

Evgenia Dikareva

Erilaistumattoman metsäkuusen solukon kryopreservaatio ja fenolianalyysi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

20.12.2016

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Evgenia Dikareva Eri-laistumattoman metsäkuusen solukon kryopreservaatio ja fenolianalyysi 32 sivua + 2 liitettä 20.12.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketeknologia
Ohjaajat	Fysiologisen kasvitieteen dosentti, tutkimusryhmän johtaja, Anna Kärkönen Tuntiopettaja, FT Katri Juuti
<p>Ligniini on yleisin fenolipolymeeri maapallolla selluloosan jälkeen. Nykypäivänä ligniinillä on monta potentiaalista sovelluskäyttöä ja se on mielenkiintoon kohde monissa tutkimuksissa. Tutkimusta on helpompi toteuttaa, kun kyseessä on vain osa kasvia, eikä kokonainen puu, jonka kasvu kestää monia vuosia. Kun tutkimusryhmä on löytänyt solukkoa, jolla on kaikki halutut ominaisuudet (tässä tapauksessa ligniinin tuotanto kasvatusalustaan), sitä olisi hyvä oppia säilyttämään tulevia tutkimuksia varten muuttumattomana – kryopreservaation eli kylmäsäilytyksen kautta. Työn tavoitteena oli selvittää, vaikuttavatko valon määrä ja kasvihormonin (auksiinin) määrä metsäkuusen solujen selviytymiseen kryopreservaatiosta.</p> <p>Solukot jaettiin ryhmiin: toinen ryhmä oli kasvatettu jatkuvassa valossa ja toinen ryhmä ryt-mivalossa (16 h valoa / 8 h pimeää). Jokainen pääryhmistä jaettiin alaryhmiin: toinen osa kasvoi normaalilla määrällä auksiinilla (0,01 mM) ja toinen puolella normaalista määrästä (0,005 mM).</p> <p>Työn aikana huomattiin, että tietyt solukot (kryopreservaation jälkeen ruskeaksi muuttuvat solukot) selviytyvät paremmin kuin vaaleaksi muuttuva solukko. Oletettiin, että värimuutos johtuu fenolien hapetuksesta kryopreservaation aikana, ja mitä enemmän fenoleja sitä pa-rempi mahdollisuus selviytyä. Tätä päätettiin tutkia tarkemmin fenolianalyysin avulla. Kirjal-lisuudessa on kuvattu useita fenolianalyyseja erilaisille kasvityypeille, huomattavan suuri osa työstä oli menetelmän optimointia metsäkuusisolukoille.</p> <p>Saadut tulokset analysoitiin SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) -ohjelmis-tolla. Fenolianalyysin tulokset jaettiin kasvatusolosuhteiden perusteella valoryhmään, auksii-niryhmään ja solutyypiryhmään. Tulosten tarkastelussa hyödynnettiin Shapiro- Wilk -testiä ja Mann-Whitney U -testiä. Tulokset analysoitiin ja niitä verrattiin ryhmien sisällä.</p> <p>Mann-Whitney U -testin perusteella valolla ja auksiinilla ei ollut vaikutusta selviytymiseen kryopreservaatiosta. Sen sijaan solukkotyyppillä oli merkitystä selviytymiseen kryopreservaatiosta. Sama pätee fenolipitoisuuksiin: solukkotyyppien fenolipitoisuuksilla oli merkitsevä ero.</p>	
Avainsanat	Kryopreservaatio, fenolianalyysi, ligniini, metsäkuusi

Author Title Number of Pages Date	Evgenia Dikareva Cryopreservation of undifferentiated spruce cell culture and phenol analysis 32 pages + 2 appendices 20 December 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio Technology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedical Technology
Instructors	Anna Kärkönen, PhD, Docent, Research Group Leader Katri Juuti, Lecturer, Ph.D.
<p>Lignin is one of the most abundant phenolic polymers on Earth after the cellulose. Nowadays, lignin has many potential applications, and it is a research interest for many researches. The scientific research is easier to implement when only a part of a plant is in use, instead of a whole tree. When the research team has found a callus suitable for the research, with desired qualities (in this case - lignin production into culture media), it would be necessary to learn how to preserve the callus for future studies. Cryopreservation or cold storage is the most popular way of long-time storage. The goal of this thesis was to find out if the amount of light, a type of the callus and a plant hormone (auxin) have an impact on survival from cryopreservation of undifferentiated spruce callus.</p> <p>The spruce callus was divided into two groups: the first group had been growing in a continuous light and the second group under a regime light (16 h light / 8 h dark). Each of the main groups was divided into subgroups: the first subgroup was growing on the normal amount of auxin (0,01 mM) and the second subgroup on the half of the normal amount (0,005 mM).</p> <p>During the experiment, certain calluses became brown (they were named hard calluses) after the cryopreservation and survived at a better rate than the callus that turned pale (soft callus). It was assumed that the reason for the change of the color was the oxidation of phenols in callus during cryopreservation. Somehow intracellular phenols helped the callus to survive from cryopreservation. It was decided to examine the finding in more detail by means of phenol analysis. There are a number of phenol analyzing methods available. The optimization of the method for spruce cells consumed a significant amount of time.</p> <p>The results of phenol analysis and the results from cryopreservation were divided into groups according to the amount of light, the amount of auxin and the type of the callus. The results were analyzed using an SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) tool within these groups (hard callus vs. soft; regime light vs. continuous light and normal auxin vs. half of the amount). Shapiro- Wilk's test was used to check the normal distribution of the results. Non-parametric Mann-Whitney U test were used to determine if there were any differences in the equality of medians.</p> <p>Mann-Whitney U-test showed that the light and the auxin had no effect on survival from cryopreservation. Instead, the type of callus had an impact on surviving rate. The same was true for the phenol analysis: the distribution of phenols was not the same across the categories of callus type.</p>	
Keywords	Cryopreservation, phenol analysis, lignin, Norway spruce

Sisällys

Lyhenteet ja käsitteet

1	Johdanto	1
2	Johdatus metsäkuusen biologiaan	2
2.1	Metsäkuusi	2
2.2	Erileistumaton kasvisolukko	2
2.3	Erileistumaton metsäkuusen solulinja	3
2.4	Kasvisolun erikoispiirteet	3
2.4.1	Vakuoli	3
2.4.2	Kasvisolun soluseinän rakenne	4
2.4.3	Ligniinin biosynteesi	7
2.4.4	Fenolihdisteet	7
3	Taustatiedot käytetyistä tekniikoista ja menetelmistä	9
3.1	Kryopreservatio	9
3.2	Fenolianalyysi	10
3.3	Folin-Ciocalteu-menetelmä (FC-menetelmä)	10
4	Tutkimusmenetelmät	11
4.1	Selukoiden kasvatusolosuhteet	11
4.2	Metsäkuusisolukon kryopreservatation menetelmä	12
4.2.1	Kryopreservatation menettelytapa	12
4.2.2	Kryopreservatation jälkitestaus	14
4.3	Fenolianalyysin menetelmä	15
4.3.1	Menetelmän optimointi	16
4.3.2	Askorbiinihapon vaikutus mittauksiin	17
4.3.3	Fenolianalyysin menettelytapa	17
4.4	Tilastollinen analyysi	19
5	Tulokset	20
5.1	Kryopreservatation tulokset	20
5.2	Kryopreservatation tulosten tilastollinen analysointi	22
5.3	Liuoskasvatuksen tulokset	23
5.4	Fenolianalyysin optimointitulokset	24

5.5	Fenolianalyysin tulokset	27
5.6	Fenolianalyysin tulosten tilastollinen analysointi	28
6	Yhteenveto ja pohdinta	29
	Lähteet	30
	Liitteet	
	Liite 1. Kasvatusalustojen reseptit	
	Liite 2. Kryopreservaation ja fenolianalyysin tilastollisen analyysin tulokset	

Lyhenteet ja käsitteet

<i>2,4-D</i>	2,4-dikloorifenoksisietikkahappo, (2,4- dichlorophenoxyacetic acid), synteettinen auksiini, kasvihormoni
<i>DMSO</i>	Dimetyylisulfoksidi
<i>FC-menetelmä</i>	Folin-Ciocalteu-menetelmä
<i>in vitro</i>	Tutkimus elävän organismin ulkopuolella, esim. lasissa, koeputkessa, petrimaljassa.
<i>Kinetiini</i>	Kasvihormoni, joka kuuluu sytokiniineihin ja edistää solujen jakautumista.
<i>MilliQ-vesi</i>	Suodatettu ja puhdistettu vesi.
<i>N, mN</i>	Normaalisuus (tässä työssä: Folin-Ciocalteu reagenssin sisältämän hapon suhteeseen)
<i>PVS2</i>	Plant vitrification solution 2 -vitrifikaatioliuos.
<i>Rytmivalo</i>	16 h valoa / 8 h pimeää.
<i>TPC</i>	<i>Total Phenolic Content</i> – kokonaisfenoliyhdisteet
<i>Vitrifikaatio</i>	Jäähdyttämisen tekniikka, jossa aine kiteytyy ilman jääkiteiden muodostumista

1 Johdanto

Tämä insinööri työ tehtiin syksyllä 2015 erikoistutkijan Anna Kärkönen tutkimusryhmässä, joka kuuluu Helsingin yliopiston Maataloustieteiden laitokseen. Tutkimusryhmä keskittyy ligniinibiosynteesiin ja solunulkoisen ligniinin rakenteeseen.

Ligniini on fenolipolymeeri, joka esiintyy tiettyjen solutyypin soluseinässä. Ligniinin mahdolliset sovellukset ovat herättäneet kiinnostusta sekä tieteellisessä maailmassa että teollisuudessa. Ligniinin käyttömahdollisuudet ovat laajat: ligniinistä voidaan valmistaa biopoltoainetta; ligniiniä voidaan käyttää eristeenä, komposiitti- ja älymateriaalina elektroniikassa ja liima-aineena, biomuovina; ligniinin aromaattisia osia (esim. vanilliinia) voidaan myös käyttää aromeina. Sekä myös ligniinin poistaminen on tärkeä paperin valmistuksessa. Taloudessa ligniinillä on omat miinuksensa: se häiritsee hiilihydraattien imeytymistä lypsy- ja lihakarjan pötsissä. Tutkimuksen avulla yritetään löytää ympäristöystävällistä käyttöä ligniinille ja siitä, miten sitä voidaan hyödyntää taloudessa. Ligniinin kemiallista koostumusta on tutkittu Suomessa mm. Helsingin yliopistossa, MTT:ssä ja Oulun yliopistossa. [1]

Tutkimusryhmässä on käytössä metsäkuusen (*Picea abies*) erilaistumattoman solukon solulinja A3/85, jolla on monia hyviä ominaisuuksia. [2] Solulinja erittää ligniiniä suoraan kasvatusalustaan, ja solujen erilaistumisprosentti on alhainen. Kuukausittainen solukon ylläpito siirrostus on aikaa vievä. Solulinjan pakastaminen sellaisenaan olisi hyödyllisempää, sillä pakastettu solukko säilyisi muuttumattomana monia vuosia tutkimuksia varten eikä vaatisi mitään hoitoa. Tämän insinööri työn alkuperäinen tarkoitus oli tutkia valon ja kasvihormoni auksiinin vaikutusta metsäkuusen solukon selviytymiseen pakastamisesta eli kryopreservatiosta. [3]

Työn aikana havaittiin mielenkiintoinen korrelaatio solukon morfologian ja selviytymisen välillä. Tästä on syntynyt insinööri työn toinen tarkoitus eli solukoiden fenolianalyysi. Päätettiin tutkia solunsisäiset fenolit Folin-Ciocalteu-menetelmällä (FC-menetelmä). Menetelmä perustuu kemialliseen reaktioon, jossa fenolit reagoivat reagenssin kanssa, tarkkaan säädetyissä olosuhteissa. Reaktion lopputulosta havainnoidaan värimuutoksena, jota mitataan spektrofotometrillä.

2 Johdatus metsäkuusen biologiaan

2.1 Metsäkuusi

Metsäkuusi on toiseksi yleisin puulaji Suomessa männyn jälkeen, ja se ilmestyi maapalolle yli 200 miljoona vuotta sitten. Metsäkuusi on tullut Suomen noin 5000 vuotta sitten, ja sen nykypäivän levinneisyysalue ulottuu Ahvenanmaalta tuntureille asti. [4; 5] Metsäkuusella on suuri ekologinen ja taloudellinen merkitys. Metsäkuusi on avainlaji monissa ekosysteemeissä eli sellainen laji, jonka esiintyminen hyödyttää useita muita lajeja ja vaikuttaa voimakkaasti ekosysteemin ja eliöyhteisön toimintaan. Metsäkuusia on käytetty rakennuspuuna, kuiduntuottajana ja polttopuuna. [5; 6, s. 22] Suurin osa hakatusta kuusesta käytetään mekaanisen massan valmistuksessa ja siitä tehdään esim. sanomalehteä [7]. Paperiteollisuutta Suomessa on ollut pitkän aikaa, ja metsäkuusi on yksi tärkeimmistä vientituotteista: kuusisellusta saadaan hienolaatuista paperia ja viskoosikuitua [6, s. 22; 8].

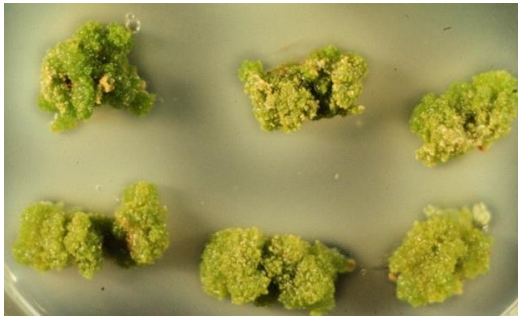
2.2 Erilaistumaton kasvisolukko

Nykyään useimmiten tutkimuksissa ja bioteknologiassa käytetään kasvin erilaistumattomaa solukkoa. Kaksi asiaa mahdollistivat sen: aukiinin löytö vuonna 1939 ja ajatus siitä, että kasvin metaboliittia voidaan tuottaa myös solukkoviljelmässä bioreaktorissa. [9, s. 141] Tärkeimmät edut erilaistumattoman solukon käytössä verrattuna kasvin osiin on se, että metaboliittien tuotanto on ilmastosta riippumaton, kasvatusolosuhteet ovat tarkkaan määriteltyjä ja steriilejä ja tuotteiden eristäminen on nopeampaa. Kasvisolukon viljelmä on hyvä vaihtoehto esim. terapeuttisten proteiinien tuotannossa. [9, s. 142] Eläinsolut voivat kontaminoitua mikro-organismeilla (virukset, bakteerit, prionit), jotka voivat olla vaarallisia myös ihmisille. Toisaalta riski GMO-kasvien pääsystä ympäristöön häviää (kasvisolukko ei tuota siemeniä eikä siitepölyä). Proteiinin glykosylaatio on tärkeä proteiinien valmistuksessa ja esim. bakteerit eivät osaa glykosyloidia proteiineja ollenkaan ja hiiva voi joskus yliglykosyloidia tuotantoproteiinia. [9, s. 143] Hyvä esimerkki kasvisolukoiden käytöstä lääketeollisuudella on tuote ELELYSO, valmiste on jo markkinoilla. Se on terapeuttinen entsyymi (taliglyseraasi-alfa), joka on tuotettu porkkanan soluissa. Sillä hoidetaan Gaucherin taudin ykköstyppiä. [11]

Kun on löydetty solulinja, jossa on hyvät ominaisuudet ja metaboliittien tuotanto, on tärkeä säilyttää tämä solulinja muuttumattomana. Kryopreservatio on kaikista paras vaihtoehto solukon säilymiselle. [9, s. 144]

2.3 Erilaistumaton metsäkuusen solulinja

Vuonna 1985 Helsingin yliopiston professori Liisa Simola aloitti metsäkuusen *in vitro* solulinjan A3/85 metsäkuusen tsygoottisesta alkioista [2]. *In vitro* -menetelmässä tutkimus tapahtuu elävän organismin ulkopuolella, esim. lasissa, koeputkessa tai petriمالjassa. Solulinjan erikoispiirre on runsas ligniinin tuotanto kasvatusalustaan (kuva 1). [2] Sen vuoksi tätä solulinjaa käytettiin tässä insinööriyössä. Toisena solulinjan etuna oli se, että vain kolme prosenttia soluista erilaistuu trakeideiksi eli putkisoluiksi. Ligniinin solun ulkopuolinen tuotanto mahdollisti muokkaamattoman ligniinin tutkimusta, ilman erikoista käsittelyä, eristämistä ja puhdistamista. [2, s. 378]



Kuva 1. Metsäkuusen solulinja A3/85, ligniini on eritetty kasvatusalustaan (näkyvä kuvassa valkoisena). [12]

2.4 Kasvisolun erikoispiirteet

Kasvisoluissa on muutama rakenne, joita ei ole esim. eläinsolussa: soluseinä ja solunsisäinen vakuoli. Vakuoleilla on suuri vaikutus kryopreservatation onnistumiseen.

2.4.1 Vakuoli

Vakuoli eli solunesterakkula on solulimakalvostosta ja Golgin laiteesta eli diktyosomista erilaistunut ontelo. Aineiden kuljetus nesterakkulaan on valikoivaa ja vakuolin sisältö

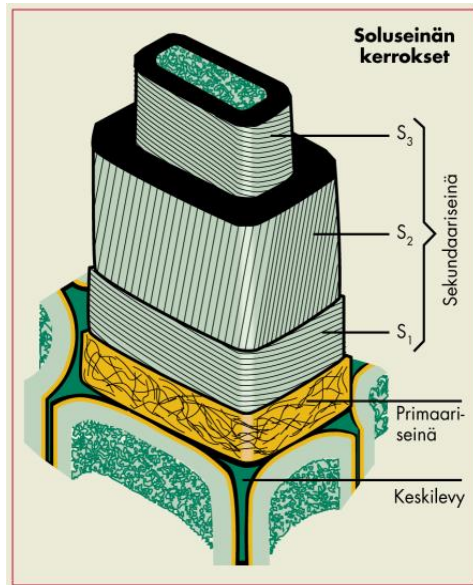
eroaa soluliman koostumuksesta. [13, s. 153] Vakuolin tehtävä riippuu solutyypistä, joissain kasveissa vakuoleilla on samanlainen funktio kuin lysosomeilla eläinsoluissa, jolloin niiden päärooli on entsyymaattinen hajotus. Vakuoli voi myös toimia varastona ja varastoida esim. proteiineja (esim. siemenissä), hydrolyyttisiä proteiineja, epäorgaanisia ioneja, kuten kaliumia ja kloridia. Se voi sisältää puolustusaineita ja myrkyjä kasvissyöjää vastaan tai se voi myös varastoida pölyttäjiä houkuttelevia väriaineita (esim. terälehdissä). Täysin kehittyneissä kasvisoluissa vakuolit yhdistyvät yhdeksi isoksi vakuoliksi eli keskusvakuoliksi. Keskusvakuoli kasvaa kokoonsa imemällä vettä itseensä. [13, s. 154; 14, s. 90]

2.4.2 Kasvisolun soluseinän rakenne

Kasvisolun erikoispiirre on soluseinä, se on paksumpi kuin solukalvo. Solukalvon paksuus vaihtelee 0,1 μm :sta muutamaa mikrometriin. Soluseinällä on tärkeä rooli mm. solun muodon ylläpidossa ja kasvin puolustuksessa. Elävissä soluissa soluseinä vaikuttaa solun kehitykseen ja solun morfologiaan. [13, s. 164; 15, s. 52] Kasvien evoluution aikana soluseinän kehittyminen antoi kasveille mahdollisuuden nousta vedestä maalle ja vastustaa gravitaatiovoimaa [12, s. 1; 16]. Nuoria soluja ympäröi taipuisa primäärisoluseinä. Viereisen solujen välillä on keskilevy ja solut on yhdistetty toisiinsa plasmodesmien kautta. Plasmodesmi on soluseinän aukko, joka yhdistää kahden solun solulimat. Plasmodesmi sallii veden ja muiden pienten molekyylien kulkemista vapaasti solusta toiseen. [13, s. 164–167; 15, s. 53]

Soluseinän koostumus vaihtelee eri lajien ja solutyypin välillä. Soluseinän komponentteina on mm. fenolisia yhdisteitä, polysakkarideja, vettä, pektiiniä ja proteiineja. [1, s. 15; 15, s. 53] Selluloosa on runsain polymeeri maapallolla ja perusta soluseinälle. Soluseinässä selluloosa on mikrofibrillin muodossa: kymmenet β -1,4-D-glukaaniketjut ovat muodostaneet vetysidoksia toistensa kanssa koko ketjun pituudelta. [15, s. 61] Jotta selluloosan rakenne pysyisi **kasassa**, sitä vahvistetaan ja kytketään yhteen ristiliitoksilla muiden polysakkaridien avulla. Yleisin heterogeeninen ryhmä, joka sitoo selluloosapolymeerejä yhteen vetysidoksilla, on hemiselluloosa. [15, s. 64] Geelimäinen pektiinimatriisi pitää hemiselluloosan ja selluloosan rakenteita yhdessä. Pektiniitit ovat laaja, haaroittuneiden polysakkaridien ryhmä, joissa on runsaasti galakturonihappoa. Muiden fysiologisten toimintojen lisäksi pektiini säätelee soluseinän huokoisuutta, soluseinän varausta, ionitasapainoa, solujen välistä tarttumista toisiinsa (keskilevyn kautta) ja pektiinit myös toi-

mivat hälyttimenä patogeenien invaasiassa. Kaikkein runsaimmin pektiiniä on keskilevyssä. [15, s. 65–68; 12, s. 3] Soluseinässä on paljon erilaisia usein glykosyloituneita proteiineja, kuten entsyymejä (peroksidaaseja) ja rakenneproteiineja. Elävän kasvisolun seinässä on myös vettä. [1, s. 15]



Kuva 2. Soluseinän kerrokset. Kuva perustuu Cote ym. (1967) julkaisuun, kuva on tehty Tommi Salosen toimesta, METLA.

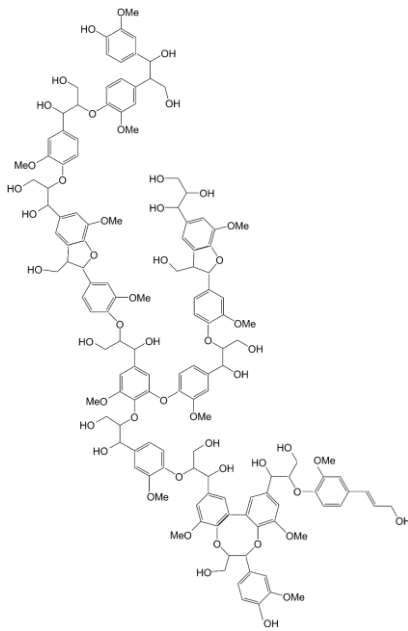
Vain tiettyihin soluihin soluseinä muodostuu erilaistumisen aikana sekundaarinen soluseinä ja mikä kerrostuu sisäänpäin. Sekundaarinen soluseinä koostuu kolmesta kerroksesta: S1, S2 and S3 (kuva 2). Solussa se sijaitsee solukalvon ja primäärisoluseinän välillä. Soluseinän komponentit järjestäytyvät verkkomaisesti ja liittyvät toisiinsa useimmiten vetysidoksilla, sillä primäärisen soluseinän selluloosa on järjestäytynyt epäsäännöllisesti ja sekundaarisessa soluseinässä se on asettautunut yhteen suuntaan. [15]

On muutamia solutyyppiä, joissa sekundaarinen soluseinä esiintyy. Sekundaarista soluseinää muodostuu, kun soluseinään kertyy ligniiniä. Tätä prosessia kutsutaan lignifioitumiseksi eli puutumiseksi. Yleensä nämä solut kuolevat soluseinän puutumisen päättyessä. Hyvä esimerkki siitä on puusolukon (ksyleemin) havupuiden putkilosolut (trakeidit) ja lehtipuiden putkilot (engl. vessels). Nämä solut ovat onttoja, putkimaisia ja pitkänomaisia, ja niiden päätehtävä on veden johtaminen juuresta latvaan. Ksyleemissä solujen soluseinä on puutunut ja paksuuntunut, sillä solut joutuvat kestäämään suurta jännitystä,

samalla paksu soluseinä tukee kasvia. Putkiloiden erikoispiirre on perforaatiolevy (aukkolevy/ reikälevy) solun päissä, joka mahdollistaa veden vapaan kulkemisen. [13, s. 791; 12, s. 1]

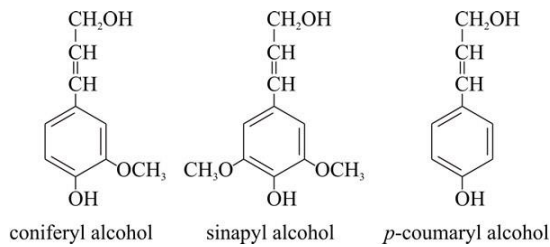
Tukisolukossa (sklerenkyymissä) on myös puutunut sekundäärinen soluseinä. Kuolleet solut kuten kivilolut (sklereidit) ja syyt (engl. fibre) vahvistavat kasvin osia, jotka eivät kasva pituutta enää. Kiviloluilla on paksumpi soluseinä, ja ne ovat epäsäännöllisempiä kuin syyt. [13, s. 790]

Ligniini (kuva 3) esiintyy soluseinässä kaikissa putkilokasveissa [12, s. 1]. Noin 30 % puuvartisten kasvien solujen kuivamassasta on ligniiniä, se on toiseksi runsain polymeeri maapallolla [1, s. 15]. Ligniini antaa jäykkyyttä ja tukea solulle ja tekee solusta vettä läpäisemättömän [17, s. 176]. Ligniinillä on mm. rooli kasvin puolustuksessa patogeenejä vastaan (esim. lahottajilta). Puutuminen voi alkaa joko solun kehityksen aikana (hormonien vaikutuksesta) tai reaktiona vaurioitumiseen tai patogeenin hyökkäykseen. [12, s. 1; 17, s. 177]



Kuva 3. Ligniinin rakenne [18]

2.4.3 Ligniinin biosynteesi



Kuva 4. Ligniinin pääalaysiköiden rakenne

Ennen solun puutumista solussa tapahtuu peruuttamattomia muutoksia. Solun primäärisoluseinä laajenee; sekundaarinen seinä paksuntuu ja sen polymeerit (kuten selluloosa) kerrostuvat tietyssä järjestyksessä. [15, s. 1296–1297] Ligniinin esiasteen tuotanto tapahtuu sytoplasmassa eli solulimassa. Sytoplasmasta esiasteet kuljetetaan soluseinään ja hapetetaan peroksidaasien ja lakkaasien avulla ligniinipolymeeriksi. Ligniini on hydrofobinen fenolipolymeeri, joka koostuu kolmesta alkoholi alaysiköistä: p-kumaryylialkoholi, koniferyylialkoholi, ja sinapyylialkoholi (kuva 4). [12, s. 1, 3] Alaysiköiden yhteispiirre on kolmi-hiilinen sivuketju, joka on kiinni aromaattisessa renkaassa. [19, s. 1001] Ligniinin tuotanto ja siitä johtuva solun puutuminen alkaa keskilevystä ja solun kulmista ja etenee solun sisäänpäin, lopputuloksena on aina solukuolema. Ligniini täyttää vapaana olevaa tilaa selluloosan, hemiselluloosan ja pektiinin välillä. [12, s. 3]

2.4.4 Fenolihdisteet

Putkilokasvit, johon metsäkuusi kuuluu, voivat tuottaa orgaanisia molekyyliä, joita kutsutaan sekundaarisiksi metaboliiteiksi, näitä ovat esim. fenolihdisteet. Näillä aineilla on monta eri roolia kehityksessä ja puolustuksessa kasvin eri kehitysvaiheessa. Fenoleja voidaan jakaa monofenoleiksi ja polyfenoleiksi (yhdisteet, jotka sisältävät eri määrää alaysikköitä). Veteen liukenemattomat fenolit sijaitsevat soluseinässä ja veteen liukenevat fenolit vakuoleissa. [20, s. 3268–3269] Kasvit tuottavat fenolihdisteitä reaktionä stressiin, kuten UV-säteilyyn, vaurioitumiseen, patogeenin tai hyönteisen hyökkäykseen. Kasvin fenolihdisteiden perusrakenne sisältää aromaattisen renkaan ja yhden tai useamman hydroksyyli ryhmän. Fenoleihin kuuluvat mm. yksinkertaiset fenolit, ligniinit, kumariinit, lignaanit, tanniinit, monofenolit, polyfenolit, fenolihapot ja flavonoidit. [21, s. 2329]

Flavonoidit (2 alayksikköä) ja tanniinit (3 tai enemmän alayksikköä) kuuluvat polyfenoli-ryhmään. Flavonoidit ovat yleisin edustettu väriaineryhmä kasvikunnassa lehtivihreän ja karotenoidien lisäksi. Antosyaanit, jotka kuuluvat flavonoideihin, toimivat antioksidanttina, neutralisoimalla reaktiivista happiradikaalia, joka syntyy yhteyttämisen yhteydessä. [20, s. 3268–3269]

3 Taustatiedot käytetyistä tekniikoista ja menetelmistä

3.1 Kryopreservatio

Kryopreservatio (ts. kylmäsäilytys tai syväjääditys) on tehokas ja pitkäaikainen tapa säilyttää biologista materiaalia ilman haitallista solun sisäistä jäädystä. Eniten käytetyt tekniikoita ovat säädetty hidas jäätyminen (engl. controlled rate cooling) ja vitrifikaatio. Kryopreservatation menetelmä perustuu dehydraatioon: vettä näytteessä korvataan suoja-aineilla (ts. jäätymisestoaineilla) ja näytteitä alijäähdytetään joko nopeasti tai hitaasti, menetelmästä riippuen. [10, s. 34] Suoja-aineena voi toimia esim. glyseroli, etyleeniglykoli, sakkaroosi, dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja niiden seokset. Näytteitä säilytetään pienissä erissä ja melko pienissä tiloissa. Myöskään ylläpito ja laitteiston huollot eivät ole vaativia. [10, s. 33, 35; 22, s. 31]

Säädetyssä jäätymisessä näytettä käsitellään suoja-aineilla ja hitaasti (-1 °C minuutissa) jäädytetään -40 °C:seen. Jään muodostuminen alkaa -9 °C:ssa solun solujenvälisessä tilassa. Solulimaan liuenneet aineet väkevöityvät ja estävät jäätymistä. Soluseinä suojaa solua jääkiteiltä. Kun jäätyminen jatkuu alle -9 °C:n, solujenvälinen tila on niin jääkiteytynyt, että solulima luovuttaa sille lisää vettä ja väkevöityy enemmän. [9; 10]

Neste voi muuttua kiinteään olomuotoon kahdella tavalla. Kun neste muuttuu jääkiteiksi, sitä kutsutaan jäänmuodostumiseksi. Jos jäänmuodostuminen tapahtuu solun sisällä, solu kuolee, koska jääkiteet tuhoavat solun rakenteita. Kasvisolun vakuoli sisältää runsaasti vettä, sen takia kasvisolun pakastus on haastava tehtävä. [9, s. 146] Vitrifikaatiossa näytettä jäädytetään nopeasti -196 °C:seen ja nesteen olomuodon vaihto tapahtuu eri tavalla. Vitrifikaatio eroaa jäänmuodostuksesta sillä, että hyvin konsentroitunut suoja-aine jäätyy nopeasti ja muuttuu metastabiiliksi (ylikyllästetyksi) lasiksi ilman kiteytymistä sekä jääkiteiksi muodostumista. Lasi on aineen kiinteä muoto, joka on ei-kiteinen ja amorfinen. Lasin muodostuminen johtaa solun vakaaseen leptilaan. Vettä on hankala muuttaa lasiksi, sillä jääkiteiden muodostumisen nopeus on suuri. Sen sijaan jäätymisestoaineet ovat hyvin viskoosisia. Jäätymisessä muodostunut lasi on erittäin viskoosinen, siitä johtuen molekyylien liike hidastuu ja solun kaikki kemialliset reaktiot pysähtyvät. Toinen vitrifikaation hyödyllinen puoli on se, että lasin muodostuminen saattaa estää kudoksen/solukon luhistumista, soluliman liuenneiden aineiden väkevöitymistä ja pH:n muutosta. [10, s. 34, 36]

Kryopreservatio on suuri stressi soluille. Solujen selviytyminen kryopreservatiosta riippuu mm. aineenvaihduntatuotteiden tuotannosta, solun muodosta, veden määrästä ja aineenvaihdunnan kapasiteetista. [9, s. 146]

3.2 Fenolianalyysi

Fenolianalyysimenetelmät ovat laajasti käytössä elintarviketeollisuudessa. Useimmiten fenoleja analysoidaan ruoasta (hedelmistä, viljasta, pavuista, vihanneksista) ja juomista (kahvista, teestä, kaakaosta, viineistä, mehuista). [21, s. 2330]

3.3 Folin-Ciocalteu-menetelmä (FC-menetelmä)

Ensimmäisen fenolianalyysireagenssin kehittivät tutkijat Folin ja Denis. Reagenssissa olevat molybdeeni- ja wolframifosfaatti reagoivat tyrosiinin kanssa ja liuos muuttuu siniseksi, proteiinien läsnä ollessa. [23, s. 154] Tutkijat Folin ja Ciocalteu paransivat reagenssin koostumusta kasvattamalla molybdeenin osuutta ja lisäämällä litiumsulfaattia reagenssiin. Litiumsulfaatti esti aineiden saostumista, joka häiritsee mittauksia. [23, s. 155] FC-menetelmä on kolorimetrinen menetelmä eli väri-indikaattorimenetelmä, jossa kahden aineen reaktion tuloksena on havaittava värimuutos (liuos muuttuu siniseksi), joka on verrannollinen tutkittavaan aineen määrään. [24, s. 5990]

Jotkut fenolit (fenoliset alkoholit, osa flavonoideista, fenolihapot) sisältävät OH-ryhmän, joka FC-reaktiossa on elektronin luovuttaja [21, s. 2329]. FC-reagenssi pelkistyy ja fenolit hapettuvat, mutta tarkkaan reaktion mekanismia ei tiedetä. FC-reaktio tapahtuu alkalisissa olosuhteissa, jotka saavutetaan lisäämällä natriumkarbonaattia (Na_2CO_3). Kun pH on noin 10, fenolihapot ja -alkoholit muuttuvat fenolaatti-ioneiksi ja pelkistävät FC-reagenssin. Väriin muutosta mitattiin spektrofotometrillä. FC-menetelmä ei ole hyvin spesifinen ja muut aineet (esim. askorbiinihappo, pelkistävät sokerit) fenolien lisäksi voivat reagoida reagenssin kanssa ja väärentää tuloksia. [24, s. 5991]

4 Tutkimusmenetelmät

4.1 Solukoiden kasvatusolosuhteet

Tätä insinööriyötä tehtäessä käytettiin metsäkuusen solukoita erilaisista kasvuolosuhteista. Käytetyn kasvatusalustan koostumus on esitetty liitteessä 1. Solukot jaettiin kahteen ryhmään: toinen kasvatettiin jatkuvassa valossa toinen rytmivalossa (16 h valoa / 8 h pimeää). Molemmissa tapauksissa käytettiin Osram warm white -lamppuja (noin 20–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Toinen osatekijä oli auksiinin määrä, työssä käytettiin auksiinin syntetistä vastinetta 2,4-dikloorifenoksietikkahappoa (2,4-D:ta). Auksiini on kasvihormoni, joka edistää monia fysiologisia tapahtumia, mm. apikaalista kasvua (eli kärjessä tapahtuva kasvu) versoissa, solujen erilaistumista ja jakautumista. Auksiinin käytössä pitää olla varovainen, sillä isoina pitoisuuksina se voi toimia torjunta-aineena. [15, s. 884; 25, s. 15–16] Kaikki käytetyt olosudehydistelmät on esitetty taulukossa 1. Auksiinin lisäksi kasvatusliuoksiin oli lisätty kinetiiniä. Se on kasvihormoni, joka kuuluu sytokiniineihin ja edistää solun jakautumista. [15, s. 873–874] Työskentelytapojen on oltava aseptiset, koska sieni- tai bakteerikasvusto voittaa kasvussa hitaasti kasvavan metsäkuusen solukon [9, s. 144].

Kokeisiin otettiin ne solukot, jotka olivat eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, silloin solut ovat kaikista optimaalisessa fysiologisessa tilassa. Kasvisolujen kuten bakteerisolujen kasvu tapahtuu eri vaiheiden kautta: lag-vaihe, eksponentiaalisen kasvun vaihe, stationäärivaihe ja kuolinvaihe. [26] Kaikista sopivimmat ovat ne solut, jotka ovat eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa. Metsäkuusen solukolla se on kahden viikon päästä siirrosta.

Taulukko 1. Yhteenveto kaikista olosuhde-kombinaatioista, joita on käytetty kryopreservaatiossa, jälkitesauksessa ja fenolianalysissa. Kombinaatiot on numeroitu 1–6.

Pehmeä solukko		Kova solukko		
Auksiini	Valo Rytmivalo 16 h valoa / 8 h pimeää	Auksiini	Jatkuva valo	Rytmivalo 16 h valoa / 8 h pimeää
Normaali määrä (0,01 mM)	Kryo, 1 liuoskontrolli, varsinainen kontrolli	Normaali määrä (0,01 mM)	Kryo, 3 liuoskontrolli, varsinainen kont- rolli	Kryo, 5 liuoskontrolli, varsinainen kont- rolli
1/2 määrä (0,005 mM)	Kryo, 2 liuoskontrolli, varsinainen kontrolli	1/2 määrä (0,005 mM)	Kryo, 4 liuoskontrolli, varsinainen kont- rolli	Kryo, 6 liuoskontrolli, varsinainen kont- rolli

4.2 Metsäkuusisolukon kryopreservaatoin menetelmä

Kryopreservaatoin ensimmäinen askel on solukoiden esikasvatus kasvatusalustalla, joka sisältää osmoottisesti aktiivista ainetta – sakkaroosia [10, s. 35]. Esikasvatuksessa solukko erittää vettä kasvatusalustaan, joten veden määrä soluissa pienenee. Seuraavaksi solukoita altistetaan osmoosiliuksella, joka sisältää glyserolia ja sakkaroosia. Käsitteilyllä parannetaan solujen osmolariteettia ja toleranssia dehydraatiolle. [10, s. 35, 43] Varsinainen dehydraatio tapahtuu, kun soluja käsitellään PVS2-liuksella (plant vitrification solution 2). Käsitteilyn ajalla on merkitystä vitrifikaation onnistumisessa, sillä PVS2 sisältää toksisia aineita. [10, s. 44]

Kun käsittely on tehty, solut jäädytetään nopeasti nestetyypen avulla. Samoin solujen sulattamisen on oltava nopeaa, jotta jääkiteitä ei ehtisi muodostua. [10, s. 35–36] Kryopreservaatoin aikana kryoputket viedään pois laminaarikaapista epästeriiliin ympäristöön, esim. kun näytteet siirretään nestetyypen. Välttääkseen kontaminaatiota on tärkeä desinfioida putket ja muut tarvikkeet 70-prosenttisella etanolilla. [9, s. 150] Soluja pestään pesuliuksella sulattamisen jälkeen mahdollisimman nopeasti. Solut siirretään suodatinpaperille kasvatusalustalla. [10, s. 36]

4.2.1 Kryopreservaatoin menettelytapa

Menettelytapa perustuu japanilaisen tutkijan Sakain menetelmään. [10, s. 33–57]

Materiaalit ja reagenssit:

Latausliuos 1 (loading solution): kasvatusliuos 2-N (liite 1), jossa on 0,4 M sakkaroosi, 2 M glyseroli; ilman kinetiiniä ja 2,4-D:ta.

PVS2-liuos: kasvatusliuos 2-N, jossa on 4,7 M glyseroli, 5,2 M etyleeniglykoli, 0,4 M sakkaroosi; ilman kinetiiniä ja 2,4-D:ta. 2,1 M DMSO:n lisäys autoklavoinnin jälkeen.

Pesuliuos 2 (unloading solution): kasvatusliuos 2-N, jossa on 1,2 M sakkaroosi ja 2 M glyseroli.

Kasvatusalusta 1: kasvatusalusta 2-N (liite 1), jossa on 0,2 M sakkaroosi

Kasvatusalusta 2: kasvatusalusta 2-N, jossa on 0,4 M sakkaroosi

Menettelytapa:

Kokeissa oli kahdenlaisia kontrolleja. Ensimmäiseen ryhmään kuuluivat saman erän solukot, jotka eivät käyneet läpi mitään käsittelyä (3 kpl.). Toinen ryhmä koostui liuoskontrolleista. Nämä solukot olivat käyneet kaikki vaiheet läpi, paitsi varsinaista pakastusta (ohjeessa vaiheet 6 ja 7). Tavallisesti kokeeseen otettiin kolme palaa solukkoa liuoskontrollina ja 8 – 12 palaa pakastukseen. Esikasvatukset 0,2 M ja 0,4 M sakkaroosi-alustalla kestivät 48 tuntia yhteensä. Itse kryopreservatio kesti noin 4-6 tuntia, sekä jälkikasvatus oli 24 tuntinen.

1. Kaksiviikkoisia solukoita esikasvatettiin 0,2 M sakkaroosialustalla, valorytmissä (joko jatkuvassa valossa tai rytmivalossa: 16 h valoa / 8 h pimeää), +25 °C:ssa, vuorokauden ajan.
2. Siirrettiin solukot 0,4 M alustalle vuorokaudeksi.
3. Tästä alkaen kaikki tapahtui laminaarikaapissa. 2 ml:n kryoputkeen pipetoitiin 950 µl latausliuosta 1.
4. Solukoita siirrettiin putkeen ja inkuboitiin 20 – 30 min huoneenlämmössä.
5. Liuosta poistettiin steriilillä lasillisella pasteurpipetillä ja tilalle laitettiin 950 µl PVS2-liuosta. Inkuboitiin 1 tunti jäällä.
6. Inkuboinnin jälkeen noin 500 µl PVS2-liuosta poistettiin ja siirrettiin putket nestetyyppeen vähintään tunniksi.

7. Nestetyypen jälkeen putket siirrettiin 38 asteeseen vesihautteeseen 1,5 minuutiksi.
8. Putket desinfioitiin 70-prosenttisella etanolilla ja poistettiin jäljellä olevaa PVS2-liuosta.
9. Putkiin lisättiin 950 µl pesuliuosta 2 ja inkuboitiin soluja 20–30 minuuttia huoneenlämmössä.
10. Pesuliuosta poistettiin ja soluja siirrettiin suodatinpaperille (Whatman 1), joka on 0,4 M sakkaroosia sisältävän kasvatusalustan päällä. Inkuboitiin soluja tunnin ajan pimeydessä.
11. Inkuboinnin jälkeen soluja siirrettiin suodatinpaperin avulla 0,2 M sakkaroosia sisältävälle alustalle ja jätettiin pimeään, +25 °C:seen vuorokaudeksi.
12. Vuorokauden päästä solut siirrettiin tavalliselle kasvatusalustalle ilman suodatinpaperia ja vietiin rytmivalokaappiin. Soluja seurattiin kuukauden ajan.

4.2.2 Kryopreservaation jälkitestaus

Kryopreservaation jälkeen oli tärkeä tarkistaa, että solukko edelleen tuottaa ligniiniä kasvatusalustaansa. Onnistuneista kokeista otettiin solukoita liuoskasvatuskokeeseen: liuoskontrollisolukoita (5 toistoa), kryopreservaatiosta (kryo) selviytyneitä solukoita (5 toistoa) ja saman erän solukoita (5 toistoa), jotka eivät käyneet mitään käsittelyä läpi. Yhteensä 15 pulloa per koe. Kokeeseen otettiin soluja kombinaatioista 1, 4, 5 ja 6 (taulukko 1).

Materiaalit ja reagenssit:

Kasvatusliuos 5' (liite 1): mikroravinteet lisättiin ennen kokeen alkamista.

Menettelytapa:

1. Laminaarikaapissa kasvatusalustaan 5' (liite 1) lisättiin mikroravinteita.
2. Kasvatusalusta 5' jaettiin aseptisesti 100 ml:n erlenmeyerpulloihin (25 ml per pullo).
3. Pulloihin lisättiin 2,5 viikkoisia solukoita, 2 palaa per pullo. Pullo suljettiin foliolla.

4. Solukoita kasvatettiin +20 °C:ssa, ravistelijassa (100 rpm), rytmivalossa (16 h valoa / 8 h pimeää) (Osram warm white -lamppu).
5. Soluja tarkasteltiin viiden, seitsemän ja kymmenen päivän kuluttua silmämääräisesti.
6. Miracloth-kangasta käytettiin eristämään liuosta soluista Sorvall-putkiin. Työ tehtiin jäällä.
7. Putket tasopainotettiin ja sentrifugoitiin (+4 °C:ssa, 40 minuuttia, 18 500 g), jatkotutkimuksia varten.

4.3 Fenolianalyysin menetelmä

Kryopreservaatoin aikana ilmeni, että kova solukko selvisi paremmin kuin pehmeä. Oletettiin, että soluseinän koostumus ja solunsisäisten fenolien määrä kovassa ja pehmeässä solukossa oli erilainen. Päätettiin tehdä kokonais-fenoliyhdisteiden (engl. TPC eli Total Phenolic Content) analyysi FC-menetelmällä.

Menetelmän optimointi on hyvin aikaa kuluttavaa. Mutta tehtynä oikein se nopeuttaa varsinaisten mittausten tekoa ja data-analyysia. Fenolien ryhmä on hyvin laaja. Menetelmän validoinnissa on mietittävä, missä muodossa näyte on ja minkälainen on näytteen matriisi. Nestemäiset näytteet, kuten viinit, väkiviinat ja kirkkaat mehut voidaan esim. injektoida suoraan analyyttoriin suodatuksen, puhdistuksen tai sentrifugoinnin jälkeen. Kiinteät näytteet kulkevat muutaman esivalmistelun läpi ennen kuin fenoleita voidaan uutaa. [20, s. 3272] Tässä työssä näytteenä oli kasvisolukko eli kiinteä matriisi.

Kasvisolu sisältää runsaasti vettä (mm. suurin määrä on vakuolissa). Ensimmäinen pohdinta esivalmistelussa koski, millä tavalla vettä poistetaan soluista, jotta fenolin määrä ei muuttuisi. Kolme yleisintä kuivaustekniikkaa ovat kylmäkuivaus eli lyofilisaatio, ilma-kuivaus ja uunikuivaus. Kylmäkuivaus valittiin sen perusteella, että se on hellä menetelmä, joka vaikuttaa vähiten matriisin koostumukseen. Kuivaus tapahtui kolmena peräkkäisenä päivänä lyofilisaattorissa. Näytteitä punnittiin ennen ja jälkeen kuivaamista. Kuivaamisen jälkeen näytteitä jauhettiin pallomyllyllä. [21, s. 2330]

Seuraava askel analyysissa on fenolien uutto liuottimella. Kiinteästä matriisista fenoleja pitää saada kirkkaaksi uutteenä, jotta näyte olisi sopivaa värinmuutoksen mittaukseen.

Eri liuottimet eri vahvuuksilla sopivat paremmin tietynlaisiin fenoleihin. Usein liuottimena käytetään vettä, asetonia, etyyliasetaattia, metanolia, etanolia, propanolia ja niiden seoksia. [21, s. 2334–2336; 23, s. 159] Kirjallisuuden katsauksen tuloksena 70-prosenttinen metanoli oli paras valinta. Myös uuttomenetelmällä on vaikutusta saantoon. Se voi olla mikroaalto-avustettu uutto (engl. MAE eli Microwave-Assisted Extraction) tai ultraäänellä avustettu uutto (engl. UAE eli Ultrasound-Assisted Extraction). [21, s. 2334–2335] Kyseisen analyysin tavoite oli eristää kokonaisfenolit. Uutto tehtiin sonikaattorissa (ts. ultraäänihomogenisaattorissa). Näyte laitetaan veteen putkissa, sonikaattori muodostaa aallot, jotka luovat kuplia näytteessä. Kuplat räjähtäessään vapauttavat ison määrän energiaa ja rikkovat näytettä ja liuotin sekoittuu näytteen kanssa. [21, s. 2334] Tätä prosessia kutsutaan kavitaatioksi.

Fenolien määrä riippuu uuttojen määrästä. Tarvittavien uuttojen määrän tarkistamiseksi, tehtiin vielä toisenlainen esikoe. Fenoleja uutettiin 1, 2 ja 3 kertaa. Kokeista huomattiin, että ensimmäisellä uutolla tulee suurin määrä fenoleja. Toisella uutolla fenolien määrä pienenee 1,5–2,5 kertaa. Kolmannen uuton jälkeen fenolien määrä oli sama kuin toisen uuton jälkeen, eli kolmannen uuton saanto oli pieni. Päädyttiin tekemään kaksi uuttoa, ja mittaamaan fenolien määrä yhdistetystä uutteesta.

4.3.1 Menetelmän optimointi

Jotta mittaukset olisivat verrattavissa toisiinsa, piti asettaa standardisuora, johon tuloksia verrattiin. Historiallisesti yleisimmin käytetty vertailu standardi on gallushappo. [23, s. 158] Tässä insinööriyössä käytettiin ferulahappoa (Sigma, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) ja se on toiminut yhtä hyvin kuin gallushappo. Ensin tehtiin kantaliuosta 1 mg/ml, liuottamalla ainetta metanoliin ja täyttämällä lopputilavuus vedellä. Sitten tehtiin laimennossarjan 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 5 µg/ml ja 1 µg/ml 70-prosenttisessa metanolissa. Standardisuoran säätämisen lisäksi määriteltiin FC-reaktiossa käytettävän natriumkarbonaatin sopivin pitoisuus. Kandidaatteina oli 3-prosenttinen ja 3,3-prosenttinen natriumkarbonaatin loppupitoisuudet.

4.3.2 Askorbiinihapon vaikutus mittauksiin

FC-menetelmään voivat vaikuttaa fenolien lisäksi kasvissa olevat muut yhdisteet (kuten esim. pelkistävät sokerit ja askorbiinihappo). Askorbiinihappo reagoi nopeasti FC-reagenssin kanssa, ennen kuin natriumkarbonaattia lisätään. [24, s. 5993] Askorbiinihapon määrän tarkistamiseksi oli otettu esimittaus käyttöön. Esimittaus tehtiin, kun näyte, vesi ja FC-reagenssi oli lisätty kuoppaan mittauslevylle. Seosta inkuboitiin 3 minuuttia. Sen jälkeen absorbanssia luettiin 750 nm:lla. Saatu tulos vähennettiin loppumittauksesta kahden tunnin inkuboinnin jälkeen saadusta lopputuloksesta. [24, s. 5995] Askorbiinihapon mittaukset tehtiin kolmelle ensimmäiselle näytteelle. Saatujen tulosten keskiarvon suuruus oli lähellä nolla. Tulokset viittasivat siihen, ettei näytteessä ole häiritsevää määrää askorbiinihappoa. Testikokeiden jälkeen esimittausta ei tehty muille näytteille.

4.3.3 Fenolianalyysin menettelytapa

Analyysissa pyrittiin tekemään kolme toistoa jokaisesta solukkotyypistä. Kuitenkin joskus kävi sillä tavalla, että tarvittavaa solukon tyyppiä ei enää ollut saatavilla. Solukon tottuminen uuteen kasvatusalustaan kestää monia kuukausia, sen takia jotkut toistot päätettiin jättää tekemättä. Yhteensä kokeisiin otettiin kuusi solukkotyyppin kombinaatiota (taulukko 1).

Materiaalit ja reagenssit:

Uuttoliuotin: 70 % metanoli

Standardi suora: ferulahappo konsentraatiolla 0–200 µg/ml

FC-reagenssi (Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2N, with respect to acid, Fluka Analytical): hapon suhteeseen 2N

18-prosenttinen natriumkarbonaattiliuos

Menettelytapa:

1. Kuukauden ikäisiä solukoita pakastettiin -80 °C:seen nestetyypen kautta. Solukot punnittiin ennen pakastusta. Pakastus oli välttämätön, koska solukoiden määrä oli suuri, eikä ollut mahdollista analysoida näitä kaikkia kerrallaan.
2. Solukoita kuivattiin lyofilisaattorissa kolme päivää. Kuivamassa punnittiin kuivaamisen jälkeen, että siitä voisi analysoida veden määrän näytteessä.

3. Solukoita jauhettiin pallomyllyllä. Pallomyllyn merkki oli Mixer Mill MM 400 – RETSCH. Käytettiin frekvenssiä 28,0, 30 sekuntia, pallon säde oli 2 mm. Jauhetut solukot säilytettiin folioon käärittynä valolta suojassa huoneenlämmössä. Fenolihdisteet ovat herkkiä UV-valolle ja hajoavat sen vaikutuksesta nopeasti.



Kuva 5. Ero on huomattava kahden solukon välillä. Molemmissa putkissa on noin 6 mg ainetta.

4. Näytettä punnittiin (kuva 5), tavoite oli 6 mg, tarkka paino kirjoitettiin ylös. Jauhetuista solukoista fenoleja uutettiin 2 kertaa 70-prosentisella metanolilla (900 µl) sonikaattorissa, +25 °C:ssa, 30 min. Uutto tehtiin pimeässä.
5. Putket sentrifugointiin 10 min, 17 000 g, huoneenlämmössä. Uutto toistettiin. Uutteet yhdistettiin yhdeksi näytteeksi.
6. Varsinainen fenolianalyysi tehtiin suojaamalla näytettä auringonvalolta. 96-kuoppalevyllä pipetoitiin seuraavassa järjestyksessä:
 - 15 µl näytettä/standardia
 - 220 µl MilliQ-vettä
 - 15 µl FC-reagenssia.
7. Pipetoinnin ja sekoituksen jälkeen reaktion annettiin olla 4 minuuttia pimeydessä. 4 minuutin jälkeen kuoppalevyllä lisättiin 50 µl 18-prosenttista natriumkarbonaattia. Inkuboitiin 2 h pimeydessä. Reaktion kokotilavuus oli 300 µl.
8. Inkuboinnin jälkeen levyä luettiin spektrofotometrillä 750 nm:lla.
9. Tulokset analysointiin ja laskettiin fenolien määrä standardisuoran avulla.

4.4 Tilastollinen analyysi

Tulosten analysoinnissa käytettiin IBM SPSS Statistics -ohjelmaa. SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) on tilastotieteelliseen analyysiin suunniteltu ohjelmisto. Koska otoksien määrä oli alle 50, käytettiin Shapiro-Wilk -normaalisuustestiä. Testi kertoo tuloksien normaalisuudesta eli miten tulokset ovat jakautuneet verrattuna normaalijakaumaan. Testin nollahypoteesi on se, että otoksen tulokset ovat normaalisti jakautuneet. Merkitsevyystasona käytettiin 0,05. Jos aineiston laskettu testisuure (p-arvo) on alle 0,05, nollahypoteesia hylätään. [27]

Jos aineisto ei ole normaalisti jakautunut, käytettiin Mann-Whitney U -ei-parametrinen testiä. Tällä testillä testataan kahden riippumattoman otoksen välisen eron merkitsevyyttä. Merkitsevyystasona käytettiin 0,05. Testin nollahypoteesina on se, että tarkasteltavan muuttujan jakauma on sama molemmissa ryhmissä. Jos aineiston laskettu testisuure (p-arvo) on alle 0,05, nollahypoteesia hylätään. [28]

5 Tulokset

5.1 Kryopreservaaation tulokset

Tehtiin yhteensä 13 kryokoetta eli koetta, joissa esikäsiteltyä solukkoa pakastettiin ja sen jälkeen sulatettiin. Sulatettujen solukoiden selviytymistä seurattiin analysoimalla silmämääräisesti solukoiden elävyyttä, kuntoa ja liuos jälkikasvatuksen avulla. Pyrittiin tekemään kolme toistoa jokaisesta kokeesta. Taulukossa 2 näkyy kaikkien kokeiden tulokset ja niiden keskiarvot, keskihajonnat ja keskivirheet. Kokeita 1–3 ei otettu huomioon tilastollisessa analyysissä, koska selviytymisprosentti oli nolla ja solukoiden erottelu koviin ja pehmeisiin aloitettiin vasta kolmannen kokeen jälkeen. Kokeita 7 ja 9 ei otettu analyysiin mukaan sen takia, että nämä solukot esikasvatettiin jatkuvassa valossa 1 viikko ja 2 viikkoa ennen koetta. Nämä solukot eivät olleet peräisin jatkuvasta valosta tai rytmivalosta. Selviytyneiden solukoiden määrät olivat suurimmat kovalla solukolla rytmivalosta (0,005 mM auksiini) ja kovalla solukolla jatkuvasta valosta (0,005 mM auksiini).

Taulukko 2. Yhteenvetotaulukko kokeista 4–13. Kryopreservaatiokokeissa elävinä selviytyneet solukot ja niiden liuoskontrollit. Taulukosta löytyy koepalojen selviytymissuhdeluvut per koe. Selviytymissuhdeluvut saatiin jakamalla selviytyneiden palojen määrä kaikkien palojen määrällä. Liuoskontroleja oli jokaisessa kokeessa 3 kpl, pakastettavien solukoiden palojen määrä vaihtelee 8–12.

						Keskiarvo	Keskihajonta	Keskiarvon keskivirhe
Kova solukko, jatkuva valo, 0.005 mM auksiini								
Kryossa käyneet solukot	0.83	0.4				0.62	0.22	0.15
Liuoskontrolli	1	1				1.00	0.00	0.00
	koe 4	koe 10						
Kova solukko, rytmivalo, 0.005 mM auksiini								
Kryossa käyneet solukot	0.33	0.6	0.25			0.39	0.15	0.09
Liuoskontrolli	0.67	1	1			0.89	0.16	0.09
	koe 4	koe 8	koe 12					
Kova solukko, rytmivalo, 0.01 mM auksiini								
Kryossa käyneet solukot	0.6					0.60	0.00	0.00
Liuoskontrolli	1					1.00	0.00	0.00
	koe 6							
Kova solukko, jatkuva valo, 0.01 mM auksiini								
Kryossa käyneet solukot	0.67	0				0.34	0.34	0.24
Liuoskontrolli	1	0.67				0.84	0.17	0.12
	koe 5	koe 10						
Pehmeä solukko, rytmivalo, 0.01 mM auksiini								
Kryossa käyneet solukot	0	0.4	0	0	0	0.08	0.16	0.07
Liuoskontrolli	0	0.67	0	0	0.33	0.20	0.27	0.12
	koe 5	koe 6	koe7	koe 11	koe13			
Pehmeä solukko, rytmivalo, 0.005 mM auksiini								
Kryossa käyneet solukot	0	0	0			0.00	0.00	0.00
Liuoskontrolli	0.67	0	0			0.22	0.32	0.18
	koe 8	koe 9	koe 13					

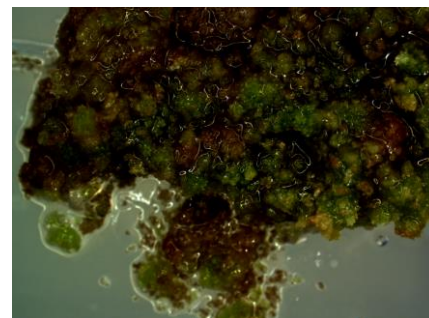
Tätä työtä tehtäessä huomattiin, että solukkoa voidaan jakaa kahteen ryhmään morfologian (solukon muodon ja rakenteen) perusteella. Toinen ryhmä nimettiin ”kovaksi”, toinen ”pehmeäksi”. Pehmeä solukko (kuva 6) oli hyvin pehmeää, hajosi yksittäisiksi soluiksi ja käsittelyn jälkeen värjäytyi vaalean keltaiseksi. Pehmeä solukko kasvoi vain rytmivalossa. Jatkuvassa valossa pehmeätä solukkoa ei ollut, koska kaikki solut kovettuivat muutamassa viikossa. Kova solukko sen sijaan (kuva 7) koostui isommista soluaggregaateista, se oli kovempaa ja kryo-käsittelyn jälkeen värjäytyi ruskeaksi. Kovaa solukkoa muodostui sekä jatkuvassa valossa että rytmivalossa.

Kokeiden aikana huomattiin, että ruskeaksi värjäytynyt solukko selvisi paremmin kuin vaaleaksi muuttunut solukko. Kuvat on otettu kuukauden päästä kryopreservaatiosta.

Värin muutos voisi johtua solusisäisistä fenoleista. Kun fenolit hapettuvat, solukko muuttuu ruskeaksi.



Kuva 6. 0,005 mM auksiini, rytmivalosta, kryopreservaatiossa käynyt pehmeä solukko. Solukko on kuollut.



Kuva 7. 0,01 mM auksiini, rytmivalosta. Kova solukko on selviytynyt kryopreservaatiossa. Selviytyneiden solujen seassa on myös kuolleita ruskeita soluja.

5.2 Kryopreservaaation tulosten tilastollinen analysointi

Kryopreservaaation tulokset jaettiin kolmeen ryhmään kasvuolosuhteen perusteella sekä solukkotyyppin perusteella. Tuloksia verrattiin tilastollisesti kunkin ryhmän sisällä (jatkuva valo vs. rytmivalo; 0,005 mM auksiini vs. 0,01 mM auksiini; kova solukko vs. pehmeä solukko). Tilastollisessa analyysissä vertaukset tehtiin ryhmien sisällä.

Ensin aineiston normalisuutta tarkistettiin Shapiro-Wilk -testillä (liite 2, taulukko 4) [27]. Vain kovan solukon, jatkuvan valon ja 0,005 mM auksiinin tulokset ovat normaalisti jakautunut (niiden p-arvo on suurempi 0,05). Muiden tapauksessa nollahypoteesia hylättiin. Koska osa tuloksista ei noudattanut normaalijakauma, käytettiin kaksisuuntaista ei-parametrasta Mann-Whitney U -testiä.

Nollahypoteesina oli se, että tarkasteltavan kryopreservaaation selviytymissuhdelukujen jakauma on sama molemmissa ryhmissä. Valon tyyppien keskeinen vertailu sai p-

arvoksi 0,133 (Mann-Whitney U = 37, $n_1 = 4$, $n_2 = 12$, kaksisuuntainen). Auksiinin määrän keskeinen vertailu sai p-arvoksi 0,574 (Mann-Whitney U = 26,5, $n_1 = 8$, $n_2 = 8$, kaksisuuntainen). Niiden suhteessa nollahypoteesia ei hylätty, koska p-arvot olivat suurempi kuin

0,05. Eli valolla ja aluksilla ei ollut vaikutusta solukoiden selviytymiseen kryopreservaatiosta. Solukon tyyppien vertailussa saatiin p-arvoksi 0,007 (Mann-Whitney $U = 57$, $n_1 = 8$, $n_2 = 8$, kaksisuuntainen), joten nollahypoteesia hylättiin. Toisien sanojen solukkotyyppien välillä on merkitsevä ero. [28]

5.3 Liuoskasvatuksen tulokset

Kryopreservaation jälkeen on tärkeä varmistaa, että solukot edelleen tuottavat ligniiniä. Sitä varten tehtiin liuoskasvatuskoe, johon otettiin kryopreservaariosta selviytyneet solukot, liuoskontrollit ja saman päivämäärän solukot. Jo viidennestä päivästä alkaen jotkut solukot alkoivat tuottamaan ligniiniä (kuva 8). Ulkosoluihin ligniini näkyi valkoisena saostumana liuoksessa. Kymmenen päivän kuluttua kokeen alkamisesta 68 % solukoista ovat tuottaneet ligniiniä kasvatusalustaansa (kuva 9). Ligniinin määrä määriteltiin silmämääräisesti. Pehmeän solukon liuoskontrolli ei tuottanut ligniiniä, sen sijaan pakastuksessa käynyt kova solukko alkoi tuottaa ligniiniä kymmenessä päivässä aloituksesta. Kovan solukon kontrolli, joka ei käynyt käsittelyn läpi, ei myöskään tuottanut ligniiniä.



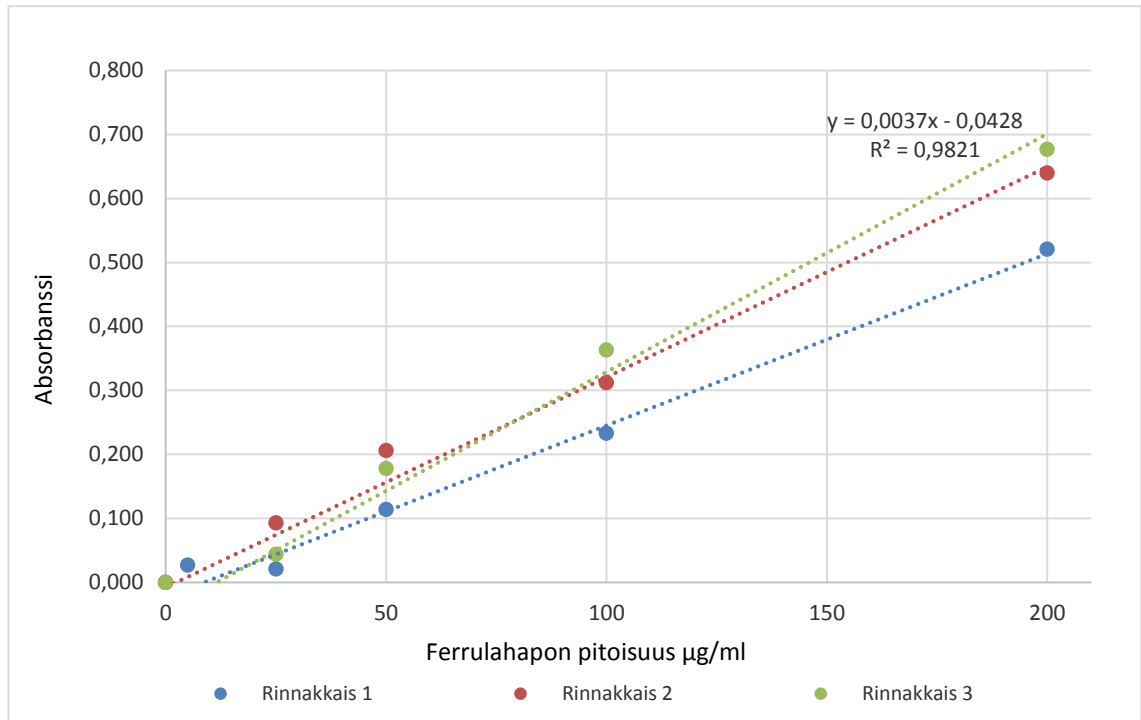
Kuva 8. Kova solukko, joka on selviytynyt kryopreservaatiosta. Päivä 5. Ligniinin tuotanto alkoi viidennessä pullossa (liuos näkyy sameana). Muissa pulloissa ligniinin tuotanto ei vielä alkanut (liuos näkyy kirkkaalta).



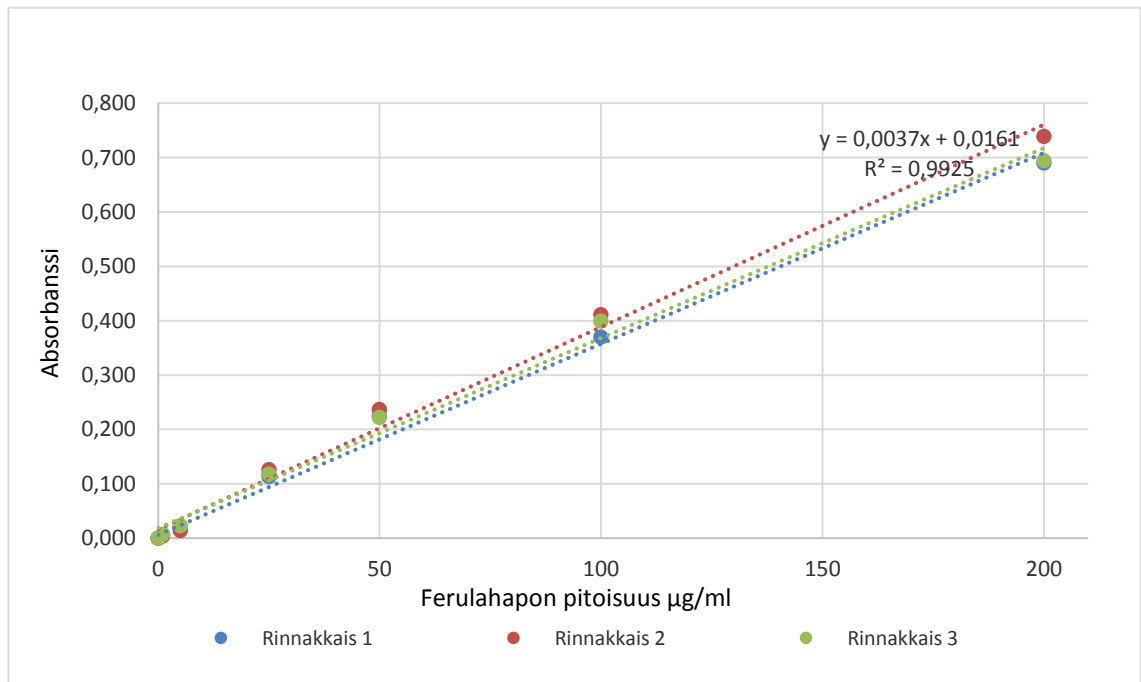
Kuva 9. Kova solukko, joka on selviytynyt kryopreservaatiosta. Päivä 10. Ligniinin tuotanto näkyy kaikissa pulloissa (liuos näkyy sameana)

5.4 Fenolianalyysin optimointitulokset

Kovien ja pehmeiden solukoiden solunsisäiset fenolit päätettiin tutkia FC-menetelmällä. Kirjallisuudesta saatu menetelmä optimoitiin metsäkuusen solukkoa varten. Esikokeiden perusteella tuli selväksi, että arvot 1 $\mu\text{g/ml}$ ja 5 $\mu\text{g/ml}$ ovat lähellä nollaa, niitä korvattiin jatkossa yhdellä arvolla 10 $\mu\text{g/ml}$. 3-prosenttinen natriumkarbonaatti antoi kaikista vähiten hajontaa, joten varsinaisia jatkokokeita tehtiin 3-prosentisella natriumkarbonaatilla (kuvat 10 ja 11).

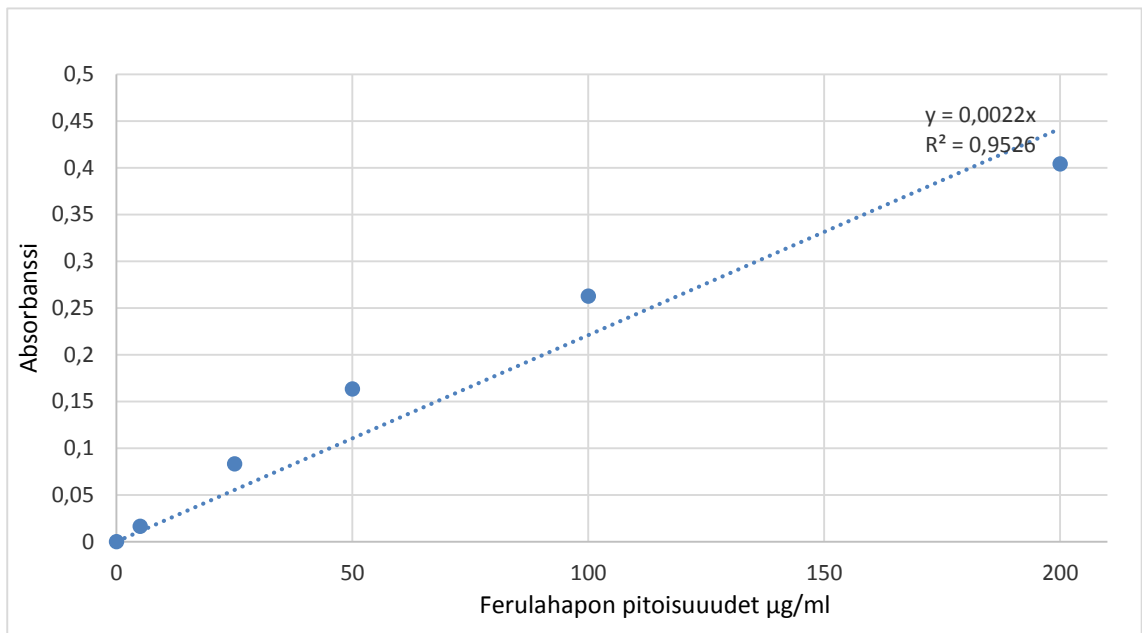


Kuva 10. Esikoe 1.1, standardisuoran määrittäminen, 3,3-prosenttinen Na_2CO_3 , kokeessa on tehty kolme rinnakkaisista määrittästä.



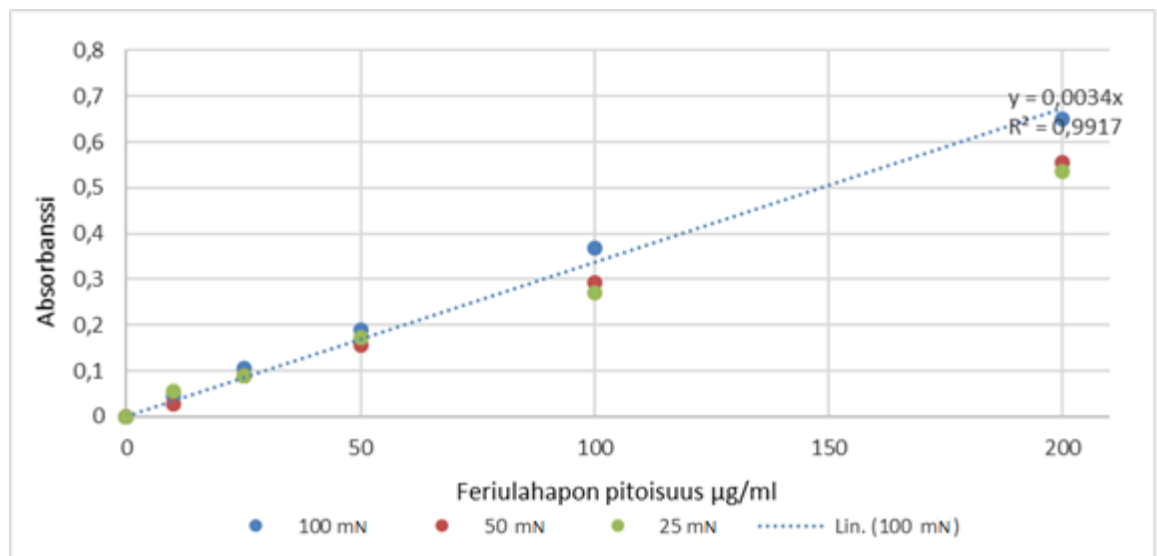
Kuva 11. Esikoe 1.2, standardisuoran määrittäminen, 3-prosenttinen Na_2CO_3 , kokeessa on tehty kolme rinnakkaisista määrittästä.

FC-reagenssin konsentraatiosta riippui, miten suuren fenoliaineiden määrän kanssa reagenssi ehtii reagoida. Lähtöpisteenä oli 12,5 mN FC-reagenssin loppupitoisuus. [24, s. 5994]



Kuva 12. Esikoe 2. 12,5 mN FC-reagenssin standardisuora, näytteenä ferulahappo.

Tuloksista nähdään, että absorbanssiarvo ei ole enää lineaarisella alueella (kuva 12). Se kertoo siitä, että korkeimmalla fenolipitoisuuksilla 12,5 mN:n FC-reagenssia ei riitä reagoimaan kaikki fenolien kanssa. Päätettiin kokeilla FC-reagenssin loppupitoisuuksia 500 mN ja 25 mN.



Kuva 13. Esikoe 3. FC-reagenssin konsentraatioiden (100 mN, 50 mN ja 25 mN) vertailukoe, näytteenä ferulahappo.

Kuvassa 13 on esitetty yhteenveto kolmesta eri FC-reagenssin loppupitoisuudesta. Jokaisella pitoisuudella tehtiin kolme rinnakkaista määrittystä. Kuten tuloksista näkyy, 100 mN FC-reagenssin pitoisuus nousee tasaisesti ja lineaarisesti, kun ferulahapon määrä nousee, ja se ehtii reagoida isoimman fenolimäärän kanssa. Jatkoon otettiin 100 mN reagenssin loppupitoisuus.

5.5 Fenolianalyysin tulokset

Lähtöoletuksena oli se, että kovat solukot sisältävät enemmän fenoleja, koska kryopreservaation jälkeen ne värjäytyvät ruskeaksi. Yhteensä tehtiin 6 koetta (taulukko 3). Koeksessa 5 myös käytettiin solukkoa, jonka tyyppi ei ollut tiedossa. Kovan solukon keskiarvo on suurempi kuin pehmeän solukon. Jatkuvan valon kovan solukon keskiarvo on 40,3, rytmivalon – 21,5 ja pehmeän solukon – 8,6 µg/mg solu.

Taulukko 3. Fenolianalyysin yhteenveto.

Solukon tyyppi ja kasvatusolosuhteet	µg fenolia / mg solu	Erä
kova, 0,005 mM auksiini, jatkuva valo	71,4	9.10.2015
kova, 0,005 mM auksiini, jatkuva valo	72,3	18.8.2015
kova, 0,005 mM auksiini, jatkuva valo	8,8	24.6.2015
N/A, 0,005 mM auksiini, jatkuva valo	7,6	15.6.2016
kova, 0,01 mM auksiini, jatkuva valo	51,8	14.9.2015
kova, 0,01 mM auksiini, jatkuva valo	7,8	9.10.2015
kova, 0,01 mM auksiini, rytmivalo	14,5	7.9.2015
kova, 0,01 mM auksiini, rytmivalo	27,6	9.10.2015
kova, 0,005 mM auksiini, rytmivalo	32,9	9.10.2015
kova, 0,005 mM auksiini, rytmivalo	10,8	5.10.2015
pehmeä, 0,005 mM auksiini, rytmivalo	6,5	5.10.2015
pehmeä, 0,005 mM auksiini, rytmivalo	5,4	26.8.2015
pehmeä, 0,005 mM auksiini, rytmivalo	6,5	29.6.2015
pehmeä, 0,01 mM auksiini, rytmivalo	22,2	5.10.2015
pehmeä, 0,01 mM auksiini, rytmivalo	6,1	29.6.2015
pehmeä, 0,01 mM auksiini, rytmivalo	4,6	26.8.2015

5.6 Fenolianalyysin tulosten tilastollinen analysointi

Fenolianalyysin tulokset jaettiin kolmeen ryhmään kasvuolosuhteen perusteella sekä solukkotyyppien perusteella. Tuloksia verrattiin tilastollisesti kunkin ryhmän sisällä (jatkuva valo vs. rytmivalo; 0,005 mM auksiini vs. 0,01 mM auksiini; kova solukko vs. pehmeä solukko). Tilastollisessa analyysissä vertaukset tehtiin ryhmien sisällä.

Ensin aineiston normaalisuutta tarkistettiin Shapiro-Wilk -testillä (liite 2, taulukko 5) [27]. Vain kovan solukon, jatkuvan valon ja 0,005 mM auksiinin tulokset ovat normaalisti jakautuneet (niiden p-arvo on suurempi kuin 0,05). Muiden tapauksessa nollahypoteesia hylättiin. Koska osa tuloksista ei noudattanut normaalijakauma, käytettiin kaksisuuntaista ei-parametrista Mann-Whitney U -testiä.

Nollahypoteesina oli se, että tarkasteltavan fenolimäärän jakauma on sama molemmissa ryhmissä. Valon tyyppien keskeinen vertailu sai p-arvoksi 0,118 (Mann-Whitney U = 45, $n_1 = 6$, $n_2 = 10$, kaksisuuntainen). Auksiinin määrän keskeinen vertailu sai p-arvoksi 0,918 (Mann-Whitney U = 30, $n_1 = 9$, $n_2 = 7$, kaksisuuntainen). Niiden suhteessa nollahypoteesia ei hylätty, koska p-arvot olivat suurempi kuin 0,05. Eli valolla ja aluksilla ei ollut vaikutusta fenolimäärään solukoissa. Solukon tyyppien vertailussa saatiin p-arvoksi 0,005 (Mann-Whitney U = 50, $n_1 = 9$, $n_2 = 6$, kaksisuuntainen), joten nollahypoteesia hylättiin. Toisien sanojen solukkotyyppien välillä on merkitsevä ero. [28]

6 Yhteenveto ja pohdinta

Tällä insinööriyöllä oli kaksi tarkoitusta. Toinen oli tutkia valon, solukkotyyppin ja kasvi-hormoni auksiinin vaikutusta metsäkuusen solukon selviytymiseen kryopreservaatiosta. Insinööriyön toinen tarkoitus oli optimoida sopivaa menetelmä fenolianalyysin metsäkuusen solukosta. Molemmissa tapauksissa Mann-Whitney U -testin avulla osoitettiin, että solukkotyyppillä on vaikutusta sekä selviytymiseen kryopreservaatiosta että solukkotyypeillä on eroa solunsisäisissä fenolien määrässä. Toinen tärkeä huomautus koskee kokeiden pientä määrää. Pieni otos voisi vaikuttaa tilastolliseen analyysiin.

Kryopreservaatio oli onnistunut kovan solukon puolesta. Kryopreservaation aikana kävi kuitenkin ilmi, etteivät kaikki pehmeän solukon liuoskontrollit olleet selvinneet. Tämä voi johtua pehmeän solukon morfologiasta. Kasvisolun todennäköisin vaurioitumisen syy kryopreservaation aikana on solukalvon menetys. [29, s. 44] Pehmeä solukko hajoaa helposti yksittäiseksi soluksi, joten suoja-aineet voivat esim. vaurioittaa solukalvoa. Toisaalta jos solu alunperin ei ollut tolerantti abioottiseen stressiin, sen mahdollisuudet selviytyä ovat tosi pienet. [26]

Suoja-aineet, kuten DMSO, voivat vaikuttaa sekä positiivisesti että negatiivisesti solun perimään. DMSO suojelee DNA:ta säteily varioitumiselta, mutta on epäilyä, että se myös vaurioittaa DNA:ta ja/tai sillä on epigeneettista vaikutusta perimään. [29, s. 91–92] Solun perimän varioituminen voi olla myös syypää liuoskontrollien kuolemiseen.

Esikasvatuksen vaiheen aikana solut olivat erittäneet vain vähän vettä sakkaroosialustansa. Epäonnistunut kryopreservaatio voisi johtua veden suuresta määrästä solukoiden sisällä. Jääkiteiden muodostumien solun sisällä ja solun ulkopuolella voisi tuhoa solun solukalvon. [29, s. 44]

Jatkotutkimuksena voisi tarkemmin analysoida pehmeän ja kovan solukon fenolia: erottaa mitä nimenomaisia fenoliyhdisteitä solukot sisältävät (fenolihapot, lignaanit, tanniinit, jne.)

Lähteet

1. Kärkönen, A., Korhonen, P., Pehkonen, T., Väsänen, E. 2010. Ligniini liimaa puissa ja heinissä. Maaseudun tiede. Vuosikerta 67, numero 4, sivu 15.
2. Simola, L. K., Lemmentyinen, J., Santanen, A. March 1992. Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. Copenhagen: Physiologia plantarum, Volume 84, Issue 3, pp. 374–379.
3. Lignin biosynthesis group. Nettisivu <<http://blogs.helsinki.fi/ligning-biosynthesis-group/about/>> Luettu 12.1.2016.
4. Metsätieteiden laitos, tietopankki metsäkuusesta. <http://www.helsinki.fi/metsatieteet/arboretum/puulajit/picea_abies.html> Luettu 4.10.2016.
5. Metsäkuusen genomien projektin sivusto. <<http://congenie.org/start>> Luettu 11.10.2016.
6. Halkka, A., Karttunen, K., Kokko U. 1994. Kotimaan luonto-opas. Helsinki: WSOY.
7. Poppius-Levlin, Kristiina. 2016. Tutkija, eläkkeellä. Sähköpostiviesti, 24.2.2016.
8. Metsäteollisuuden pääsivu. Metsäteollisuuden vientimäärät 1960-luvulta alkaen. Vienti. <<http://www.metsateollisuus.fi/tilastot/toimialat/10-Mets%C3%A4teollisuus/#a20Vienti>> Luettu 4.10.2016.
9. Heine-Dobbrnack, E., Kiesecker, H., Shumacher, H. M. 2008. Cryopreservation of dedifferentiated cell cultures. Kirjassa: Reed, M. Barbara (edit.). 2008. Plant cryopreservation: A practical guide. Springer science, Business Media, LLC. s. 141–165.
10. Sakai, A., Hirai, D., Niino, T. National institute of agrobiological sciences. Japan. Kirjassa: Reed, M. Barbara (edit.). 2008. Plant cryopreservation: A practical guide. Springer science, Business Media, LLC. s. 33–57.
11. ELELYSO lääkkeen sivusto. <<http://www.elelyso.com/how-is-elelyso-made>> Luettu 6.10.2016.

12. Koutaniemi, Sanna. 2007. Lignin biosynthesis in Norway spruce: from a model system to the tree. Academic dissertation. Helsinki: Helsinki university printing house.
13. Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L. 2011. Campbell biology. 9th edition. Global edition: Pearson.
14. Heino, J., Vuento, M. Biokemian ja solubiologian perusteet. 2007. 1 painos. WSOY.
15. Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, Maryland: American society of plant physiologists.
16. Hoson, T., Wakabayashi, K. April 2015. Role of the plant cell wall in gravity resistance. *Phytochemistry*, Volume 112, pp. 84–90.
17. Kärkönen, A., Koutaniemi, S. February 2010. Lignin Biosynthesis Studies in Plant Tissue Cultures. *Journal of integrative plant biology*, Volume 52, Issue 2, pp. 176–185.
18. Brunow, G., Kilpeläinen, I., Sipilä, J., Syrjänen, K., Karhunen, P., Setälä, H., Rummakko, P. 1998. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. Kirjassa: Lewis, N. G., Sarkanen, S. Lignin and lignan biosynthesis. 1st edition. ACS Symposium Series 697. Oxford University Press, Oxford, USA.
19. Whetten, R., Sederoff, R. Lignin biosynthesis. July 1995. *The plant cell*, Volume 7, pp. 1001–1013.
20. Stalikas, D. Constantine. December 2007. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, Volume 30, Issue 18, pp. 3268–3295.
21. Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. February 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, Volume 18, Issue 2, pp. 2328–2375.
22. Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. 1990. Cryopresevation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Va. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant cell report*, Volume 9, pp. 30–33.

23. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total Phenol and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, Volume 299, pp. 152–178.
24. Sanchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, B. November 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical methods*, Volume 5, Issue 21, pp. 5990–5999.
25. Evans, D. E., Coleman, J. O. D., Kearns, A. 2003. *Plant cell culture*. London and New York: Bios scientific publishers, p. 15.
26. Ishikawa, M., Suzuki, M., Nakamura, T., Kishimoto, T., Robertson, A. J., Gusta, L. V. March 2006. Effect of growth phase on survival of bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. *Annals of botany*, Volume 97, Issue 3, pp. 453–459.
27. Razali, N. M., Wah, Y. B. 2011. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of statistical modelling and analytics*, Volume 2, Issue 1, 21–33.
28. Akin menetelmäblogi: Mann-Whitney U -testi <<https://tilas-toapu.wordpress.com/2012/03/08/mann-whitney-u-testi/>> Luettu 18.11.2016.
29. Kartha, K. K. 1985. *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press.

Kasvatusalustojen reseptit

Kaikki reseptit perustuvat Simolan (ym. 1992) julkaisuun. [2]

Kasvatusalusta 2-N /1l – se on peruskasvatusalusta, solukon ylläpito tehtiin tällä kasvatusalustalla.

N6-makroravinteita (10x)	100 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (25 mM)	45 ml
NaFe-EDTA (100x)	10 ml
Kinetiini (2,5 mM)	1 ml
2,4-D (2 mM)	5 ml
MS-vitamiinit (1000x)	1 ml
Myo-inositoli	100 mg
Sakkaroosi	58 mM
Agar	6 g
T-mikroravinteet (125x)	8 ml

pH:ta säädettiin natriumhydroksidilla 5,6:een, lisättiin agaria ja autoklavoitiin. Kun alusta on jäähtynyt noin 60 asteeseen, siihen lisättiin T-mikroravinteita steriili suodattamalla (0,2 µm suodatin) ja valettiin petrimaljoihin.

Kasvatusalusta ½-A: Sama alusta kuin 2-N, mutta 2,4-D:n määrä on puolet normaali määrästä eli 0,005 mM.

Kasvatusliuokset 2-N ja ½-A: Sama resepti kuin kiinteällä alustalla, mutta ilman agaria.

Kasvatusliuos 5' /1l – se on jälkitestauksessa käytetty liuos.

T-makroravinteita (10x)	100 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (25 mM)	45 ml
NH ₄ NO ₃ (100 mM)	100 ml
NaNO ₃ (65 mM)	77 ml
NaFe-EDTA (100x)	10 ml
Kinetiini (2,5 mM)	1 ml
2,4-D (2 mM)	0,25 ml
MS-vitamiinit (1000x)	1 ml
Myo-inositoli	100 mg

Sakkarosi 58 mM

T-mikroravinteet (125x) 8 ml

pH:ta säädettiin natriumhydroksidilla 5,6:een ja autoklavoitiin. Kun alusta on jäähtynyt noin 60 asteeseen, siihen lisättiin T-mikroravinteita steriili suodattamalla (0,2 µm suodatin).

Kantaliuoksien pitoisuuksia

Kaikki pitoisuudet per 1 l		mM
T-makroravinteet (10x)	KNO ₃	50,0
	KCl	50,0
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	20,0
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	20,0
T-mikroravinteet (125x)	MnSO ₄ x H ₂ O	12,5
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	6,3
	H ₃ BO ₃	25,1
	KI	3,1
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,12
	Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	0,13
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,06
	NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,01
N6 – makroravinteet (10x)	(NH ₄) ₂ SO ₄	35,0
	KNO ₃	279,9
	KH ₂ PO ₄	29,4
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	7,5
CaCl₂ x 2H₂O	CaCl ₂ x 2H ₂ O	25,0
5' typen liuokset	NH ₄ NO ₃	100,6
	NaNO ₃	64,7
NaFe-EDTA (100x)	C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈	12,5
2,4-D (auksiini)	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	2,0
Kinetiini	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	2,5

Ms-vitamiinit (1000x) /50 ml

Niasiini 25 mg

Tiamiini 5 mg

Pyridoksiini 25 mg

Glysiini 100 mg

Liuosta jaettiin 1 ml:n eriin ja säilytettiin -20°C:ssa.

Kryopreservaation tilastollinen analyysi

Taulukko 4. Normaalijakautumisen testaus Shapiro-Wilk -testillä. Vain kovan solukon, jatkuvan valon ja 0,005 mM auksiinin tulokset ovat normaalisti jakautunut (niiden p-arvo suurempi kuin 0,05).

Tests of Normality							
	Solukontyyppi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Selviytyneet solukot	Pehmeä solukko	.513	8	.000	.418	8	.000
	Kova solukko	.200	8	.200	.969	8	.892
	Valon määrä	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Selviytyneet solukot	Rytmivalo	.355	12	.000	.742	12	.002
	Jatkuva valo	.204	4	.	.958	4	.765
	Auksiinin määrä	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Selviytyneet solukot	0.005 mM auksiini	.213	8	.200	.898	8	.278
	0.01 mM auksiini	.383	8	.001	.713	8	.003

Fenolianalyysin tilastollinen analyysi

Taulukko 5. Normaalijakautumisen testaus Shapiro-Wilk -testillä. Vain kovan solukon ja 0,01 mM auksiinin tulokset ovat normaalisti jakautunut (niiden p-arvo suurempi kuin 0,05).

Tests of Normality							
	Solukontyyppi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fenolien määrä µg/g solu	Pehmeä solukko	.453	6	.000	.601	6	.000
	Kova solukko	.205	9	.200	.852	9	.079
	Valon määrä	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fenolien määrä µg/g solu	Rytmivalo	.258	10	.058	.828	10	.032
	Jatkuva valo	.306	6	.082	.782	6	.040
	Auksiinin määrä	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fenolien määrä µg/g solu	0.005 mM auksiini	.357	9	.002	.693	9	.001
	0.01 mM auksiini	.191	7	.200	.858	7	.145