) petrimaljassa. Alustaa maljassa 0,5 cm paksulti. Siemenen alkuperä sama kuin taulukossa 1.

Siemen- luokka	Siemeniä kpl	Itäminen (21 vrk)	
		kpl	%
4	100	82	82,0
3	100	74	74,0
3-	100	52	52,0
2+	100	23	23,0
2	100	6	6,0

Siementen idätyskokeissa (taulukot 1 ja 2) todettiin, että luokan 2 siemeniä ei kannattanut ottaa mukaan jatkotutkimuksiin. Näissä siemenissä on pohjoista materiaalia käytettäessä usein kaksi tai kolme alkiota. Embryogeenian pysähtyttyä ilmastollisten syiden takia siemenen alkioista yksikään ei pääse kehittymään täysikokoiseksi, eikä kärki-alkion dominanssi ehdi vaikuttaa.

Metsäntutkimuslaitoksella käytettävä siementen luokittelusteikko (liite 1) on ensisijaisesti tarkoitettu tuleentumis- palvelun käyttöön. Tätä tutkimusta varten siemenet oli luokiteltava tarkemmin, ja uutta jaottelua voitaneen pitää tarkoituksen- mukaisena tutkimuskäyttöön. Siemenluokkaan 2+ kuuluvista alki- oista iti ihanneoloissa noin neljännes (23-28 %). Ruotsissa saatujen tulosten mukaan (MÜLLER-OLSEN ja SIMAK 1954) tällaisten siementen itävyys maahan kylvettynä on kuitenkin vain n. 5 %. Kokeiltaessa alkioiden kasvatusta keinotekoisilla ravintoalus- toilla (taulukko 3) saatiin maksimitulokseksi 2+ -luokan siemenil- le 4,3 %:n itävyys parhaalla alustalla. Huonommilla alustoilla siemenet eivät itäneet lainkaan.

Siemenluokkaan 3- kuuluvat siemenet on aikaisemmassa la- jittelussa otettu luokkaan 3. Uudella lajittelulla saatiin nämä

vielä selvästi vajaatuleentuneet eroamaan enemmän luokan 3 siemenistä. Hyvällä alustalla voitiin siemenluokan 3 alkioiden katsoa itävän n. 20 % huonommin kuin täysin tuleentuneiden, luokan 4 siementen.

Kokeilluista erilaisista kasvualustoista paras, (MS1) antoi likimain saman itämistuloksen kuin kylvettäessä siemenet taimitarhalla muovihuoneeseen (SINKO 1969). Ilmeisesti voitaneen tässä tutkimuksessa käytetyllä menetelmällä laboratorio-oloissa saadut itämistulokset rinnastaa käytännön taimitarhatyössä saataviin.

Jacobsenin idätyslaitteessa saadaan käytännön tarkoituksiin usein liiankin korkeita itävyyslukuja. Epäkohdan korjaamiseksi on ehdotettu (MÜLLER-OLSEN ja SIMAK 1954), että itämisprosentin (itävyyden) lisäksi olisi otettava huomioon myös siementen itämistarmo. Tätä varten on suositettu ilmoitettavaksi siementen itävyys 10 vrk:n idätyksen jälkeen.

Verrattaessa eri luokkiin kuuluvien siementen itämistarmoa ja itävyyttä huomattiin (taulukko 4), että luokkien 4 ja 3 välillä oli suurempi ero siementen itämistarmossa kuin itämistuloksessa 30 vrk:n jälkeen. Täysin tuleentuneet siemenet itivät nopeimmin, mutta ero itämistuloksessa 21 vrk:n ja 30 vrk:n idätyksen jälkeen oli yllättävän pieni. Luokan 3 siemenet itivät hitaammin, mutta itämistulos parani huomattavasti vielä virallisen idätysajan (21 vrk) jälkeen. Idätettäessä luokan 3 siemeniä 30 vuorokautta saatiin jokseenkin sama tulos kuin luokan 4 siemenillä 21 vuorokauden idätyksen jälkeen. Siemenluokat 3- ja 2+ muodostivat toisen ryhmän ja niissä tämä itämisen viivästyminen oli vieläkin selvempää.

Itämistapahtuman kulussa näytti eri puiden välillä olevan eroja. Puun 74 siemenet itivät hitaimmin ja puun 73 nopeimmin.

Taulukko 3. Kuorimattomien ja kuorittujen, eri siemenluokkiin kuuluvien siementen itäminen erilaisilla kasvualustoilla petrimaljoissa. Alustaa maljassa 0,5 cm paksuudelta. Maljassa 10 siementä, siemeniä 70 kpl/luokka. Idätysaika 21 vrk. Valaistus 1 000 lx, 12 h/vrk, +20 ± 1°C. Siementen alkuperä sama kuin taulukoissa 1 ja 2.

MS 1 = MURASHIGE & SKOOG 1962 -alusta + 0,1 ppm kinetiiniä + 2 ppm 2,4-D.

MS 2 = " " - " + 10 % V/v kookosmaittoa

MS 3 = " " - " ilman kasvuaineita

	MS 1						MS 2						MS 3							
	Siemenluokat						Siemenluokat						Siemenluokat							
	4	3	3-	2+	2	4	3	3-	2+	2	4	3	3-	2+	2	4	3	3-	2+	2
Kuorimattomat																				
kpl	53	41	23	3	1	40	31	21	2	-	30	19	5	1	-					
%	75,7	58,6	32,9	4,3	1,4	57,1	44,3	30,0	2,9	0,0	42,9	27,1	7,1	1,4	0,0					
Kuoritut																				
kpl	41	24	17	-	1	34	21	5	-	-	23	13	2	-	-					
%	58,6	34,3	24,3	0,0	1,4	48,6	30,0	7,1	0,0	0,0	32,9	18,6	2,9	0,0	0,0					

Taulukko 4. Siementen itämistarmo ja itävyys siemenluokittain Jacobsenin idätyslaitteessa. Idätysalustana 2-kertainen imupaperi Munktell's Seed Testing Paper Nr. 1701. Valaistus 1 000 lx 12 h/vrk, +20 ± 1°C. Materiaali Kolari, Pohjasenvaara, kerätty puittain. Idätys neljänä toistona, taulukossa esitetty toistojen keskiarvot, puu 74 luokka 4:80 kpl, puu 73 luokka 4:280 kpl, muissa 400 kpl.

Puu	Siemenluokat											
	4			3			3-			2+		
	10 vrk	21 vrk	30 vrk	10 vrk	21 vrk	30 vrk	10 vrk	21 vrk	30 vrk	10 vrk	21 vrk	30 vrk
74 (80 kpl)												
kpl	48	71	74	214	274	340	122	218	233	85	133	198
%	60,0	88,8	92,5	53,5	68,5	85,0	30,5	54,5	58,3	21,3	33,3	49,5
73 (280 kpl)												
kpl	201	253	253	281	358	365	171	294	314	71	161	264
%	71,8	90,4	90,4	70,3	89,5	91,3	42,8	73,5	78,5	17,8	40,3	66,0
69												
kpl	306	345	359	248	305	329	128	203	240	73	141	193
%	76,5	86,3	89,8	62,0	76,3	82,3	32,0	50,8	60,0	18,3	35,3	48,3
66												
kpl	292	343	346	222	704	324	163	227	243	77	144	174
%	73,0	85,8	86,5	55,5	76,0	81,0	40,8	56,8	60,8	19,3	36,0	43,5

Viime mainitun siemenistä ei 21 vrk:n idätyksen jälkeen yksikään siemen itänyt. Itämistulos 10 vrk:n idätyksen jälkeen (itämistarmo) kuvaa mahdollisesti siementen laatua ja kykyä tuottaa taimia huonoissakin oloissa paremmin kuin varsinainen itämisprosentti (itävyys 21 vrk:n kuluttua).

Kehityksessään eri asteelle pysähtyneiden alkioiden kasvukykyä tutkittiin siirtämällä embryot kasvamaan keinoalustoille koeputkiin. Tulosten mukaan (taulukko 5) lähtivät kävyissä pisimmälle kehittyneet alkiot (luokka 4) kasvamaan vieläkin nopeammin luokan 3 siemeniin verrattuna kuin mitä idätystuloksen perusteella olisi ollut odotettavissa. Kymmenen vuorokauden kasvatuksen jälkeen kasvu oli pienimmilläänkin kaksinkertainen vähemmän tuleentuneisiin verrattuna.

Edelleen voitiin panna merkille, että kasvatuksen päättyessäkin (42 vrk) luokan 3 siemenet eivät olleet lähteneet kasvamaan yhtä lukuisasti kuin täysin tuleentuneet. Koska materiaali oli kasvatustilojen puutteessa suhteellisen pieni (320 koeputkea/32 alakoetta), taimien painoa ei punnittu. Silmämäärin arvioituna luokkien 4 ja 3 taimet olivat kuitenkin jokseenkin samankokoisia kasvatuksen päättyessä. Siemenluokkien 3- ja 2+ taimet olivat selvästi edellisiä hennompia ja pienempiä. Myös taimisaannon osalta nämä kaksi olivat omana ryhmänään selvästi edellisiä huonompia.

Kasvatusalustoista oli kinetiiniä ja 2,4-D:a sisältävä (MS1) jonkin verran parempi kuin näiden asemesta kookosmaitoa sisältänyt MS2. Mahdollisesti erilaiseen tulokseen vaikuttaa se, että edellisessä oli jo mukana mesoinositoli, jota pidetään yhtenä kookosmaidon tärkeimmistä kasvua edistävästä aineosista. Pelkällä agar-alustalla kasvoivat puun n:o 73 siemenistä vain täysin tuleentuneet.

Taulukko 5. Eri siemenluokkiin kuuluvien alkioiden kasvaminen eri alustoilla, alusta kuten taulukossa 4. Siemenet kuorittu, steriloitu 2 min 3,3 % NaOCl, ster. vesihuuhtelu, alkiot prepa-roitu erilleen. Kasvatus koeputkissa 42 vrk., yksi alkio/putki 10 putkea/luokka ja alusta. Idätysolot. Luku ilmaisee kasvamaan lähteneet alkiot (> 2-kertainen pituus), sulussa oleva myöhem-min kuolleen. Plussalla (+) merkityt alkiot tummuneet.

	4			3			3-			2+		
	10	30	42	10	30	42	10	30	42	10	30	42
<u>Puu 73</u>												
Alusta MS 1	4	4	6	-	3:+	5:++	-	1	3:++	-	1	1
MS 2	-	3	5	-	-	2	-	-	1	-	-	-
MS 3	-	1	1	-	1	1	-	+	1	-	-	-
Agar	-	2	2:++	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<u>Puu 69</u>												
Alusta MS 1	4	8	8:+	2	4	7:+	-	3	3	-	-	1
MS 2	3	4	5	-	1	2	-	-	1	-	1	2
MS 3	-	1	2	-	1	1	1	1	1	-	1	1
Agar	-	1	(1)	-	(1)	-	-	1	1	-	-	-

Kasvatuksen yhteydessä todettiin useissa alkioissa kasvuhäiriöitä. Jo 10 vuorokauden kuluttua moniin alkioihin oli alkanut muodostua vaaleata, kallusmuodostuman kaltaista, erilaistumantonta solumassaa (taulukko 6). Solukkoa muodostui useimmiten juurenkärkeen, harvemmin sirkkasilmuun. Tavallisesti alkiosta, joissa oli tätä epänormaalia kasvua, ei tullut normaalia tainta. Samankaltaista epänormaalia juuren kasvua on Pinus lambertianalla todennut SACHER (1956).

Runsaimmillaan kallusmuodostus oli pelkällä agarilla kasvatetuissa alkioidissa. Ilmeisesti endospermin puuttuessa myös täysin tuleentuneet alkiot vaativat tietynlaisen kasvuaineyhdistelmän kehittyäkseen normaaleiksi taimiksi. Vaikka MS1-alusta on alunperin kehitetty kalluksen kasvattamista varten, voidaan sytokiniineja ja aukiineja sopivasti kombinoimalla saada solukoiden erilaistumiseen tarvittava hormonyhdistelmä (vrt. myös MURASHIGE & SKOOG 1962).

Männyllä ei aikaisemmin ole kasvatettu vajaasti tuleentuneita alkioidia. BARTELS käytti (1957 a ja b) täysin tuleentuneiden männyn alkioiden kasvatuksessa WHITEN (1943) alustaa, johon hän vielä lisäsi siementen endospermeistä tekemäänsä uutetta normaalien taimien saamiseksi. Muilla mäntylajeilla tehdyissä kasvatuskokeissa on samoin käytetty yksinomaan tuleentunutta siementä, ja useimmiten on alustaan lisätty kookosmaitoa joko autoklavoituna tai aseptisesti membraanisuodattimen läpi (ks. esim. BROWN, C.L. & GIFFORD 1958, BERLYN & MIKSCHÉ 1965, HARVEY 1967, BONGA & FOWLER 1970, BROWN, D.J. ym. 1970).

Kasvatuskokeissa todettiin (taulukko 5), että varsin monet alkiot alkoivat kyllä kasvaa, mutta tummuivat lähes mustiksi jatkettaessa kasvatusta yli kuukauden. Ensin taimien kasvu loppui ja sitten koko alkio tummui eikä vain juuri, kuten SACHERIN



Taulukko 6. Eri siemenluokkiin kuuluvien alkioiden kallusmuodostus eri alustoilla, alusta kuten taulukossa 4, materiaali ja kasvatus kuten taulukossa 5. Luku ilmoittaa alkiot, joihin on muodostunut epäsäännöllistä, erilaistumatonta solukkoa.

	4			3			3-			2+		
	10	30	42	10	30	42	10	30	42	10	30	42
<u>Puu 73</u>												
Alusta MS 1	4	6	4	8	3	3	3	6	3	4	1	1
MS 2	4	4	4	3	7	4	-	9	7	2	4	5
MS 3	6	2	2	3	3	5	3	2	4	5	5	5
Agar	6	6	6	6	9	6	7	9	6	2	5	3
<u>Puu 69</u>												
Alusta MS 1	4	1	1	4	4	4	3	2	3	6	2	1
MS 2	6	6	5	4	6	4	3	6	4	2	1	-
MS 3	8	5	4	6	2	4	2	2	4	2	8	4
Agar	8	8	8	8	4	-	4	4	-	2	2	2

tutkimuksessa vuodelta 1956. SACHERin työtä kritisoidessa on esitetty (esim. BERLYN & MIKSCH 1965), että syynä juurten kasvun pysähtymiseen ja niiden tummumiseen olisi ollut jatkuva valaistus ja autoklavoitu kookosmaito. Kun tässä kokeessa valaistus ei ollut jatkuva eikä kookosmaitoa autoklavoitu, alkioiden kasvun pysähtyminen ja niiden tummuminen ei voine johtua näistä syistä.

Aikaisemmissa kasvatuskokeissa oli todettu luokkien 4 ja 3 siementen muodostavan yhden, ja luokkien 3- ja 2+ toisen ryhmän. Ryhmän sisällä kasvu oli lähes samankaltaista, mutta ryhmien välillä oli melko suuri ero. Tästä syystä materiaaliksi jatkokokeisiin valittiin sellainen siemenerä, jossa oli riittävästi luokan 3 siementä (taulukot 7, 8 ja 9). Näin päästiin vertaamaan käytännön kannalta mielenkiintoisia täysin tuleentuneita ja vähän vajaasti tuleentuneita alkioita.

Taulukko 7. Materiaalin G3-71-094 laatu

Luokka	Siemenluokan osuus %	1000-siemen paino g	Siementen itävyys (täydet siemenet)	
			10 vrk	21 vrk
4	4,0	4,870		
3	63,6	4,450		
3-	9,6	3,932		
2+	5,0	3,832		
2	16,1	3,820		
			11,45 %	12,40 %

Taulukko 8. Eri luokkien siementen itäminen agar-alustalla (0,8 %<sup>w/v</sup>) petrimaljassa. Ster. 3,3 % NaOCl 2.min, ster. vesipesu. Materiaali G3-71-094 Kolari, Pohjasenvaara. 10 siementä/malja, 4 maljaa/siemenluokka.

Malja	Siemenluokat											
	4			3			3-			2+		
	10	21	30	10	21	30	10	21	30	10	21	30
1	7	7	7	5	6	7	2	3	5	-	2	2
2	6	8	8	4	5	6	2	2	4	-	1	2
3	8	9	9	4	7	7	1	3	3	-	1	1
4	5	7	8	3	6	7	2	4	4	-	1	2

Taulukko 9. Eri luokkien alkioiden kasvaminen M&S -alustalla petrimaljassa. Menetelmä ja materiaali kuten taulukossa 8. 10 alkiota/malja, 4 maljaa/siemenluokka. Suluissa olevat ovat kuolleet.

Malja	Siemenluokat											
	4			3			3-			2+		
	10	30	42	10	30	42	10	30	42	10	30	42
1	-	3	6	-	4	4	-	2	3 (2)	-	1	(1)
2	-	5	5	-	2	2	-	1	1	-	-	(1)
3	-	3	5	-	4	5	-	1	1	-	3	1(3)
4	-	6	7	-	3	5	-	2	2 (1)	-	1	(1)

Endospermin laadun vaikutusta kehitysasteeltaan erilaisten alkioiden kasvuun tutkittiin asettamalla embryon välittömään läheisyyteen endospermin kappale sekä omasta siemenestä että vieraasta siemenestä (taulukko 10). Pelkällä agarilla koeputkessa kasvatettuna kasvoi viidestä intaktista siemenestä kolme normaalia tainta sekä luokan 4 että luokan 3 siemenistä. Luokan 3-siemenistä kahdesta kehittyi normaalin näköinen taimi, luokan 2+ siemenistä yksikään ei itänyt.

Alkiot, joiden viereen oli otettu pala saman siemenen endospermiä kuolivat sen jälkeen, kun ne olivat ensin kasvaneet yli kaksi kertaa alkuperäisen pituisiksi. Ilmeisesti alkioidissa oli riittävästi varastoravintoa kasvun alkamiseen, mutta se ei riittänyt taimeksi asti kehittymiseen. Siemenluokan 3-alkiosta vain yksi alkoi kasvaa, mutta sekin kuoli samassa vaiheessa kuin edelliset. Eniten vajaasti tuleentuneissa siemenissä (luokan 2+) varastoravinto ei ilmeisesti riittänyt itämisen alkamiseen, ja vieressä olleen endospermin varastoravintoa ei saatu mobilisoiduksi ainakaan riittävässä määrin.

Alkiosta, joiden viereen oli asetettu pala vierasta, mutta samaan siemenluokkaan kuuluvan siemenen endospermiä tummuivat kaikki kasvunsa aloittaneet. Tummuminen tapahtui samoihin aikoihin tai hieman aikaisemmin kun alkiot olivat pidentyneet kaksinkertaisiksi alkuperäisestä. Tummuminen oli samanlaista kaikissa siemenluokissa. Onko kyseessä jonkinlainen inkompatibiliteetti- tai vasta-ainereaktio tai jokin muu, ei tämän tutkimuksen perusteella voida sanoa. Ilmiö vaatisi tarkempia, varsinaisia immunologisia tutkimuksia. Vastaavanlaisesta ilmiöstä ei tekijä ole löytänyt mainintaa kirjallisuudessa.

Endospermin vaikutusta männyn alkioiden kasvuun ei ole aikaisemmin tutkittu. Vajaasti tuleentuneilla, kauan

varastoiduilla tai vioittuneilla siemenillä tiedetään erittyvän kuoren läpi lukuisia erilaisia yhdisteitä, kuten aminohappoja, proteiineja, nukleiinihappoja, rasvoja, sokereita jne., enemmän kuin täysin tuleentuneilla, terveillä siemenillä (PEHAP 1972). Tämä saattaa liittyä jollakin tavalla vajaatuleentuneen siemenen endospermin ravintoaineiden mobilisaatioon ja siten myös alkioden kasvuun.

Alkioden kasvatuskokeiden yhteydessä todettiin kaikissa niissä pulloissa, joissa oli endospermin kappale, kalluksen muodostusta endospermin palassa. Vähäisintä tämä oli tuleentuneimmissa siemenissä ja lisääntyi vajaatuleentuneisuuden kasvaessa (taulukko 10b). Erilaistumattoman solumassan kasvu oli yleensä voimakkaampaa niissä pulloissa, joissa oli saman siemenen alkio ja endosperminkappale. Syytä tällaiseen kasvuun ei vielä tiedetä.

#### 4. Y h t e e n v e t o

Tässä tutkimuksessa on fysiologiassa käytettävien kasvatusten menetelmien avulla selvitetty eri kehitysasteella olevien, vajaasti tuleentuneiden männyn siementen luokittelua, itämistä ja alkioden kasvua.

Tutkimuksen perusteella näytti itämistarmo kuvaavan siementen laatua ja taimen muodostamiskykyä paremmin kuin pelkkä siementen itävyys.

Käytetty siementen luokittelu erotteli selvästi vajaatuleentuneet siemenet (siemenluokat 2+ ja 3-) entistä paremmin vähemmän vajaasti tuleentuneista (luokka 3).

Käytetyistä alustoista paras (MS1) erotteli siemenluokat 4 ja 3 omakseen ja luokat 3- ja 2+ omaksi ryhmäksi.

Normaaliksi taimeksi kehittyäkseen vajaasti tuleentuneet männyn siemenet tarvitsivat endospermin tai tietynlaisen kasvuainekombinaation kasvualustassa.

Käytetty kasvatusmenetelmä näytti sopivan myös haploidisen endospermisolukon kasvattamiseen.

Taulukko 10a. Endospermikappaleen vaikutus alkion kasvuun. Materiaali ja sterilointi kuten taulukossa 7. Endospermi paloiteltu neljään osaan, yksi osa otettu alkion viereen siihen kiinni. Kasvatus koeputkessa, alustana agar (0,8 % w/v), idätysolot, lämpötila 23 + 1°C. Kasvatusaika 30 vrk. A = intakti siemen, B = embryo + pala omaa endospermiä, C = embryo + pala vierasta endospermiä, D = agar + embryo, k = alkio kasvanut > 2 x alkuper. pituus, (k) = alkio pidentynyt, mutta kasvu pysähtynyt, T = alkio tummunut + mustaksi.

Putki	4				3				3--				2+			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	k	(k)	T	T	k	(k)	T	-	k	(k)	T	-	-	-	T	-
2	-	(k)	T	-	k	(k)	T	-	k	(k)	T	-	-	-	T	-
3	k	(k)	T	-	k	-	T	-	-	-	T	-	-	-	T	-
4	k	(k)	T	-	-	(k)	T	-	-	-	T	-	-	-	T	-
5	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-

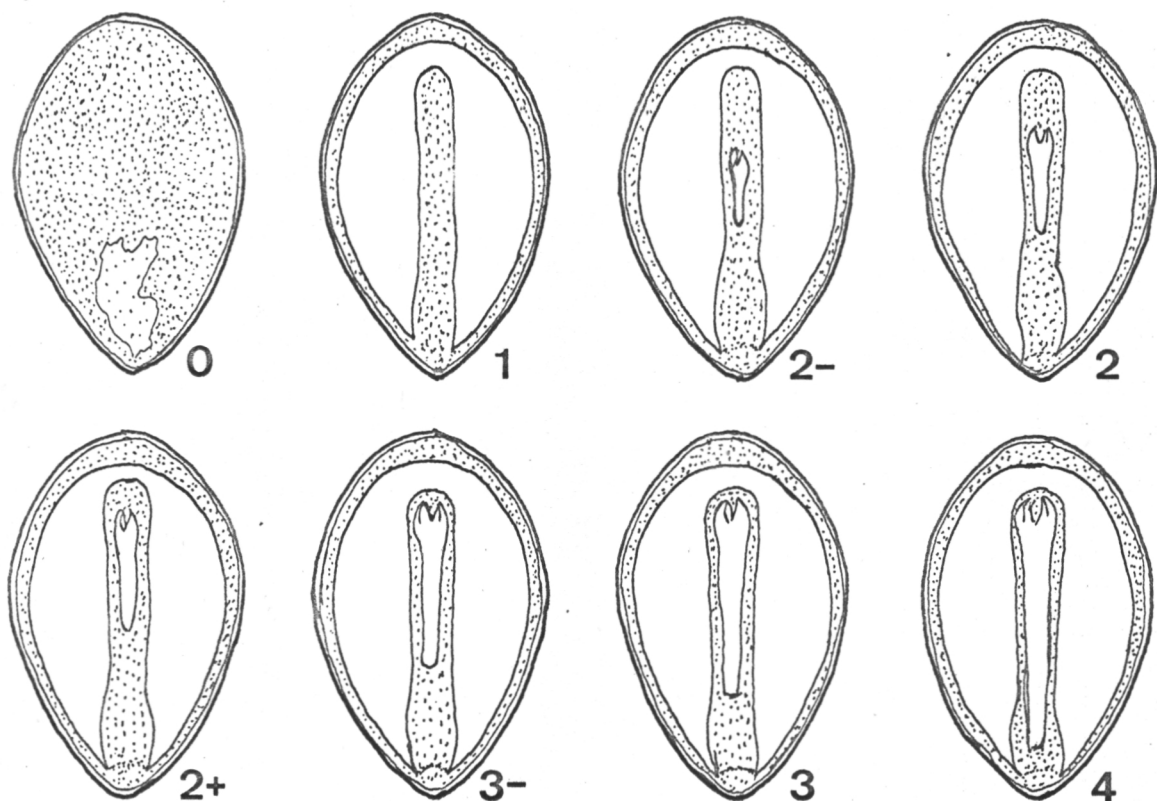
Taulukko 10b. Kasvatus erlenmeyer-pullossa (200 ml, laajakaula), M&S-alustaa 75 ml. 5 alkiota/pullo, 4 pulloa/luokka ja käsittely. H = homeinfektio, ( ) = alkio kuollut alettuaan kasvaa, + = yhteen endospermiin muodostunut kallussolukon kaltaista kasvannaista.

Pullo	4				3				3--				2+			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	3	2	(1) H	(1)	2	(1) H	(1)	(1)	1	(1) H	(1) H	- H	1	-	- H	- H
		++	+		+++	+	+			+++	+			+++	+++	
2	2	2	(1)	(2) H	3	(1)	(1)	(1)	2	+	(1)	-	-	-	-	-
		+	+			+	+			+	+			+++	++	
3	3	1	-	-	2	+	+	-	1	-	-	-	-	-	-	-
		+	+			++	++				++			+++	+	
4	3	1	-	-	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	+			++	+				+++			+++	+++	

Liite 1.

Jako siemenluokkiin on seuraava:

- O Tyhjä siemen, siemenvalkuainen jäänyt muodostumatta hedelmöityksen puuttumisen tähden tai alkuaan kyllä muodostunut, mutta myöhemmin hävinnyt sen vuoksi, että alkio on kuollut letaalitekijöiden tai hyönteisvaurioiden vuoksi.
- I Alkio-ontelo tyhjä tai mikropylen päässä näkyy pieniä varhaisalkioita, jotka eivät ole lähteneet kehittymään. Alkio-abortti.
- II Alkio lähtenyt kehittymään, mutta sen kuva ei peitä 50 % alkio-ontelon kuva-alasta.
- III Alkion kuva peittää enemmän kuin 50 %, mutta vähemmän kuin 70 % alkio-ontelon kuva-alasta. Keskoset. (Täydessä, luonnollisessa kosteustilassaan olevassa siemenessä alkio täyttää kirjaimellisesti kyllä koko alkio-ontelon. Valokuvausta varten siemen kuitenkin on pakko kuivata perusteellisesti, minkä jälkeen alkio täyttää keskimäärin 70 % alkio-ontelosta).
- IV Alkion pinta-ala peittää yli 70 % alkio-ontelon kuva-alasta. Tuleentunut siemen.



Liite 2.

Siementen röntgenluokittelu

- 0: tyhjä siemen, jossa kuitenkin voi olla endospermin jätteitä  
 1: alkio-ontelo on muodostunut endospermiin, mutta on tyhjä  
 2-: alkio on, mutta suurin peittää alle 1/3 alkio-ontelosta  
 2: suurin alkio peittää selvästi alle puolet alkio-ontelosta  
 2+: suurin alkio peittää likimain puolet alkio-ontelosta  
 3-: suurin alkio peittää yli puolet, mutta alle 2/3 alkio-ontelosta  
 3: alkio peittää likimain 3/4 alkio-ontelosta  
 4: alkio peittää yli 3/4 alkio-ontelosta

Lisäksi merkitään kaksi alkiota sisältävät kirjaimella d ja kolme alkiota sisältävät kirjaimella tr. Hyönteisvauriot merkitään kirjaimella T ja rikkinäiset kirjaimella R.



Liite 3.

MURASHIGE & SKOOGin ravintoalusta

A. Eriorgaaniset ravinteet

1. Makroravinteet			2. Mikroravinteet		
	mg/l	mM		mg/l	µM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	N 41,2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8	MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	22,3	100
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440	3,0	ZnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	8,6	30
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370	1,5	KJ	0,83	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,3	Na 0,20	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8	Fe 0,10	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1

B. Orgaaniset ravinteet

sakkarosi	30	g/l
agar	10	"
Edamin	1	"
myo-inositoli	100	mg/l
glysiini	2,0	"
IAA	1-30	"
kinetiini	0,04-10	"
nikotiinihappo	0,5	"
pyridoksiini HCl	0,5	"
tiamiini HCl	0,1	"

Alusta sisältää:

N	60,0	mM
K	20,0	"
Ca	3,0	"
Mg	1,5	"
S	1,6	"
P	1,25	"
Cl	6,0	"
Na	0,2	"
Fe	0,1	"

KIRJALLISUUTTA

- BARTELS, H. 1957 a. Kultur isolierter Koniferenembryonen I.  
- Naturwiss. 9:290-291.
- BARTELS, H. 1957 b. Kultur isolierter Koniferenembryonen II.  
- Naturwiss. 22: 595-596.
- BERLYN, G.P. and MIKSCH, J.P. 1965. Growth of excised pine embryos and the role of the cotyledons during germination in vitro. -Amer.J.Bot. 52 (7):730-736.
- BONGA, J.M. and FOWLER, D.P. 1970. Growth and differentiation in gametophytes of *Pinus resinosa* cultures in vitro. -Can. J.Bot. 48: 2205-2207.
- BROWN, C.L. and GIFFORD, E.M.Jr. 1958. The relation of the cotyledons to root development of pine embryos grown in vitro. -Plant Physiol. 33:57-64.
- BROWN, D.J., CANVIN, D.T. and ZILKEY, B.F. 1970. Growth and metabolism of *Ricinus communis* endosperm in tissue culture. -Can.J.Bot. 48:2323-2331.
- DOGRA, P.D. 1967. Seed sterility and disturbances in embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in Pinaceae. -Studia For. Suec. 45: 1-97.
- EHRENBERG, C. & GUSTAFSSON, Å. & PLYM FORSHELL, C. & SIMAK, M. 1955. Seed quality and the principles of forest genetics. -Hereditas 41: 291-366.
- HARVEY, A.E. 1967. Tissue culture of *Pinus monticola* on a chemically defined medium. - Can J.Bot. 45: 1783-1787.
- HEIKINHEIMO, O. 1921. Suomen metsänrajametsät ja niiden vastainen käyttö. -Comm. Inst. For.Finl. 4: 1-71.

- KUJALA, V. 1927. Untersuchungen über den Bau und die Keimfähigkeit von Kiefern- und Fichtensamen in Finnland. -Comm.Inst.For. Finl. 12: 1-106.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. -Physiol. Plant. 15:473-497.
- MÜLLER-OLSEN, C. & SIMAK, M. 1954. X-ray photography employed in germination analysis of Scots pine (*Pinus silvestris* L.) - Medd.Stat.Skogsforskn.inst.44 (6): 1-19.
- PEHAP, A. 1972. Seed eluates on the germination blotter - a germinability test ? -Studia For.Suec. 101:1-21.
- PLYM FORSHELL, C. 1953. Kottens och fröets utbildning efter själv-och korsbefruktning hos tall (*Pinus silvestris* L.). -Medd.Stat.Skogsforskn.-inst. 43 (10): 1-42.
- SACHER, J.A. 1956. Observations on pine embryos grown in vitro. - Bot.Gaz. 117:206-214.
- SIMAK, M. & GUSTAFSSON, Å. 1953 a. Röntgenfotografering av skogsträdsfrö. -Skogen 5:1-4.
- SIMAK, M. & GUSTAFSSON, Å. 1953 b. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. -Hereditas 39:458-468.
- SIMAK, M. & GUSTAFSSON, Å. 1954. Fröbeskaffenheten hos moderträd och ympar av tall. -Medd.Stat.Skogsforskn.inst.44(2):1-73.
- SINKO, M. 1969. Något om gröningsförloppet hos tallfrö i plastväxthus. - Inst. Skogsföryngr. Skogshögsk. Rapp.Upps. 15:103-108.
- WIBECK, E. 1928. Det norrländska tallfröets grobarhet och anatomiska beskaffenhet. - Norrl.Skogsv.förb.tidskr. 1:4-35.
- WHITE, P.R. 1943. A handbook of plant tissue culture. -The Ronald Press Co. N.Y. p.277.



