

KASVUALUSTAN HORMONITASON JA
VALON VAIKUTUS *SYRINGA VULGARIKSEN*
VERSOMISEEN JA JUURTUMISEEN
IN VITRO VILJELYSSÄ

Tiina Natri

Opinnäytetyö
Toukokuu 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma
Tekniikka ja liikenne





Tekijä(t) NATRI, Tiina	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 30.05.2011
	Sivumäärä 89	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi KASVUALUSTAN HORMONITASON JA VALON VAIKUTUS SYRINGA VULGARIKSEN VERSOMISEEN JA JUURTUMISEEN <i>IN VITRO</i> -VILJELYSSÄ		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) SALO, Esa, yliopettaja		
Toimeksiantaja(t) Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus MTT, Laukaan toimipiste UOSUKAINEN, Marjatta, vanhempi tutkija, asiakaspäällikkö		
Tiivistelmä Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää MTT Laukaan käyttöön sopiva ja hyvä syreenien lisäysalusta tai vaihtoehtoisia alustoja, joita voisi käyttää uusien syreenikantojen lisäyksessä. Ongelmana oli syreenien heikko lisääntyminen ja juurtuminen <i>in vitro</i> . Kokeessa käytettiin kahta syreenilajiketta, joista toinen oli pihasyreeni 'Liisa' ja toinen oli jalosyreeni 'Andenken an Ludwig Späth'. 'Liisa'-lajike on huomattavasti paremmin lisääntyvä kuin 'Anden an Ludwig Späth'-lajike, joten 'Liisaa' pystyttiin käyttämään jonkinlaisena vertailukohteena ja pystyttiin havainnoimaan, miten testattavat alustat yleensä sopivat syreenille. Kokeessa tutkittiin eri hormonitasojen ja valon määrän vaikutusta syreenien versomiseen ja juurtumiseen. Kokeessa käytetyt alustat valittiin kirjallisuuden perusteella, kun tutkittiin mitä alustoja syreneillä on aikaisemmin testattu. Alustoiksi valittiin Murashige-Skoogin alusta (MS-alusta), josta tehtiin kolme versiota BAP-hormonin suhteen sekä ½MS-alusta, josta tehtiin myös kolme versiota hormonin suhteen. ½MS-alusta oli muutoin koostumukseltaan samanlainen kuin MS alusta, mutta sen makroravinteiden osuus oli vähennetty puoleen. Vertaukseksi kokeessa käytettiin G12-alustaa, jolla syreenit yleensä MTT:llä lisätään. Kumpaakin lajiketta oli 20 versoa jokaisella alustalla (7 alustaa), eli kaikkiaan kokeessa oli yhteensä 280 versoa. Syreenit lisättiin isoissa koeputkissa, joiden päälle laitettiin kirkkaat ilmastoidut korkit. Syreenit lisättiin yhteensä kolme kertaa viiden viikon välein. Lisäyksen jälkeen kaikki versot juurrutettiin muovirasioissa samanlaisella alustalla. Juurrutuslustralana käytettiin samaa alustaa millä syreenit yleensäkin juurrutetaan. Juurrutuksen jälkeen versot kouluttiin B2-turpeelle ja laitettiin kasvihuoneeseen kasvamaan. Kokeen perusteella selvisi, että syreenit tarvitsevat korkeampia hormoonipitoisuuksia lisääntyäkseen. Ylivoimaisesti paras alusta tässä kokeessa oli MS-alusta, jonka BAP-hormonipitoisuus oli 3,75 mg/l. Tämä pitoisuus oli kaikista vahvin käytetyistä pitoisuuksista. Valon määrällä näytti olevan positiivinen vaikutus verson kasvuun. Juurten muodostus juurrutuslustralalla oli kaikilla versoilla aika heikkoa, mutta miltei kaikki koulitut versot lähtivät kasvuun turpeella.		
Avainsanat (asiasanat) Mikrolisäys, syringa (syreeni), kasvualusta, juurrutuslusta, <i>in vitro</i> -viljely, kasvunsäätet		
Muut tiedot		



Author(s) NATRI, Tiina	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 30052011
	Pages 89	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (X)
Title THE EFFECT OF LIGHT AND HORMONE LEVELS OF THE NUTRIENT MEDIA ON SYRINGA VULGARIS'S (LILAC) SHOOT PROLIFERATION AND ROOTING <i>IN VITRO</i>		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) SALO, Esa, Senior Lecturer		
Assigned by MTT Agrifood Research Finland UOSUKAINEN, Marjatta, Senior Scientist, Customer Manager		
Abstract <p>The aim of this thesis was to find a suitable and good proliferation medium or alternative growing media for lilacs, which could be used in proliferation of a new lilac population. The problem in MTT with lilacs was the weak shoot proliferation and rooting <i>in vitro</i>. In the test two lilac cultivars were used: common lilac, 'Liisa' and French hybrid lilac, 'Andenken an Ludwig Späth'. 'Liisa' is notably better in shoot proliferation than 'Andenken an Ludwig Späth' so it could be used as a point of comparison. At the same time it could be observed how the media tested work for lilacs in general. Also the effect of hormone levels and light on shoot proliferation and rooting were studied.</p> <p>Literature was used when the media for the test were chosen. Murashige-Skoog's medium (MS-media), Murashige-Skoog- medium with half of the amount of macrosalts (½MS-media) and the G-salt medium used by MTT were chosen for proliferation. In both MS-media hormone BAP was used in three different concentrations. There were 20 shoots of both cultivars per each medium (7 media), altogether 280 shoots. They were proliferated in big test tubes three times in five-week cycles. The test tubes were sealed with air-conditioned plastic. After micropropagation all shoots were rooted in the same medium. The rooting medium was the G-salt medium used by MTT. After rooting the shoots were set in peat and they were moved to a greenhouse.</p> <p>The result of the test was that the lilacs need higher concentrations of hormones. The best medium for proliferation was the MS medium with 3.75 mg/l BAP. This concentration was the strongest which was used. Light seems to have a positive effect on the plant growth. The root formation of all shoots was quite weak, but in the greenhouse almost all the shoots started to grow.</p>		
Keywords Micropropagation, syringa, nutrient medium, rooting medium, <i>in vitro</i> -cultivation, plant growth regulations		
Miscellaneous		

SISÄLTÖ

SANASTO	5
1 OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TAVOITTEET	6
2 KOTIPIHOJEMME SYREENI	7
3 KOKEESSA KÄYTETTÄVIEN ALUSTOJEN VALINTA.....	10
3.1 Valintojen perusteet.....	10
3.2 Kokeen suunnittelu.....	12
4 KASVATUSALUSTAN KOOSTUMUS	13
4.1 Vesi	14
4.2 Sokeri	14
4.3 Ravinteet.....	15
4.3.1 Ravinteiden historiaa	15
4.3.2 Makroravinteet.....	15
4.3.3 Mikroravinteet	18
4.3.4 Rauta	19
4.4 Vitamiinit.....	19
4.5 Kasvunsäätet.....	21
4.5.1 Auksiinit	22
4.5.2 Sytokiniinit.....	24
4.5.3 Gibberelliinit.....	25
4.5.4 Muut kasvunsäätet.....	26
4.6 Muut kasvin kasvuun vaikuttavat tekijät	26
4.6.1 Kasvimateriaalin vaikutus	27
4.6.2 pH-arvo.....	27
4.6.3 Valo ja lämpötila	28
4.6.4 Happi- ja hiilidioksidipitoisuus.....	28
4.7 Kasvatusalustan valmistus, säilytys ja sterilointi.....	28
5 MIKROLISÄYS	29

	2
5.1 Mikrolisäyksen vaiheet	30
5.2 Aloitukset.....	31
5.3 Meristeemiviljelmät.....	31
5.4 Verson kärki- ja hankasilmuviljely.....	32
5.5 Kallusviljelmät.....	32
5.6 Muita viljelmiä.....	33
5.7 Mikrolisäyksen edut ja haitat	34
5.8 Ongelmat mikrolisäyksessä.....	35
5.8.1 Fenolihdisteet.....	35
5.8.2 Kontaminaatio.....	35
5.8.3 Vesisolukkoisuus	37
6 TYÖN SUORITUS	38
6.1 Tehtävän rajaus.....	38
6.2 Asennon vaikutuksen tutkiminen.....	38
6.3 Lisäysalustojen valmistus.....	39
6.4 Lisäys	43
6.5 Koeasetelma	44
6.6 Havainnointi.....	46
6.7 Juurrutus ja koulinta turpeelle.....	46
7 TULOKSET	48
7.1 Yleiset havainnot.....	48
7.2 Kontaminaatiot	49
7.3 Lisääntyminen ja kuolleisuus.....	49
7.4 Tilastolliset testit.....	55
7.4.1 'Liisa'-lajike	57
7.4.2 'Andenken an Ludwig Späth' -lajike.....	61
8 TULOSTEN POHDINTA	66
LÄHTEET	69

	3
LIITTEET	72
Liite 1. Alustojen valintaan käytetyt kirjallisuusviitteet	72
Liite 2. TTA-608. Paikkakartta	74
Liite 3. TTA-171. Paikkakartta	75
Liite 4. TTA-608. Ensimmäinen lisäyskerta, havainnot 18.5.2009	76
Liite 5. TTA-608. Toinen lisäyskerta, havainnot 24.6.2009	78
Liite 6. TTA-608. Kolmas lisäyskerta, havainnot 28.7.2009	80
Liite 7. TTA 171. Ensimmäinen lisäyskerta, havainnot 18.5.2009	82
Liite 8. TTA-171. Toinen lisäyskerta, havainnot 24.6.2009	84
Liite 9. TTA- 171. Kolmas lisäyskerta, havainnot 28.7.2009	86
Liite 10. Juurrutuksen ja koulinnan havainnot	88
Liite 11. Työssä käytetyt reagenssit	89

KUVIOT

KUVIO 1. Pihasyreeni, Syringa Vulgaris	8
KUVIO 2. Jalosyreeni 'Andenken an Ludwig Späth'	9
KUVIO 3. IAA-, IBA-, NAA- ja 2,4-D-auksiinien kemialliset rakenteet	22
KUVIO 4. Bentsyladeniinin (BAP) ja zeatiiniin kemialliset rakenteet	24
KUVIO 5. Koeputket kennoissa	44
KUVIO 6. Koeasetelma kasvatushuoneessa	45
KUVIO 7. Esimerkki hyvin kasvavasta versosta MS3,75-alustalla	48
KUVIO 8. Kuolleita versoja	49
KUVIO 9. TTA-608. Viivadiagrammi 'Liisa'-lajikkeen versojen määrästä lisäyskerroilla	52
KUVIO 10. TTA-171. Viivadiagrammi 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen versojen määrästä lisäyskerroilla	55
KUVIO 11. TTA-608. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot ensimmäisellä lisäyskerralla	58
KUVIO 12. TTA-608. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot toisella lisäyskerralla	59

KUVIO 13. TTA-608. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot kolmannella lisäyskerralla.....	61
KUVIO 14. TTA-171. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot ensimmäisellä lisäyskerralla.....	62
KUVIO 15. TTA-171. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot toisella lisäyskerralla.....	64
KUVIO 16. TTA-171. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot kolmannella lisäyskerralla.....	65

TAULUKOT

TAULUKKO 1. G12-alustan perusliuosten pitoisuudet ja alustaan mitatut perusliuosten määrät.....	41
TAULUKKO 2. Murashige-Skoog-alustan perusliuosten pitoisuudet ja alustoihin mitatut perusliuosten määrät.....	42
TAULUKKO 3. G27-alustan perusliuosten pitoisuudet ja alustaan mitatut perusliuosten määrät.....	47
TAULUKKO 4. TTA-608. 'Liisa'-lajikkeen lisääntyminen ja kuolleisuus.....	51
TAULUKKO 5. TTA-171. 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen lisääntyminen ja kuolleisuus.....	54
TAULUKKO 6. TTA-608. Alustojen pareittainen vertailu, ensimmäinen lisäyskerta.....	57
TAULUKKO 7. TTA-608. Alustojen pareittainen vertailu, toinen lisäyskerta...	59
TAULUKKO 8. TTA-608. Alustojen pareittainen vertailu, kolmas lisäyskerta.	60
TAULUKKO 9. TTA-171. Alustojen pareittainen vertailu, ensimmäinen lisäyskerta.....	62
TAULUKKO 10. TTA-171. Alustojen pareittainen vertailu, toinen lisäyskerta.	63
TAULUKKO 11. TTA-171. Alustojen pareittainen vertailu, kolmas lisäyskerta.....	65

SANASTO

2iP	isopentenylenyladeniini
Apikaalidominanssi	Ilmiö, jolla tarkoitetaan kärkisilmun säätelemää kasvin kasvua ja haarautumista
B2-turve	Vaaleaa rahkaturvetta, joka sisältää biologisesti aktiivisia kasvi tautien leviämistä estäviä ja kasvin tervettä kasvua edistäviä aineita
BAP	6-bentsylaminopuriini
IBA	indolivoihappo
<i>In vitro</i>	"Lasissa". Koe tehdään elävän organismin tai solun ulkopuolella.
<i>In vivo</i>	<i>In vitron</i> vastakohta. Koe tehdään elävässä organismissa.
Kallus	Epäjärjestäytyneitä kasvukudosta, jota syntyy kudosten ja elinten haavakohtiin.
Meristeemi	Kasvin kasvusolukkoa, joka ei ole erilaistunut miksiäkään kasvinosaksi. Meristeemiä käytetään mikrolisäyksen aloitukseen.
Metabolia	Solun aineenvaihdunta
Mikro- ja makroravinteet	Makroravinteet ovat pääravinteita ja mikroravinteet hivenravinteita
NAA	α -naftaleeni-etikkahappo
Stabiili	pysyvä, vakaa

1 OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TAVOITTEET

Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, MTT on Suomen johtava maatalous- ja elintarviketutkimusta ja maatalouden ympäristötutkimusta tekevä laitos. MTT toimii maa- ja metsätalousministeriön alaisuudessa. Sen yhteistyökumppaneihin kuuluu maatalous- ja elintarvikealan yritykset, järjestöt ja oppilaitokset sekä viranomaiset niin kotimaassa kuin ulkomaillakin. MTT:llä on 14 toimipaikkaa ympäri Suomea. MTT Laukaan toimipiste vastaa Suomen varmennetun taimituotannon menetelmäkehityksestä, ydinkasviaineiston puhdistuksesta, ydinkasvipankista ja taimien tuotantomenetelmistä. MTT Laukaan toimipiste puhdistaa ja ylläpitää valiotaimituotannon ydinkasveja ja tuottaa niistä valiotaimia suomalaisille taimistoille emokasveiksi. Taimistot sitten lisäävät valiotaimista varmennetun taimituotannon lopputuotteet eli varmennetut käyttötaimet ja testatut käyttötaimet. Lisäksi toimipaikassa on Suomen kansallisen kasvigeenivaraohjelmaan valittujen puutarhakasvien kryosäilytys. Kryosäilytyksellä tarkoitetaan kasvin silmujen säilyttämistä pakastettuna nestetyössä -196 °C:ssa.

MTT Laukaan toimipisteessä lisätään syreenejä lasipurkeissa. Vuonna 2010 valiotaimituotannossa oli viisi eri syreenikantaa. Lisäksi Helsingin kaupungin alueella kasvavia ainutlaatuisia syreenikantoja on otettu lisäykseen MTT Laukaaseen. Syreenit on tarkoitus ottaa mukaan varmennettuun taimituotantoon, ja ne tullaan todennäköisesti valitsemaan myös kasvigeenivaraohjelmaan säilytettäväksi kasvikannoiksi.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää MTT Laukaan toimipisteen käyttöön sopiva ja hyvä syreenien lisäysalusta tai vaihtoehtoisia alustoja, joita voisi käyttää uusien syreenikantojen lisäyksessä. Syreenien mikrolisäyksessä ongelmana on heikko lisääntyminen ja juurtuminen *in vitro*. Lisäksi syreenien lisääminen perinteisillä menetelmillä, kuten pistokaslisäyksellä, on vaikeaa. Alustakokeessa käytettiin kahta syreenilajiketta, jotka olivat pihasyreeni 'Liisa' ja jalosyreeni 'Andenken an Ludvig Späth'. Pihasyreeni 'Liisan' lisääntymises-

sä on vähemmän ongelmia kuin jalosyreenilajikkeella, joten sitä pystyttiin käyttämään jonkinlaisena vertailukohteena ja pystyttiin havaitsemaan alustojen sopivuutta yleensä syreenille. Kokeessa käytetyt lisäsalustat valittiin kirjallisuuden perusteella eli etsittiin, mitä alustoja syreeneillä on aiemmin käytetty ja testattu.

Lisäksi päätettiin tutkia, onko verson asennolla vaikutusta lisääntymiseen eli sillä, asetetaanko verso alustalle pystyyn vai alustan pinnalle vaakaan. Samalla tutkittiin myös, onko viljelyastialla merkitystä lisääntymisen kannalta ja koko koe suoritettiin isoissa koeputkissa. Koeputkessa verso saa enemmän valoa ja näin nähtiin, onko valon määrällä vaikutusta kasvuun. Koeputket suljettiin kirkkailla ilmastoiduilla muovikorkeilla, kun normaalisti lasipurkit suljetaan foliolla.

2 KOTIPIHOJEMME SYREENI

Syreenit ovat pensaita ja pieniä puita sisältävä suku, joka kuuluu öljypuukasvien heimoon. Syreenien sukuun kuuluu 25–30 lajia ja niiden levinneisyysalue ulottuu Kaakkois-Euroopasta Itä-Aasiaan. Yleisesti syreenin lehdet ovat vastakkaisia ja yksinkertaisia eli sen kasvutapa on dikotominen. Syreenin röyhymäiset kukinnot muodostuvat vanhojen oksien, kärkiin ja lehtihankoihin, tämän vuoksi syreeni aloittaa kukkimisen vasta monen vuoden jälkeen istutuksesta. Teriö on suppilomainen ja neliliuskainen, ja sen väri vaihtelee valkeasta tumman sinipunaiseen. (Kallio & Rousi 1981, 1892.)

1900-luvun alkupuolella syreeni oli Suomen suosituin koristepensas ja edelleen sitä istutetaan paljon ympäri maan. Vuonna 2008 syreeni valittiin Viher vuoden kasviksi. Syreenejä löytyy niin kaupungin puistoista kuin kotipihoistakin ja useat lajit menestyvät Lapissa saakka. Pensaat ovat hyvin kauniita ja

kestäviä, eivätkä niitä vaivaa kasvitautit eivätkä tuhohyönteiset. (Juhlista Vihervuotta syreeneillä 2008.)

Tunnetuin ja yleisin syreenilaji on pihasyreeni (ks. kuvio 1), ja maailmalla siitä tunnetaan noin 2000 lajiketta. Kaakkois-Euroopan vuoristoissa pihasyreeniä tavataan luonnonvaraisena. (Juhlista Vihervuotta syreeneillä 2008.) Toinen Euroopan luonnonvaraisesti esiintyvä syreenilaji on unkarinsyreeni. Pihasyreenien lajikkeita kutsutaan jalosyreeneiksi. Ne ovat usein kantamuotoa heikommin tuoksuvia, mutta komeakukkaisia. Syvän sinipunakukkainen 'Andenken an Ludwig Späth' kuuluu Suomen yleisimpiin jalosyreeneihin (ks. kuvio 2) (Kallio & Rousi 1981, 1892 .)



KUVIO 1. Pihasyreeni, *Syringa vulgaris* (Pihasyreeni n.d.)



KUVIO 2. Jalosyreeni 'Andenken an Ludwig Späth'(Jalosyreeni Andenken an Ludwig Späth n.d.)

MTT Laukaan toimipisteessä syringoja on lisäyksessä yhdeksän lajiketta, joista myynnissä on viisi lajiketta. Työssä käytetty pihasyreenilajike 'Liisa' on tullut MTT:lle vuonna 2005, ja sen myynti on alkanut vuonna 2009. Jalosyreeni 'Andenken an Ludwig Späth' on tullut MTT:lle vuonna 2001, ja sen myynti on alkanut vuonna 2003. (Pöyhönen 2010.) MTT:llä lisättävä ja myynnissä oleva pihasyreeni 'Liisa' on peräisin Lievestuoreelta. Sen kukat ovat perinteisen vaalean sinivioletit ja lehdet herramaiset. Lajike on hidaskasvuinen. 'Andenken an Ludwig Späth' on puolestaan peräisin Norjan Sauheradista. Tämän lajike on hyvin kestävä ja sen kukat ovat isot ja violetinpunaiset. (Hokka, Laamanen, Lahtonen, Pöyhönen, Uosukainen 2009, 52.) MTT:llä on jokaiselle kasville omat tunnuksensa, TTA-tunnukset. 'Liisa'-lajikkeen tunnus on TTA-608 ja 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen tunnus on TTA-171.

3 KOKEESSA KÄYTETTÄVIEN ALUSTOJEN VALINTA

3.1 Valintojen perusteet

Kirjallisuudesta etsittiin, minkälaisia alustoja syreeneillä on aikaisemmin testattu. George E.F., Puttock ja George H.J. (1987) ovat taulukoineet eri kasveille tehtyjä alustakokeita. Näiden kokeiden joukosta löytyi muutamia myös syringoille aikaisemmin testattuja alustoja ja näiden alustakokeiden tekijät. (Mts. 191.) Näistä alustakokeista tehtyjä julkaisuja ja muitakin aiheeseen liittyviä julkaisuja etsittiin Google Scholarin avulla ja MTT:n omasta kirjastosta. Lähteitä löytyi todella paljon, ja niistä valittiin seitsemänärkevintä tämän alustakokeen kannalta. Aikaisemmin testatut alustat taulukoitiin ja niiden perusteella päätettiin tässä kokeessa testattavat alustat. Taulukko löytyy liitteestä 1.

Yhteistä kaikille lähteille oli se, että niissä oli käytetty Murashige-Skoogin alustaa (MS-alusta) tai sellaisia, joissa sen makrosuolojen osuutta on muunneltu. Toshio Murashige ja Folke Skoog kehittivät MS-alustan vuonna 1962 alun perin tupakan solukkoviljelyyn. On todettu, että monet kasvit viihtyvät sillä hyvin ja sitä kannattaakin kokeilla uusien kasvien mikrolisäykseen. (Murashige & Skoog 1962, 473–497) Murashige-Skoog-alustan koostumus on esitetty luvussa 6 taulukossa 2.

Tomsone, Galeniece, Akere, Priede ja Zīra (2007) ovat testanneet syreenin lisäämiseen erilaisia makrosuolojen yhdistelmiä. Heidän kokeessaan oli 100 -prosenttinen ja 150 -prosenttinen MS-alusta, 100 -prosenttinen Andersonin alusta ja Andersonin ja Murashige-Skoogin alustan yhdistelmä suhteessa 7:3. Samalla he tutkivat auksiinien ja sytokiniinien vaikutusta vaihtelemalla BAP-, 2iP-, IAA- ja NAA-hormonien pitoisuuksia ja yhdistelmiä. Tuloksena he havaitsivat, että 1,5-kertaiset makrosuolat edistävät lisääntymistä ja sytokiniini yhdessä auksiinin kanssa parantaa verson kasvua. Myös Pierik, Steegmans, Stiekema ja van der Velde (1988) ovat tutkineet syreenin lisääntymistä Murashige-Skoogin alustalla, jossa 1,5-kertaiset makrosuolat. Kokeessa testattiin

eri sytokiniinien vaikutusta ja paras lisääntyminen saatiin alustalla, jossa 1,0 mg/l 2iP-sytokiniiniä. Lisäksi kokeessa, jonka lähde ei ole tiedossa syreenejä oli lisätty MS-alustalla, jossa BAP-pitoisuus oli jopa 7,5 mg/l ja NAA:a oli 0,1 mg/l.

Myös Kamruzzaman, Pierik ja Schornagel (1997) ovat tutkineet makrosuolojen ja lisäksi sokerin vaikutusta syreenin lisääntymiseen. He testasivat makrosuolojen suhteen kolmea erilaista MS-alustaa: 0 -prosenttiset, 50 -prosenttiset ja 100 -prosenttiset makrot. Myös sokerin osalta testattiin kolmea eri pitoisuutta jokaisella alustalla, 0, 10 ja 35 g/l. Lisäksi jokaisella alustalla testattiin kahta eri NAA-pitoisuutta (0,1 ja 1,0 mg/l). Korkealla NAA-pitoisuudella oli negatiivinen vaikutus juurtumiseen ja matala NAA-pitoisuus paransi juurtumista. Korkean pitoisuuden vaikutus tuli kuitenkin vähiten esiin alustoilla, joissa toisessa puolikkaat makrot ja 10 grammaa sokeria ja toisessa 100 -prosenttiset makrot ja 35 grammaa sokeria. Tasapainoisin ja paras yhdistelmä oli puolikkaat makrot, 10 tai 35 grammaa sokeria ja 0,1 mg/l NAA-hormonia. Yleisesti ottaen koe todisti, että ravinteiden ja kasvunsäätteiden välisellä tasapainolla on olennainen merkitys syreenin lisääntymiseen.

Nesterowicz, Kulpa, Moder ja Kurek (2006) testasivat syreenin lisääntymistä kaksivaiheisella alustakokeella. Ensimmäisessä vaiheessa heillä oli kolme erilaista MS-alustaa, joissa ensimmäisessä oli kaksinkerstainen määrä magnesiumsulfaattia ($MgSO_4$), toisessa kaksinkertainen määrä kaliumdivetyysulfaattia (KH_2PO_4) ja kolmannessa kaksinkertainen määrä kalsiumkloridia ($CaCl_2$). Kaikissa BAP-hormonia oli 5,0 mg/l. Näistä alustoista parhaimmat tulokset saatiin alustalla, jossa kaksinkertainen määrä $MgSO_4$. Kokeen toisessa vaiheessa testattiin viittä eri BAP-pitoisuutta (0–5 mg/l) alustalla, jossa tuplamäärä $MgSO_4$. Korkein lisääntymistehokkuus oli alustalla, jonka BAP-pitoisuus oli 1,0 mg/l.

Refouvelet, Le Nours, Tallon ja Daguin (1998) puolestaan tutkivat pääasiassa varastoinnin vaikutusta lisääntymiseen. Heidän käyttämällään MS-alustalla,

jossa oli 5,0 mg/l BAP-hormonia ja 0,01 mg/l NAA-hormonia, lisääntyminen oli 100 prosenttia. Lisäksi Refouvelet, Daguin, Buffet, Forest ja Letouzé (n.d.) ovat tutkineet hiilidioksidin vaikutusta syreenin lisäämiseen. Tutkimuksessa testattiin useita eri alustoja, joiden joukossa oli myös Murashige-Skoogin alusta. MS-alustalla ja hiilidioksidilisäyksellä oli hyvä vaikutus syreenin lisääntymiseen.

3.2 Kokeen suunnittelu

Taustatutkimusten perusteella päätettiin tutkia eri hormonipitoisuuksien vaikutusta *Syringa vulgariksen* lisääntymiseen ja tutkittavaksi hormoniksi valittiin BAP. Alustaksi valittiin kaksi versiota Murasige-Skoogin alustasta, toiseen päätettiin laittaa täydet makrosuolat ja toiseen puolikkaat. Molemmilla alustoilla päätettiin testata kolmea hormonipitoisuutta, 1,0 mg/l, 5,0 mg/ ja 7,5 mg/l. Näin ollen testattavaksi saatiin kuusi alustaa. Vertailun vuoksi mukaan otettiin myös G12-alusta, jolla syreenejä yleensä lisätään MTT:llä. Näin voitiin verrata, kuinka uudet alustat toimivat syreenien perusalustaan verrattuna. Versoja lisättiin kolme kertaa, jotta alkuperäisen alustan vaikutukset versoihin poistuvat. Jokaiselle alustalle tutkittavaksi laitettiin 20 versoa, näin ollen kokeen alkuun saamisessa versoja tarvittiin 280 kappaletta. Molemmissa lajikkeissa käytettiin kahden eri kasvupisteen versoja. Tämä tarkoittaa sitä, että versojen aloitukset on otettu eri kasvupisteestä. Kasvupisteiden välillä on aina eroja, mutta tässä kokeessa niitä ei tutkittu.

Syreenien lisäys tapahtuu perinteisesti MTT:llä lasipurkeissa. Purkit suljetaan foliokorkilla, jonka läpi valo ei pääse. Tässä kokeessa päätettiin käyttää kirkkaita muovikorkkeja, joiden päällä on ilmastointiaukot. Ilmastointiaukkojen ansiosta koeastiassa kiertää ilma ja kasvit karaistuvat. Kokeen viljelyastioiksi valittiin isot koeputket. Näin versot saavat enemmän valoa ja voitiin tutkia valon määrän vaikutusta kasvin kasvuun ja lisääntymiseen. Kuhunkin koeputkeen laitettiin yksi verso.

Ensimmäisen lisäyskerran jälkeen huomasi, että alustoihin oli laitettu suunniteltua BAP-pitoisuutta puolta laimeammat pitoisuudet. Kyseessä oli inhimillinen erehdys ja laskuvirhe. Niinpä toisella ja kolmannellakin kerralla käytettiin sitten laimeampia pitoisuuksia, jotta koko kokeen ajan olisi käytetty samanlaisia alustoja. Positiivista tässä virheessä oli kuitenkin se, että joka tapauksessa kaikilla alustoilla hormonipitoisuus oli huomattavasti korkeampi kuin G12-alustalla, jolla syreenejä yleensä lisätään. G12-alustalla G-suolat ja BAP-pitoisuus on 0,1 mg/l ja kokeessa testattavien alustojen BAP-pitoisuudet olivat 0,5; 2,5 ja 3,75 mg/l.

4 KASVATUSALUSTAN KOOSTUMUS

Mikrolisäyksessä kasvien kasvatusalustat ovat agarilla kiinteytettyjä ravinneliukuksia. Kasvin kasvuun ja kehitykseen *in vitro* vaikuttavat monet tekijät, joiden pohjalta ravinnealusta valmistetaan. Kasvin geneettinen rakenne on ratkaiseva tekijä jokaisessa kasvin kasvun vaiheessa. Geneettisen rakenteen ilmentyminen riippuu kemiallisista ja fysikaalisista olosuhteista, jotka täytyy luoda *in vitro* -kasvatuksessa. Ravinteet eli vesi, sokeri, makro- ja mikroravinteet ovat hyvin olennaisia kasvin kasvun ja kehityksen kannalta. Ilman niitä kasvi ei voi elää *in vitro* eikä *in vivo*. (Pierik 1987, 45.) Ravinteiden puutokset aiheuttavat puutosoireita kasville. Tällaisia ovat esimerkiksi kellastuminen, kuolio, uuden kasvun puute, punaisen värin ilmestyminen ja kasvun ehkäisyminen ja vähentyminen. (Bennet 1993, 4.) Ravinteiden lisäksi fysikaaliset kasvutekijät ovat tärkeitä kasville. Fysikaalisiin tekijöihin kuuluu valo, lämpötila, pH sekä happi- ja hiilidioksidipitoisuudet. Lisäksi kasvi tarvitsee joitakin orgaanisia aineita, kuten vitamiineja ja kasvunsäätteitä kasvaakseen. (Pierik 1987, 45.) *In vitro* tarkoittaa kirjaimellisesti ”lasissa”. Se on tutkimustekniikka, jossa koe suoritetaan koeputkessa, lasimaljassa tai yleisesti elävän organismin tai solun ulkopuolella. *In vivo* on tutkimustekniikka, jossa koe tehdään elävässä organismissa. (Haapala & Niskanen 1992, 9.)

4.1 Vesi

Veden laadulla on suuri merkitys, koska suurin osa alustasta, jopa 95 %, on vettä. Yleisesti tutkimuslaboratoriossa käytetään tislattua vettä ja protoplastien, solujen ja meristeemien viljelmissä kahdesti tislattua vettä. Veden tehtävä on toimia alustassa liuottimena. Ravinteet liukenevat veteen ja näin kasvit saavat ne käyttöönsä. (Pierik 1987, 54.)

4.2 Sokeri

Sokeri on välttämätön *in vitro*-viljelmien kasvulle ja kehitykselle, koska viljelyoloissa yhteyttäminen on riittämätöntä tai se puuttuu kokonaan. Yleisin ja kasveille paras käytetty sokeri kasvatusalustoissa on sakkaroosi eli ruokosokeri, jonka pitoisuus on 1–5 %. Sokerin pitoisuus on hyvin riippuvainen kasvumateriaalin iästä ja tyypistä. Kaupan hyllyltä saatava sokeri on riittävää, koska se on puhdistettua ja se sisältää 99,94 % sakkaroosia, 0,02 % vettä ja 0,04 % muita aineita. (Pierik 1987, 60–61.) Alustoissa voidaan käyttää sokereina myös fruktoosia ja glukoosia. Sakkaroosia käytettäessä valmis alusta sisältää myös glukoosia ja fruktoosia, koska autoklavoitaessa sakkaroosi hajoaa osittain niiksi. Glukoosi edistää kasvin kasvua melkein yhtä hyvin kuin sakkaroosikin. Fruktoosi taas ei ole yhtä tehokas kuin sakkaroosi ja glukoosi, mutta se estää tehokkaasti vesittymistä. Sokereista mannoosi, galaktoosi ja laktoosi ovat sopimattomimmat kasville. (George & Hall & De Klerk. 2008, 125–126.)

Sokerin tehtävä on toimia hiilen ja energian lähteenä sekä osmoottista painetta säätelevänä aineena. Osmoottinen potentiaali kertoo nesteen ioniväkevyyden, mikä taas kertoo nesteen eli veden kulkusuunnan ja nopeuden solukkaan tai sieltä pois päin. Juurten muodostuminen vaatii pienemmän osmoottisen potentiaalilin kuin versojen kehitys ja siten alkioviljelmissä osmoottinen potentiaali pidetään korkeana. (Haapala & Niskanen 1992, 41.)

4.3 Ravinteet

4.3.1 Ravinteiden historiaa

Jo hyvin varhaisessa vaiheessa tiedemiehet keksivät, että kasvi tarvitsee kemiallisia alkuaineita kasvaakseen. 1930-luvulla alkuaineet jaoteltiin kolmeen ryhmään: primaari- ja sekundaarialkuaineet ja hivenaineet. Vuosien saatossa alkuaineita tunnettiin aina enemmän ja enemmän ja 1960-luvulla termit mikro- ja makroravinteet korvasivat aiemman jaottelun. (Bennet 1993, 1.) Makroravinteet ovat niitä alkuaineita, joita kasvi tarvitsee suuria määriä, kun taas mikroravinteilla tarkoitetaan niitä alkuaineita, joita kasvi tarvitsee todella pieniä määriä. Makroravinteet ovat siis pääravinteita ja mikroravinteet hivenravinteita. (George ym. 2008, 65.)

Alkuaineet voidaan jakaa myös niiden tehtävän mukaan neljään ryhmään. Rikki ja typpi kuuluvat ryhmään, jonka tehtävänä on muodostaa orgaanisia yhdisteitä kasvissa. Fosfori ja boori ovat ravinteita, jotka ovat tärkeitä energian varastoinnille tai rakenteellisille yhteneväisyyksille. Kalium, natrium, magnesium, kalsium, mangaani ja kloori ovat ravinteita, jotka pysyvät ionimuodossa. Viimeiseen ryhmään, jonka ravinteet osallistuvat elektronien kuljettamiseen kuuluvat rauta, kupari, sinkki, molybdeeni ja nikkeli. (Taiz & Zeiger 1998, 105.)

4.3.2 Makroravinteet

Makroravinteisiin kuuluu yhdeksän alkuainetta: hiili, vety, happi, typpi, kalsium, kalium, magnesium, rikki ja fosfori (Bennet 1993, 1). Makroravinteet lisätään ravinnealustaan epäorgaanisina suoloina, jolloin kasvi absorboi ravinteet ioneina. Alustassa suolat dissosioituvat eli hajoavat kationeiksi ja anioneiksi. (George ym. 2008, 68.) Yleisesti makroravinteiden pitoisuudet alustoissa ovat luokkaa $1,0 \times 10^{-3}$ mol/l (Collin & Edwards 1998, 19).

Vety, happi ja hiili

Vedyn ja osan hapesta kasvi saa kasvatusalustan valmistuksessa käytetystä vedestä. Happea kasvi saa lisäksi kaasumaisessa olomuodossa kasvatusastiassa olevasta ilmasta. (Bennet 1993, 2) Hiiltä kasvi saa alustaan lisättävästä sokereista. Sokereista sakkaroosi on tehokkain hiilen lähde. (Collin & Edwards 1998, 21.)

Typpi

Typpi absorboituu kasviin joko ammonium- ($-\text{NH}_4^+$) tai nitraatti- ($-\text{NO}_3^-$) ionina. Kasvit, kudokset ja elimet ottavat typpeä tehokkaammin, kun sitä on alustassa sekä ammonium- että nitraatti-ioneina. (George ym. 2008, 73.) Typpeä tarvitaan aminohappojen muodostumiseen kasvissa. Aminohapoista muodostuu proteiineja, ne ovat myös osa geneettistä materiaalia, RNA:ta ja DNA:ta. Typpi on myös tärkeä tekijä monessa metabolisessa reaktiossa. Typen puute huomataan ensimmäiseksi vanhempien lehtien kellastumisena. (Bennet 1993, 2, 4.)

Kalsium ja kalium

Kasvatusalustaan kalsium lisätään joko kalsiumnitraattina ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) tai kalsiumkloridina (CaCl_2). Kalium voidaan lisätä alustaan kaliumkloridina (KCl), kaliumnitraattina (KNO_3) tai kaliumdivetyfosfaattina (KH_2PO_4). (Haapala & Niskanen 1992, 40.) Kalsiumilla on useita tehtäviä solussa. Se on osa tärkeitä rakenteellisia yhdisteitä, kuten kalsiumoksalattia ja kalsiumpektattia. Kalsiumia tarvitaan mm. soluseinän rakennusaineena, se osallistuu pituuskasvuun ja solun jakautumiseen, ja vaikuttaa solunesteen happamuuteen, rakenteelliseen stabiiliuteen ja solukalvon läpäisevyyteen. Lisäksi sillä on rooli mitoosissa ja se toimii muutamien entsyymien aktivaattorina eli se aktivoi, edistää entsyymien toimintaa. (Bennet 1993, 3.) Georgen ja muiden (2008, 88–89.) mukaan kalsiumin puutos huonontaa juurten kasvua ja aiheuttaa kärkilehtien reunojen mustumista ja käpertymistä. Tämän seurauksena verson kasvu lakkaa ja kärki kuolee. Kaliumia tarvitaan kasvin nestejännityksen muodostumiseen ja solujen osmoottisen potentiaalilin ylläpitämiseen sekä pH:n vakaana

pysymiseen solussa. Kalium on myös tärkeä solun kasvulle ja se on myös laatutekijä hedelmien ja kasviksien kasvussa. (Bennet 1993, 3.) Georgen ja muiden (2008, 87) mukaan kaliumin puute voi johtaa mm. kasvin vesittymiseen.

Magnesium ja rikki

Magnesium lisätään kasvatusalustaan magnesiumsulfaattina ($MgSO_4$), josta saadaan alustaan myös rikki. (Haapala & Niskanen 1992, 40.) Magnesiumin tehtäviin kuuluu polypeptidiketjujen muodostumisen aktivointi, rasvojen, öljyjen ja sokereiden muodostumisen avustus sekä monien entsyymien kofaktorina toimiminen. Lisäksi magnesium on olennainen osa klorofyllimolekyylä. Rikki osallistuu mm. vitamiinien ja proteiinien muodostumiseen muodostamalla rikkisiltoja S-S. Lisäksi se syntetisoi joitakin hormoneja ja osallistuu hapetus-pelkistysreaktioihin. Rikki on myös monien koentsyymien rakenteellinen osa. (Bennet 1993, 3.) Rikin puutos voi vaurioittaa proteiinisynteesiä, jonka seurauksena kasveista tulee hauraita (George ym. 2008, 88).

Fosfori

Fosfori lisätään alustaan joko kalium- (KH_2PO_4) tai natriumdivetyfosfaattina (NaH_2PO_4) (Haapala & Niskanen 1992, 40). Fosforia on kasvin yhdisteissä kuten entsyymeissä ja proteiineissa, ja se on fosfoproteiinien ja –lipidien sekä nukleiinihappojen rakenteellinen osa. Kasvin elinkaaressa fosforilla on elintärkeä rooli ja se on hyvin tärkeä lisääntymisessä. Fosfori on tärkeä kypsymiselle, hedelmän laadulle ja siementen muodostumiselle. Lisäksi fosfori osallistuu lähes kaikkiin metabolisiin prosesseihin, ja sillä on avainrooli reaktioissa joihin ATP osallistuu. Fosforin puute voi aiheuttaa punaista väriä kasvin lehtiin. (Bennet 1993, 2, 4.)

4.3.3 Mikroravinteet

Mikroravinteisiin kuuluu useita alkuaineita: sinkki, boori, kupari, koboltti, molybdeeni, mangaani, jodi, kloori, pii, natrium ja vanadium sekä joskus alumiini ja nikkeli (Bennet 1993, 1). Mikroravinteita käytetään pienempinä pitoisuuksina kuin makroravinteita, kun niiden pitoisuudet alustoissa ovat luokkaa $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l (Collin & Edwards 1998, 20).

Sinkki, kupari ja mangaani

Sinkki, kupari ja mangaani lisätään alustaan sulfaattina (Zn-, Cu-, MnSO_4) (Haapala & Niskanen 1992, 41). Sinkki on monessa entsyymisysteemissä metallikomponenttina ja etenkin sellaisissa systeemeissä, jotka toimivat osana elektronin siirtosysteemiä ja proteiinisynteesiä. Lisäksi sinkki osallistuu kasvin kasvuun olemalla osa auksiinia. Kupari osallistuu myös moniin entsyymisysteemeihin. Kupari osallistuu soluseinien muodostumiseen ja muiden mikroravinteiden tavoin elektronien siirtämiseen ja hapetusreaktioihin. (Bennet 1993, 3.) Mangaanilla on tehtävä fotosynteesissä ja soluhengityksessä. Lisäksi se on myös monen entsyymisysteemin komponentti ja sitä tarvitaan mm. hapetus-pelkistysreaktioihin. (George ym. 2008, 92.)

Boori, koboltti, molybdeeni ja kloori

Boori lisätään kasvatusalustaan boorihappona (H_3BO_3), koboltti kobolttikloridina ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) ja molybdeeni natriummolybdaattina ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$). Klooria alustaan saadaan makroravinteiden klorideista. (Haapala & Niskanen 1992, 41.) Boori osallistuu sokereiden kuljettamiseen solussa. Sokereiden ja tärkkelyksen muodostumisen kautta se vaikuttaa soluhengitykseen. Lisäksi se vaikuttaa solun kehittymiseen ja hiilidioksidimetaboliaan. Koboltti osallistuu etenkin matalampien kasvien kasvuun ja molybdeeni toimii kahden entsyymin metallikomponenttina. Lisäksi molybdeeni osallistuu nitraatin pelkistämiseen. Kloorin tehtävä on varastoida valoenergiaa fotosynteesissä. Lisäksi se osallistuu kaliumin kanssa osmoottisen paineen säätelyyn. (Bennet 1993, 4.)

Pii, jodi, natrium ja vanadium

Jodi lisätään alustaan kaliumjodidina (KI). Jodia ei ole tunnistettu kasvin ravitsemukselle olennaiseksi alkuaineeksi kuten muita edellä mainittuja. Kuitenkin jodia käytetään paljon kasvatusalustoissa. (George ym. 2008, 96.) Natrium osallistuu osmoottiseen säätelyyn ja lisäksi se täydentää kaliumin toimintaa. Vanadium osallistuu kasvin prosesseihin. Se osallistuu hapetus-pelkistysreaktioihin, edistää klorofyllin synteesiä ja esiintyy molybdeenin korvikkeena. Pii muodostaa Si-entsyymikomplekseja, jotka toimivat fotosynteesin ja muiden entsyymien toiminnan suojelejoina ja säätelijöinä. Sillä on myös rooli soluseinien rakenteellisessa jäykkyydessä. (Bennet 1993, 4.)

4.3.4 Rauta

Rauta on tärkeä klorofyllin synteesille, fotosynteesille ja elektronien siirrolle. Lisäksi se osallistuu elektronien kuljetukseen ja hapetus-pelkistysreaktioihin entsyymisysteemien ja proteiinisynteesin lisäksi. (Bennet 1993, 3.) Kasvatusalustaan rauta lisätään rautasulfaatista (FeSO_4) ja Na_2 -EDTA:sta valmistetusta liuoksesta. EDTA:n (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) tehtävä on pitää rauta nestemäisenä kelaattina. Tämä edistää alkionkehitystä ja juurten kasvua joissakin solukkoviljelmissä. (Haapala & Niskanen 1992, 41.) George ja muut (2008, 98) ovat havainneet, että kelaattimuodossa rauta toimii korkeammassa pH-olosuhteissa ja on vähemmän myrkyllinen.

4.4 Vitamiinit

Kasvatusalustaan lisätään vitamiineja, koska ne ovat välttämättömiä kasvin kehitykselle ja ne osallistuvat entsyymien toimintaan. Alustoihin lisätään vain pieniä määriä vitamiineja, 0,1–1 mg/l, koska kasvit syntetisoivat itsekin vitamiineja solukkoviljelyoloissa. Pääosin alustaan lisätään vesiliukoisia B-ryhmän vitamiineja, mutta joskus myös C-vitamiinia. (Haapala & Niskanen 1992, 43.) Aikoinaan alustoihin lisättiin hiivauutetta aminohappojen ja vitamiinien, etenkin

tiamiinin ja inositolin lähteeksi. Myöhemmin kuitenkin todettiin, että hiivauutteen voi korvata glysiinillä, lysiinillä, arginiinilla, tiamiinilla tai nikotiinihapolla. Nykyään hiivauutetta käytetäänkin vain harvoin. (George ym. 2008, 119.)

B-ryhmän vitamiinit

Alustaan lisättäviä B-ryhmän vitamiineja ovat tiamiini, riboflaviini, nikotiinihapo, pantoteenihappo, biotiini, pyridoksiini, para-aminobentsoehappo, foolihappo ja inositoli. (Haapala & Niskanen 1992, 43.) Tiamiini, joka on inositolin lisäksi käytetyin, toimii tiamiinipyrofosfaattimuodossa olennaisena kofaktorina hiilihydraattien metaboliassa ja se osallistuu joidenkin aminohappojen biosynteesiin. Sekä tiamiinilla että pantoteenihapolla on vaikutus kudosten kasvuun. Lisäksi pantoteenihappo parantaa kalluksen kasvua. Foolihappo parantaa kudoksen lisääntymistä valossa ja hidastaa sitä pimeässä. Riboflaviinin on puolestaan havaittu inhiboivan kalluksen muodostumista. (George ym. 2008, 118.)

Inositolin (myo-inositoli, mesoinositoli) tarve alustassa on suurempi kuin muiden vitamiinien. Inositoli on kasvien luonnollinen rakennusaine ja se on välttämätön ravinne joillekin kasveille. Lisäksi se osallistuu pektiinin ja hemiselloosan synteesin, joita tarvitaan soluseinässä. (George ym. 2008, 118.)

Muut vitamiinit

C-vitamiini eli askorbiinihapo toimii antioksidanttina ja lisäksi se osallistuu solujen jakautumiseen ja pidentymiseen. C-vitamiinia voidaan käyttää myös mustumisen ehkäisemiseen ja kudoksen eristykseen. Lisäksi E-vitamiini eli α -tokoferoli toimii myös antioksidanttina. Joillakin D-ryhmän vitamiineilla, kuten D₂ ja D₃ vitamiineilla, on kasvikudoksen kasvua säätelevä vaikutus. (George ym. 2008, 118–119.)

Agar ja muut lisäaineet

Fyysisesti kasvatusalustan koostumus on kiinteä. Kiinteäksi se tehdään agarilla, joka on valmistettu levästä. Veteen liuotettuna agar saa nesteen hyytymään. Yleensä agarin pitoisuus alustassa on 0,6–0,8 % luokkaa. Hyytymiseen vaikuttaa myös liuoksen pH. Jos pH-arvo on alhainen, agar hyytyy heikosti. (Pierik 1987, 55–56.) Agarin vaihtoehtona voidaan käyttää gelriittiä, selluloosaa, vaahtomuovia, polyakryyliamidia, suodatinpaperia tai lasihemiä. (Haapala & Niskanen 1992, 40.)

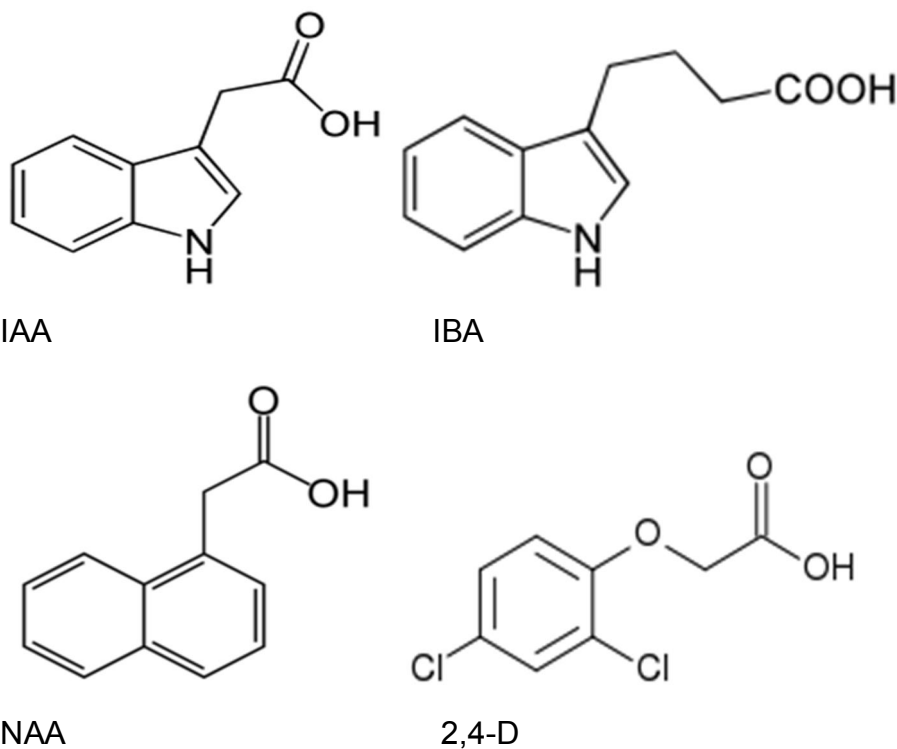
Orgaanisen typen lähteenä voidaan käyttää aminohappoja, kuten L-glutamiinia, adeniinia ja aspargiinia. MTT:llä alustoihin lisätään myös Bacto-Peptonea, joka edistää sienten ja bakteerien kasvua. Näin kasvin sisäinen infektio saadaan paljastettua eikä se silloin siirry eteenpäin muihin versoihin. (Haapala & Niskanen 1992, 43, 52.) Alustoissa voidaan käyttää myös aktiivihiiltä, joka estää joko agarista tai kasvista erittyvien myrkyllisten aineiden vaikutusta. Lisäksi se estää kasvin ruskettumisen ja mustumisen, edistää versojen juurtumista samalla vähentäen kasvihormonien tehokkuutta. (Pierik 1987, 79.)

4.5 Kasvunsäätteet

Kasvunsäätteitä kasvi tarvitsee hyvin pieninä pitoisuuksina. Kasvunsäätteet säätelevät kaikkien aineiden jakautumista kasviin ja siten ovat vastuussa solun jakautumisesta, kasvusta, kehityksestä jne. Kasvunsäätteiden toimintaan vaikuttavat kasvin geneettinen rakenne ja ympäristö ja niiden toiminta on hyvin monimutkainen prosessi. Tärkeimmät kasvunsäätteet ovat auksiinit, sytokiiniinit ja gibberelliinit, jotka ovat kasvihormoneja. On myös muita aineita, jotka säätelevät kasvin kasvua. Niitä ovat esim. ABA eli abskissihappo, oligosakkariniinit ja etyleeni. (Pierik 1987, 45–46)

4.5.1 Auksiinit

Auksiinit ovat kasvihormoneja, jotka säätelevät kasvin pituuskasvua. Ne säätelevät niin verson kuin juurenkin pituuskasvua. Auksiinin vaikutuksesta kasvi kääntyy kohti valoa. Yleisin solukkoviljelyssä käytetty auksiini on luonnonauksiini IAA eli indolietikkahappo, jota tuottuu kasvissa itsessään, varren kärjessä. Lisäksi käytössä on keinotekoisia auksiineja kuten NAA (α -naftaleeni-etikkahappo), IBA (indolivoihappo) ja 2,4-D (2,4-diklorfenoksietikkahappo). Auksiini kulkeutuu polaarista kasvin kärjestä juuriin. Kuviossa 3 on esitetty näiden auksiinien kemialliset rakenteet. Yhteistä kaikkien auksiinien kemiallisessa rakenteessa on se, että jokaisessa on aromaattinen rengas, mikä on olennaista auksiinin aktiivisuudelle. (Taiz & Zeiger 1998, 546–547, 550.)



KUVIO 3. IAA-, IBA-, NAA- ja 2,4-D-auksiinien kemialliset rakenteet

Ensisijaisesti auksiinit edistävät kasvin pituuskasvua löyhentämällä soluseinää. Se tapahtuu niin, että auksiini saa solun kuljettamaan protoneja soluseinään stimuloimalla H^+ -ATPaasia. Protonien pursotukseen soluseinään tarvitaan kahta mekanismia: protonipumpun aktivointi ja solukalvon H^+ -ATPaasin synteessin parantaminen. On oletettu, että aluksi auksiini sitoutuu reseptoriinsa eli ABP1:seen (AuksinBindingProtein 1), joka aktivoi solukalvon H^+ -ATPaasi-ionipumppua. Tästä johtuen soluseinän pH laskee ja proteiinit, joita kutsutaan ekspansiineiksi, aktivoituvat. Ekspansiinit löyhentävät soluseinää katkomalla seinässä olevien polysakkaridien komponenttien välisiä vetysidoksia. (Taiz & Zeiger 1998, 584–585.)

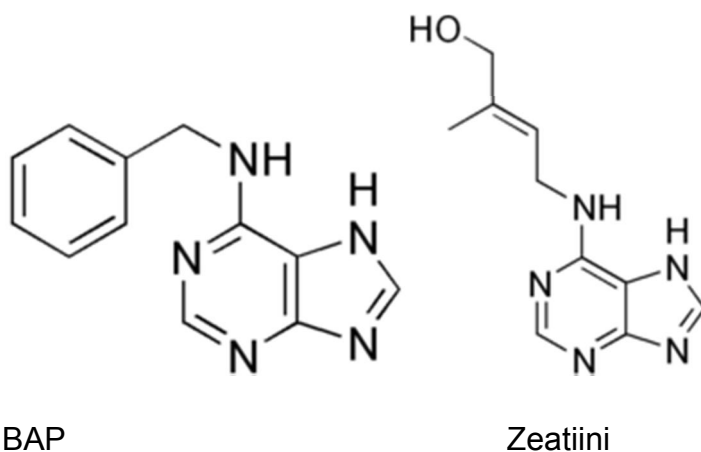
Auksiinien tunnetuimmat fysiologiset vaikutukset ovat varren pituuskasvun ja juurten kasvun edistäminen. Tropismi on kasvin kasvavien osien kasvuliikkeiden nimitys, joissa ärsykkeeseen, kuten valo ja painovoima, suunta määrää kasvin osan liikkeen suunnan. Fototropismi ja gravitotropismi ovat auksiinin fysiologisia vaikutuksia ja ne säätelevät kasvin kasvun suuntautumista. Fototropismilla tarkoitetaan ilmiötä, jossa kasvin kasvu riippuu valosta. Auksiinia siirtyy enemmän varjon kuin valon puolelle ja tämän vuoksi kasvu kääntää varren kohti valoa. Juuressa auksiinin vaikutus on päinvastainen ja juuri kääntyy valosta pois päin eli syvempään maahan. Gravitotropismilla tarkoitetaan ilmiötä, jossa kasvin kasvu riippuu maan vetovoimasta. Tämä näkyy kun vaakatasoon laitettussa kasvissa auksiinia siirtyy varren alempaan osaan, jolloin alapuoli kasvaa nopeammin ja verso kääntyy ylöspäin. Juuressa vaikutus päinvastainen, jolloin auksiini estää solujen kasvua ja juuri kääntyy alaspäin. (Taiz & Zeiger 1998, 564–568.)

Lisäksi auksiinilla on keskeinen rooli ilmiössä nimeltä apikaalidominanssi, jolla tarkoitetaan kärkisilmun säätelemää kasvin kasvua ja haarautumista. Auksiinin välityksellä kärkisilmu säätelee hankasilmujen kehitystä ja pitää ne lepotilassa. Auksiinilla on säätelyrooli mm. juurien haarautumisessa, lehtien ja hedelmien putoamisessa ja kiinni pysymisessä, solukkojen erilaistumisessa ja kukkasilmujen muodostumisessa. (Taiz & Zeiger 1998, 585.)

Monet auksiinien vaikutuksista tapahtuu yhdessä joko gibberelliinien tai sytokiniinien kanssa. Auksiineja voidaan käyttää myös rikkakasvien torjunnassa, koska liian suurina annoksina auksiinit toimivat pikemmin kasvun ehkäisijöinä kuin edistäjinä. (Bremer 1983, 14.)

4.5.2 Sytokiniinit

Sytokiniinit ovat kasvihormoneja, jotka edistävät solunjakautumista. Sytokiniinien toiminta vaatii usein myös auksiinin läsnäolon. Sytokiniinit ovat N⁶-substituoituja aminopuriineja. Yleisin solukkoviljelyssä käytetty luonnon sytokiniini on zeatiini, joka voi esiintyä kasvissa aminopuriinina, ribosidina, ribotidina tai glykosidina. Toinen käytetty luonnon sytokiniini on isopentenyladeniini (IPA = 2iP). Lisäksi on käytössä keinotekoisia sytokiniineja, kuten kinetiini ja bentsyladeniini (BAP = BA = 6-bentsylaminopuriini). Myös sytokiniinien rakenteista löytyy rengasrakenne. (Taiz & Zeiger 1998, 622–625, 647.) Kuviossa 4 on esitetty zeatiinin ja bentsyladeniinin rakenteet.



KUVIO 4. Bentsyladeniinin (BAP) ja zeatiiniin kemialliset rakenteet

Sytokiniiniä syntetisoituu kasvin juurissa, kehittyvissä alkioissa ja aitosyöpäkudoksessa. Sytokiniiniä on runsaasti versojen ja juurien kärkimeristeemien nuorissa, nopeasti jakautuvissa soluissa. Ne siirtyvät passiivisesti versoon juuresta puuaineksen läpi, veden ja mineraalien mukana. Sytokiniinien toiminnan mekanismia ei tunneta. (Taiz & Zeiger 1998, 647–648.)

Sytokiniinit osallistuu monien kasvin prosessien säätelyyn, kuten solun jakautuminen, versojen ja juurien muodon kehittyminen, viherhiukkasten kypsyminen, solujen laajentuminen ja vanhentuminen. Sytokiniinin ja auksiinin määrän suhde määrää viljellyn kasvisolukon erilaistumisen joko juuriin tai silmuihin. Korkea suhde edistää juuria ja matala suhde silmuja. (Taiz & Zeiger 1998, 647–648.) Sytokiniinit voivat korkeampina pitoisuuksina saada aikaan jälkiversojen muodostumisen, mutta tällöin juurien muodostuminen estyy. Ne edistävät hankaversojen muodostumista vähentämällä apikaalidominanssia ja ne hidastavat vanhenemista. (Pierik 1987, 70)

6-pentsylaminopuriini, BAP on erittäin tehokasvaikutteinen, synteettinen sytokiniini. Se edistää sivusilmujen solujen jakautumista ja heikentää pääversion hallitsevaa vaikutusta, joka muutoin estäisi sivuversojen muodostumisen. (Bremer 1983, 16)

4.5.3 Gibberelliinit

Gibberelliinit ovat kasvihormoneja, jotka edistävät varren pituuskasvua. Gibberelliinejä ei yleisesti käytetä alustoihin kuin tietyillä kasveilla. (Pierik 1987, 71) On havaittu, että ne edistävät dramaattisesti ruusulajien ja kääpiökasvuisten lajien sekä ruohokasvien kasvua. Gibberelliinit vaikuttavat myös hedelmien kypsymiseen, kukkien sukupuoleen sekä siementen itämiseen. Gibberellinien estäjiä voidaan käyttää kun halutaan kasvusta matala ja tuuhea. Gibberellinijyhdisteitä tunnetaan yli 110. Ne on nimetty löytämisjärjestyksessä eli ensimmäinen on GA₁, toinen GA₂ jne. (Taiz & Zeiger 1998, 615.) Pääasiallisesti käytetyin on gibberelliinihappo GA₃. Gibberelliiniä muodostuu versojen kär-

kisilmuissa, kasvavissalehdissä, hedelmissä ja juurissa. Ne kulkeutuvat kasvin kaikkiin osiin siiviläputkissa. Gibberellinit vaativat auksiinia toimiakseen vaikkakin joissakin tapauksissa niiden vaikutustavat ovat täysin päinvastaisia. Esimerkiksi pistokkaiden juurten muodostusta auksiini edistää ja gibberelliini ehkäisee. (Bremer 1983, 15.)

4.5.4 Muut kasvunsäätteet

Muita aineita, joita voidaan käyttää kasvunsäätteinä, ovat oligosakkariinit, etyleeni, ABA eli abskissihappo, adeniinisulfaatti, polyamiinit sekä fenyyliurea ja sen johdannaiset. Oligosakkariinit edistävät kasvin puolustautumista patogeeniä ja muita rasituksia vastaan. Lisäksi ne säätelevät kasvin kasvun nopeutta ja juurten, kukkien ja vegetatiivisten silmujen erilaistumista. Etyleeniä, joka on väritön ja makeanhajuinen kaasu, kasvit tuottavat itse. Mm. etyleeni nopeuttaa hedelmien ja kukkien kypsymistä ja vanhenemista. ABA:lla sen sijaan on todettu olleen monissa tapauksissa huono vaikutus *in vitro* kasvatuksessa ja hyvätkin tulokset ovat olleet satunnaisia. Adeniinisulfaatti toimii sytokiniinin tavoin ja se lisää versojen kehitystä. Polyamiineilla on todettu olevan vaikutusta solujen erilaistumisessa ja embryogeneesissä. Fenyyliureaa ja sen johdannaisia käytetään hyvin pieninä pitoisuuksina. Niillä on todettu olevan vaikutusta versojen muodostumiseen ja määrään. (Pierik 1987, 71 – 79.)

4.6 Muut kasvin kasvuun vaikuttavat tekijät

Ravinteiden ja orgaanisten aineiden lisäksi kasvin kasvuun *in vitro* vaikuttavat itse kasvimateriaali ja fyysiset tekijät: valon laatu ja määrä, lämpötila, pH, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet. Kasvuun vaikuttavia tekijöitä ovat myös kasvatushuone, astian koko ja astian ja huoneen kosteus. (Pierik 1987, 45.)

4.6.1 Kasvimateriaalin vaikutus

Pierikin mukaan (1987, 107–113) kasvimateriaalilla itsellään ominaisuuksiineen on yhtä lailla vaikutusta kasvin kasvuun ja kehitykseen *in vitro*. Ominaisuudet ja asiat ovat lueteltu edellä

- genotyyppi
- kasvin ikä
- kudoksen ikä
- fysiologinen tila
- kasvin terveydentila
- eri vuosien vaikutus
- kasvuolosuhteet
- kasvin asento
- kasvin koko
- vammat
- istutus tapa
- hoidon vaikutus
- esikäsitteily

4.6.2 pH-arvo

Kasvatusalustan pH:ta tarkastellessa on hyvä ottaa huomioon kolme eri pH:ta, verson sisäinen pH, alustan pH sekä verson ja alustan välinen pH. Alustan pH:n tulee olla juuri sopiva, jotta se ei häiritse kasvikudosta. Lisäksi oikeanlainen pH pitää suolat liukenevassa muodossa, vaikuttaa ravinteiden ja kasvun-säätteiden ottoon, kemiallisiin reaktioihin ja agarin hyytymistehokkuuteen. PH:n arvo tulisi säätää 5,5–6,0 välille. Väärä arvo vaikuttaa ravinteiden ottoon ja ionien saatavuuteen. (George ym. 2008, 143.)

4.6.3 Valo ja lämpötila

Valo on aika hankala tekijä tarkasteltavaksi, koska siihen liittyy niin monia tekijöitä, kuten päivän pituus, säteily ja spektrinen koostumus (riippuu lampusta). Päivän pituus kasvatusolosuhteissa on yleensä 14–16 tuntia, mutta myös jatkuvaa valaistusta käytetään. On myös tapauksia, joissa kasvu on parasta jatkuvassa pimeydessä. Lämpötila pidetään yleensä 24–26 °C:n välillä. Lajista riippuen voidaan valita myös korkeampia ja matalampia lämpötiloja. Matalaa lämpötilaa voidaan tarvita mm. kukkien siementen muodostumiseen, lepotilan katkaisuun ja siementen idättämiseen. Joskus tarvitaan myös vaihtelevia lämpötiloja esimerkiksi juurten muodostumisen parantamiseen. Huomioitavaa on myös, että astian sisällä lämpötila on 3–4 °C korkeampi kuin kasvatushuoneessa. (Pierik 1987, 119, 122.)

4.6.4 Happi- ja hiilidioksidipitoisuus

Hyvällä ilmastoinnilla on havaittu olevan tärkeä vaikutus solujen ja kudosten kasvuun. Orgaanin muodostuminen ja jälkisilmujen muodostus on parempaa olosuhteissa, joissa on runsaasti happea. Hiilidioksidia voidaan käyttää hiilen lähteenä. On todettu, että CO₂-lisäyksellä on hyvin pieni merkitys, koska CO₂-pitoisuus koeastiassa on jo valmiiksi korkea. Huomioitavaa on myös se, että fotosynteesi *in vitro* on vähäisempää kuin normaalisti koska säteilyn taso on matalampi. (Pierik 1987, 124.)

4.7 Kasvatusalustan valmistus, säilytys ja sterilointi

Kasvatusalustan valmistetaan laboratoriossa puhtailla laboratoriovälineillä. Valmis alusta täytyy steriloida toisin sanoen tehdä vapaaksi mikro-organismeista, jotta kasvit eivät kontaminoidu. Yleensä sterilointi tehdään autoklavoimalla, mutta sen voi tehdä myös kemiallisilla aineilla, säteilytyksellä tai suodatuksella/pesulla. Alustan täytyy säilyä pitkiäkin aikoja, joten sitä tulisi säilyttää pimeässä matalassa lämpötilassa (5 °C). (Pierik 1987, 31, 36, 82.)

5 MIKROLISÄYS

Haapalan ja Niskasén mukaan (1992) mikrolisäyksellä tarkoitetaan solujen, solukoiden ja kasvinosien viljelyä irrallaan kasvista steriileissä oloissa. Toisin sanoen emokasvista irrotetaan kappaleita ja niitä viljellään kasvatusalustalla, joka sisältää solukon elossa pitämiseen tarvittavia aineita. Kaasumaisen hapen ja vedyn solukko saa kasvatusastiassa olevasta ilmasta. (Mts. 13.) Jo varhain 1800-luvulla esitettiin teoria, jonka mukaan kasvien solukkolisäyksen perustana on totipotenssi. Totipotenssilla tarkoitetaan teoriaa, jonka mukaan kasvisolut ovat toisistaan riippumattomia ja jokainen erillinen solu voi kasvaa kokonaiseksi kasviksi. (Pierik 1987, 21.)

Periaatteessa kasveja voidaan lisätä kahdella tavalla, vegetatiivisesti (kasvullisesti) ja generatiivisesti (lisääntymissoluista). Molemmat tavat voivat olla mahdollisia tietyissä oloissa. (Pierik 1987, 183.) Kasvin generatiivisia osia ovat siitepölyhiukkaset ja munasolut. Kun viljely aloitetaan näistä osista, saadaan emokasvista poikkeavia kasveja. Kasvin vegetatiivisia osia ovat kaikki loput kasvin osat ja niistä saadaan tuotettua täsmälleen emokasvin kaltaisia kasveja eli voidaan puhua kloonauksesta. Mikrolisäyksessä käytetään kasvin vegetatiivisia osia. Muita vegetatiivisen lisäämisen muotoja ovat varttaminen ja pistokaslisäys. Näistä mikrolisäys eroaa käytetyn kasvinosan koon ja aseptisen työskentelyn vuoksi. (Haapala & Niskanen 1992, 15, 22.)

Perinteinen pistokaslisäys tehdään *in vivo*. Pistokkaat otetaan hyvin kasvavasta emokasvista oksien latvaosasta. Pistokas katkaistaan lehtihangan alapuolelta ja alimmat lehdet ja latva katkaistaan. Tämän jälkeen pistokkaat dipataan kymmenen sekunnin ajan liuoksessa, jossa on 100 mg/l juuritus-hormoni KIBA:a (indoli-3-voihapon kaliumsuola) ja 50 mg/l boorihappoa. Dippauksen jälkeen ne laitetaan turpeelle niin, että niiden tyvi ulottuu turpeeseen. Turve suihkutetaan homeen estoaineella ja pistokkaat peitetään muovihupulla kuu-kauden ajaksi, jonka aikana niitä karaistaan pikkuhiljaa ja pistokkaiden tulisi

kehittää juuret. Pistokaslisäys on paljon työlämpi menetelmä kuin mikrolisäys.

Collinsin ja Edwardsin (1998) mukaan mikrolisäys mahdollistaa parhaiden koriste- ja hedelmäpuiden, vihannesten, marjakasvien ja metsän puiden lisäämisen. Esimerkiksi perennoille vegetatiivinen lisäys on ainoa sopiva menetelmä, koska risteyttäminen, valinta ja siementen tuottaminen ei niille sovi. Tämä johtuu siitä, että valinta voidaan tehdä vasta aikuisiässä ja perennalla se on 40 vuotta. (Mts. 121.) Risteyttäminen ja valinta ovat perinteisiä kasvinjalostuksen menetelmiä parhaiden yksilöiden löytämiseksi. Solukkoviljelyn eri muodot ovatkin helpottaneet ja nopeuttaneet jalostustyötä suuresti. (Haapala & Niskanen 1992, 23.)

5.1 Mikrolisäyksen vaiheet

Mikrolisäys tapahtuu viidessä vaiheessa. Aloitusvaiheessa emokasvin verson silmuista otetut kasvupistesolukot paisutetaan ravintoalustalla ja niistä kasvaa pieniä mikroversoja. Lisäsvaiheessa mikroverso siirretään verson kasvua edistävillä aineilla terästetylle ravintoalustalle lisääntymään. Mikroversion lehtihangoissa olevien silmujen kasvupisteet reagoivat ravintoalustaan ja uusia versoja alkaa kehittyä muutamassa päivässä. Uusista versoista muodostuu versotuppaita, jotka jaetaan yksittäisiksi versoiksi 4–6 viikon välein ja näin muodostuneet mikropistokkaat laitetaan joko uudelleen lisääntymään tai ne siirretään juurrutusvaiheeseen.

Mikropistokkaiden juurrutus voidaan tehdä joko laboratoriossa steriileillä juurrutusaloilla tai suorajuurrutuksena, jolloin mikropistokkaat siirretään suoraan kasvihuoneeseen turvealustoille. Noin kahden senttimetrin mittaiset mikropistokkaat käsitellään auksiini-hormonilla, jonka ansiosta juuristo muodostuu noin kahden viikon kuluessa. Sopeuttamisvaiheessa juurtuneet mikropistokkaat koulitaan turvealustalle ja samalla ne totutetaan varovasti kasvihuoneilmastoon. Viimeisessä vaiheessa eli taimikasvatusvaiheessa mikrotaimet ovat

elinvoimaisia ja nopeasti kehittyviä ja saavuttavat muutamassa viikossa pistokastaimien koon. Mikrotaimia jatkokasvatetaan kunnes lopputuloksena on täysi-ikäinen ja laadukas taimi.

5.2 Aloitukset

Solukkoviljelyssä viljellään joko yksittäisiä soluja, protoplasteja, erilaistumatonta kallussolukkoa tai erilaistuneita solukoita. Tekniikoita aloitusten ottamiseen on useita, mutta kun aloitusvaihe on tehty, mikrolisäys etenee saman kaavan mukaan kaikilla solukkoviljelyn lajeilla. (Haapala & Niskanen 1992, 15.)

5.3 Meristeemiviljelmät

Meristeemi on kasvin kasvusolukkoa, joka ei ole erilaistunut miksikään kasvinosaksi. Meristeemisolukkoa on kaikissa kasvin kasvavissa osissa, mutta viljely on helpointa aloittaa meristeemistä, joka sijaitsee silmun sisällä, lehdenniheiden suojassa, silmun kasvupisteessä. (Haapala & Niskanen 1992, 15.) Meristeemiksi kutsutaan myös aivan kasvin kärkeä (0,1–0,5 cm pitkä kärkiosa). Meristeemi on suhteellisen vapaa kaikista bakteereista, sienistä ja viruksista, joten siitä tuotetut emokasvit ja kloonit ovat puhtaita. (Collin & Edwards 1998, 127.)

Steriilisti irrotetut meristeemit siirretään kasvatusalustalle, jonka jälkeen viljelyastia suljetaan ja siirretään kasvatushuoneeseen. Yleensä solukkoviljelyssä kasvit siirretään uudelle alustalle noin neljän viikon välein, mutta meristeemit vaativat siirron jopa yhden tai kahden päivän välein. Tämä johtuu siitä, että meristeemit erittävät herkästi fenoleita kasvatusalustaansa ja näin myrkyttävät itse itsensä. Useilla alustan vaihdoilla välttyään fenolien aiheuttamilta haitoilta. Kun meristeemi on sopeutunut hyvin solukkoviljelyyn ja lähtee kasvamaan, mikrolisäystä voidaan jatkaa lähes loputtomiin tai niin kauan kunnes haluttu määrä versoja on tuotettu. (Haapala & Niskanen 1992, 17.)

5.4 Verson kärki- ja hankasilmuviljely

Verson kärki- ja hankasilmuviljelät aloitetaan kuten meristeemiviljelmätkin silmusta, mutta nyt aloitukseen otetaan joko koko silmu tai vielä suurempi pala. Aloituksessa voi olla varttakin mukana, ei kuitenkaan yli kymmentä millimetriä, jossa on yksi tai useampi silmu. (Haapala & Niskanen 1992, 18.) Emokasvin, josta silmut otetaan, tulee olla vapaa taudeista ja tuholaisista. Lisäksi silmut eivät saa olla lepotilassa eikä kasvilla saa olla takana pitkittynyttä vesi- tai ravinnestressiä. (Collin & Edwards 1998, 125.) Irrotuksen jälkeen aloituskappale asetetaan kasvatusalustalle pintasteriloinnin jälkeen joko pystyyn tai vaakaan kuitenkin niin, että silmut ovat lähellä kasvatusalustaa. Noin kolmen viikon kuluessa silmuista kasvaneet versot ovat 15–20 millimetriä pitkiä. Sitten ne katkotaan siten, että jokaiseen palaan jää taas 1–3 silmua. Ja niin edelleen jatketaan mikrolisäystä, kunnes haluttu määrä versoja on saatu. (Haapala & Niskanen 1992, 18.)

5.5 Kallusviljelmät

Kallus on enemmän tai vähemmän epäjärjestäytyneitä kasvisolukkoa, jota syntyy kudosten ja elinten haavakohtiin. Monilla eri lajeilla on mahdollista tuottaa kallusta ja siitä edelleen viljelmiä. (Pierik 1987, 213). Kallusta muodostuu aina kasvin leikkauspintaan. Kallusviljelmien käyttöä kasvien kloonauksessa ei kuitenkaan pidetä suositeltavana, koska muuntelun mahdollisuus on suuri erilaistumattoman solukon vuoksi. Aluksi kallusta kasvatetaan runsaasti auki sisältävällä alustalla pimeässä, jonka jälkeen kasvatusta jatketaan aukiinittomalla alustalla valossa. Kalluksen soluista alkaa muodostua alkioita ja niistä edelleen versoja, joita voidaan lisätä kuten meristeemiviljelmienkin versoja. (Haapala & Niskanen 1992, 19.)

5.6 Muita viljelmiä

Kasvien aineenvaihdunnan tuloksena muodostuu esim. lääketeollisuuden käyttämiä aineita, kuten penisilliiniä ja streptomysiiniä. Näiden kemiallisten yhdisteiden tuottamiseen voidaan käyttää solu- ja suspensioviljelmiä vaikkakin tällaiset sovellukset kasvisoluilla ovat melko vähäisiä. Viljelmiä varten kasvatettu kallus hajotetaan ja siirretään nesteviljelyalustalle, suspensioviljelmäksi. Alustalla solut lisääntyvät jakaantumalla ja joko erittävät alustaan haluttua kemikaalia tai sitä voidaan uuttaa itse soluista. (Haapala & Niskanen 1992, 19.)

Solua ympäröi paksu soluseinä, joka suojaa solua. Kuitenkin sen läpi on vaikea siirtää isoja molekyyliä, vesirakkuloita ja organelleja soluun. Soluseinä voidaan poistaa kemiallisesti ja näin saadaan eristettyä protolasteja. (Collin & Edwards 1998, 71.) Protoplastien tuottamiseen voidaan käyttää kaikkia kasvin osia. Protoplasteja voidaan käyttää mm. geenisiirroissa joko siirtämällä niihin irrallista DNA:ta tai fuusioimalla protoplasteja keskenään somaattisten hybridiin aikaansaamiseksi. Protoplastit siirretään kasvatusalustalle, jolla niihin muodostuu uudelleen soluseinä ja ne muuttuvat soluviljelmiksi. Solut alkavat jakautua nopeasti ja ne alkavat muodostaa kallusta. Näin muodostuu kallusviljelmä, josta versot sitten erilaistuvat. (Haapala & Niskanen 1992, 19.)

Lisäksi voidaan tehdä hede- ja siitepölyviljelmiä ja alkioviljelmiä. Hedeviljely aloitetaan heteiden ponsista ja siitepölyviljelyssä siitepölyhiukkaset erotellaan heteistä ja siirretään kasvatusalustalle. Alkioviljelyä voidaan käyttää kahden eri kasvilajin risteytysjälkeläisen pelastamiseen silloin kun siemenvalkuainen ei kehity siemenessä. (Haapala & Niskanen 1992, 20.) Kasvien lisäys on mahdollista myös jälkisilmuviljelmistä. Solut, jotka ovat ei-meristeemisiä, muuttuvat kasvatusalustalla meristeemiseksi soluiksi. Näitä soluja kutsutaan meristemoideiksi. Näistä meristemoideista, jotka syntyvät kalluksessa, kehittyvät juurta tai vartta. (Collin & Edwards 1998, 127.)

5.7 Mikrolisäyksen edut ja haitat

Mikrolisäyksen huomattavin etu perinteiseen pistokaslisäykseen on nopeus. Mikrolisäyksellä pystytään yhdestä emokasvista tuottamaan rajattomia määriä kasveja ja viljelmien aloitukseen tarvitaan vain pieni pala kasvia. Mikrolisäyksellä lisätyt kasvit vievät myös huomattavasti vähemmän tilaa kuin sama määrä pistokaslisäyksellä lisättyjä taimia. Solukkoviljelyn etuna pidetään myös sitä, että kasveja voidaan lisätä ympäri vuoden eikä vain tiettyinä kuukausina. Lisäksi lisättyä materiaalia voidaan säilyttää pitkiäkin aikoja. (George & Sherrington 1984, 41.)

Lisäys suoritetaan aseptisissa olosuhteissa, joten kasvit ovat vapaita patogeeneistä, taudeista, sienistä ja bakteereista. Solukkoviljelyllä saadaan tuotettua klooneja sellaisistakin kasveista, joista se muuten olisi hidasta ja vaikeaa. Hyvä etu on myös se, että kasvit eivät vaadi hoitoa lisäysten välissä, kuten kastelua, suihkutusta tai rikkaruohojen kitkemistä. (George & Sherrington 1984, 41.)

Mikrolisäyksen haittana voidaan pitää somaklonaalista muuntelua. Solukkoviljelyllä pyritään tuottamaan keskenään samankaltaisia kasveja, mutta niissä voi olla joskus eroja. Somaklonaaliseen muunteluun vaikuttavat monet tekijät, kuten genotyyppi, kasvin ikä, aloituspalan tyyppi, kasvatusalustan koostumus ja viljelyolot. (Haapala & Niskanen 1992, 29.)

5.8 Ongelmat mikrolisäyksessä

5.8.1 Fenoliyhdisteet

Collinin ja Edwardsin (1998) mukaan fenoleja erittyy kasvissa itsessään. Fenoliyhdisteiden tuottaminen on kasvin stressireaktio. Monet näistä yhdisteistä ovat kasvimyrkkyjä, jotka aiheuttavat kudoksen kuoleman soluun päästessään. Kasveilla, jotka kokevat vesi- tai ravinnestressiä, on lisääntynyt riski fenolien tuottamiseen. Kun kudosta poistetaan, fenoleja voidaan osittain poistaa hapettamalla niitä polyfenolioksidaasilla. Tämä puolestaan voi aiheuttaa verson kärjen ruskettumista, joka tuhoaa kasvisolukkoa paikallisesti ja inhiboi kasvin reagoimista kasvatusalustaansa. Puuvartisille perennoille fenolit ovat erityisen vakava ongelma. (Mts. 128.)

Fenolien vaikutusta on yritetty vähentää useilla keinoilla. Emokasvin tulee olla tauti- ja tuholaisvapaa sekä hyvin kasteltu ja ravittu ainakin kahden viikon ajan ennen viljelmien aloitusta. Alustaan voidaan lisätä aktiivihiltä, joka adsorboi fenoliyhdisteitä ja vähentää kudosten mustumista. Aktiivihillen haittapuolena on kuitenkin se, että se adsorboi myös kasvunsääteitä. Vaihtoehtoisesti fenolit voidaan huuhtoa kasvista kudokseen pesemällä poistettua kudosta juoksevan veden alla 2–3 tuntia, inkuboimalla kudosta steriilissä vedessä yön yli tai vaihtamalla toistuvasti kasvit uudelle alustalle 2–3 päivän välein. Mustumista voidaan ehkäistä myös lisäämällä alustaan pelkistäviä aineita kuten sitraattia. (Collin & Edwards 1998, 128–129)

5.8.2 Kontaminaatio

Kasvaakseen kunnolla kasvisolukkoviljelmien tulisi olla vapaita hyönteisistä sienistä ja useimmista bakteeri-infektioista. Kontaminantit ovat peräisin joko ulkoisista lähteistä, kasvien pinnoilta tai kasvin sisäosista. (Uosukainen 1996, 11.) Collinin ja Edwardsin (1998) mielestä useimmat ongelmat aiheutuvat viljelmien kontaminoitumisesta. Heidän mukaansa kontaminoitumiset aiheutuvat

ennemmin kasvinsisäisestä viruksesta, bakteerista tai sienestä kuin huonosta aseptiikasta. Todisteena kasvinsisäisestä kontaminoitumisesta on se, että infektio tulee ilmi vasta viljelmän aloituksen myöhemmässä vaiheessa tai vasta monien lisäysten jälkeen tai kudus näyttää edelleen ruskealta alustan vaihdosta huolimatta. Kasvinsisäinen kontaminaatio johtuu useista eri organismeista. (Mts. 129.)

Kontaminaation poistaminen on hyvin tärkeää, jotta se ei siirtyisi emokasveihin ja niiden klooneissa eteenpäin. Kontaminaatio johtaa kasvin huonoon kasvuun ja kasvit voivat tartuttaa muita lajeja. Kontaminaation poistamiseen on useita menetelmiä. Kaikista kontaminaation aiheuttajista pääsee eroon eristämällä kasvin meristeemin ja aloittamalla siitä uuden viljelmän. Bakteereja voidaan poistaa lisäämällä alustaan antibiootteja, vaikkakin se voi johtaa myöhemmin kasvin ruskettumiseen. Sienten aiheuttamia kontaminaatioita voidaan poistaa fungisideillä, kuten benomyylillä. Viruksia voidaan poistaa viruksentorjunta-aineilla tai lämpökäsittelyllä. (Collin & Edwards 1998, 130–131)

Uosukaisen (1996) mukaan hyvä laboratoriotekniikka on perusedellytys kontaminanttien ennaltaehkäisyyn. Mikrobisaastunnat ihmisistä viljelmiin voidaan estää henkilökunnan perusteellisella koulutuksella. Viljelmiä uhkaavia tuholais-infektioita voidaan torjua siirrostettavien kasvien kunnollisella esikäsittelyllä. Tuholaisinfektioita aiheuttavat mm. punkit, ripsiäiset ja joskus ankeroiset. Pintasteriloinnilla voidaan torjua hiivoja, joitain sieniä ja kasvin pinnalla eläviä bakteereja. Jos kontaminaatio ilmenee pian viljelmän perustamisen jälkeen, on kyse pintakäsittelyjen riittämättömyydestä. Jatkuva tarkkailu ja viljelmien testaus on välttämätöntä mikrobien aiheuttamien piilevien kontaminaatioiden varalta. Piilevät kontaminaatiot voivat pysyä kasvissa ja puhjeta esiin vasta kasvin myöhemmässä kehitysvaiheessa. Oleellisinta kontaminaatioiden torjunnassa on se, että ne huomataan ajoissa, jolloin niiden leviäminen voidaan estää. (Mts. 9, 15.)

5.8.3 Vesisolukkoisuus

Vesisolukkoisuus on yksi kasvisolukon anatomisista, morfologisista ja fysiologisista poikkeamista. Muita vesisolukkoisuuteen liittyviä termejä ovat läpikuultavuus, mehukkuus, vesittyminen ja lasisuus. (Debergh & Zimmerman 1991, 45.) Vesisoluisuuden syytä ei tiedetä tarkkaan, mutta arvellaan sen johtuvan kasvin liiallisesta vedensaannista tai liian korkeasta lämpötilasta kasvatushuoneessa. Myös sytokiniinien korkea pitoisuus voi lisätä vesittymisen mahdollisuutta. Vesittyessään kasvin verso muuttuu paisuneeksi ja läpinäkyväksi. Varteen kerääntyy nestettä ja lehdet ovat pieniä, hentoja ja aivan tummanvihreitä. Lehdet saattavat olla kiertyneitä tai jopa epämuodostuneita. (Haapala & Niskanen 1992, 60.)

Collinin ja Edwardsin (1998) mukaan yksinkertaisin keino vesisoluisuuden vähentämiseen on lämpötilan laskeminen. Myös alustan ammoniumin määrän vähentämisestä voisi olla apua. (Mts. 131) Haapalan ja Niskasen (1992) mukaan vesittymistä voidaan torjua puuttamalla kasvin vedenottoon alustan koostumusta muuttamalla. Agarin määrää nostamalla voidaan hidastaa kasvin vedenottoa vaikkakin myös agarin liiallinen määrä voi olla vahingollista kasville. Lisäksi alustan sokerimäärää voidaan lisätä, jolloin alustan osmoottinen potentiaali muuttuu ja näin ollen pystytään vaikuttamaan kasvin vedenkäyttöön. Lisäksi alustan sytokiniinipitoisuuden alentamisella ja mineraaliravinteiden suhteiden muuttamisella voidaan vaikuttaa vesittymiseen. (Mts. 60.)

6 TYÖN SUORITUS

6.1 Tehtävän rajaus

Kirjallisuuden perusteella kahdelle syreenilajikkeelle valittiin testattavaksi kaksi Murashige-Skoogin alustaa (MS-alusta). Toinen alusta oli MS-alusta sellaisenaan ja toinen muutoin samanlainen, mutta makroravinteiden osuus vähennettiin puoleen. Syreenilajikkeet olivat pihasyreeni 'Liisa' (TTA-608) ja jalosyreeni 'Andenken an Ludwig Späth' (TTA-171). Vertailukohteeksi otettiin syreenien perusalusta (G12), jolla niitä yleensä lisätään MTT:llä.

Kokeessa tutkittiin hormonitasojen vaikutusta lisääntymiseen. Molemmista MS-alustoista tehtiin BAP-hormonin suhteen kolme versiota: alustojen hormonipitoisuudet olivat 0,5; 2,5 ja 3,75 mg/l. Perusalustan lisäksi oli siis kuusi testattavaa alustaa. Samalla tutkittiin valon vaikutusta kasvin kasvuun valitsemalla viljelyastioiksi isot koeputket ja kirkkaat ilmastoidut muovikorkit. Ennen varsinaisen kokeen aloitusta tutkittiin mihin asentoon versot kannattaa kasvatusalustaan asettaa.

6.2 Asennon vaikutuksen tutkiminen

Ennen varsinaista koetta, päätettiin tutkia, onko verson asennolla väliä lisääntymisen ja kasvuun lähdön kannalta. Koe tehtiin perusalustalla (G12) koeputkissa. Kahteenkymmeneen putkeen laitettiin versoja sekä pystyyn että vaakaan. Kokeessa käytettiin sekä hanka- että kärkiversoja, vaikka varsinaisessa kokeessa käytettiin vain hankaversoja. Pystyyn laitettut versot asetettiin niin, että niiden tyvi oli upotettuna elatusaineeseen siten, että lehdet jäivät pinnan yläpuolelle. Vaakaan laitettut versot olivat aivan selällään elatusaineen pinnalla. Putkien päälle laitettiin korkit ja putket asetettiin kasvatushuoneeseen kasvamaan neljäksi viikoksi.

Neljän viikon jälkeen havainnoitiin versojen kasvua ja lisääntymistä. Todettiin, että vaakaan laitettut versot olivat lähteneet kasvuun paremmin ja lisääntyneetkin paremmin kuin pystyyn laitettut versot. Pystyyn laitettut versot olivat kitukasvuisia, eivätkä ne olleet kasvaneet pituutta niin paljoa kuin vaakaan laitettut. Syreenin lisäyksessä pituuskasvulla on merkitystä, koska pitkistä versosta saadaan jaettua uusia versoja hankaväleistä. Näin ollen päätettiin, että varsinaisessa kokeessa versot asetetaan vaakaan.

6.3 Lisäysojien valmistus

Edellisenä päivänä ennen lisäysojien valmistusta valmistettiin tarvittavat liuokset, jotta ne olisivat mahdollisimman tuoreita. Liuosten valmistuksessa aineiden punnitsemiseen käytettiin analyysivaakaa. Kaikki työssä käytetyt reagenssit löytyvät liitteestä 11.

Alustoja valmistettaessa aineiden mittaamiseen käytettiin normaalia laboratoriovälineistöä. Aineet mitattiin erlenmeyeriin tietyssä järjestyksessä niin, että ensin liuotettiin sokeri ja myo-inositolin ja liukenemisen jälkeen mitattiin loput nestemäiset aineet. Liuosta sekoitettiin koko ajan magneettisekoittajalla. Kun kaikki aineet agarialukuun ottamatta oli mitattu ja astia oli täytetty tarvittavaan tilavuuteen vedellä, mitattiin liuoksen pH. Tarvittaessa pH:ta säädettiin hapolla tai emäksellä eli suolahapolla tai natriumhydroksidilla. Viimeiseksi ennen autoklavointia lisättiin agar ja Bacto-Peptone. Normaalisti tuotantoon käytettävät alustat valmistetaan isossa keittokattilassa, kun elatusainetta valmistetaan monia, jopa kymmeniä litroja. Kokeeseen tarvittavat alustamäärät olivat korkeintaan kaksi litraa, joten ne keitettiin autoklaavissa autoklaavipulloissa. Autoklavointiaika oli normaalia sterilointiin käytettyä aikaa lyhyempi, 15 minuuttia 120 °C:ssa.

Keittämisen jälkeen elatusaine annosteltiin annostelijalla koeputkiin. Koeputkiin laitettiin korkit ja ne autoklavoitiin autoklaavissa 21 minuuttia 120 °C:ssa. Valmiit alustat jätettiin pystysuoraan jähmettymään. Alustojen annettiin olla

huoneenlämmössä muutaman päivän ennen käyttöä, jotta nähtiin, onko alustoissa kontaminaatiota. Taulukosta 1 ilmenevät perusalustan (G12) valmistukseen käytettyjen perusliuosten pitoisuudet litraa kohden sekä alustaan mitatut perusliuosten määrät litraa kohden. Taulukosta 2 ilmenevät Murashige-Skoog-alustojen valmistukseen käytettyjen perusliuosten pitoisuudet litraa kohden sekä alustoihin mitatut perusliuosten määrät litraa kohden.

TAULUKKO 1. G12-alustan perusliuosten pitoisuudet ja alustaan mitatut perusliuosten määrät (Uosukainen 1992)

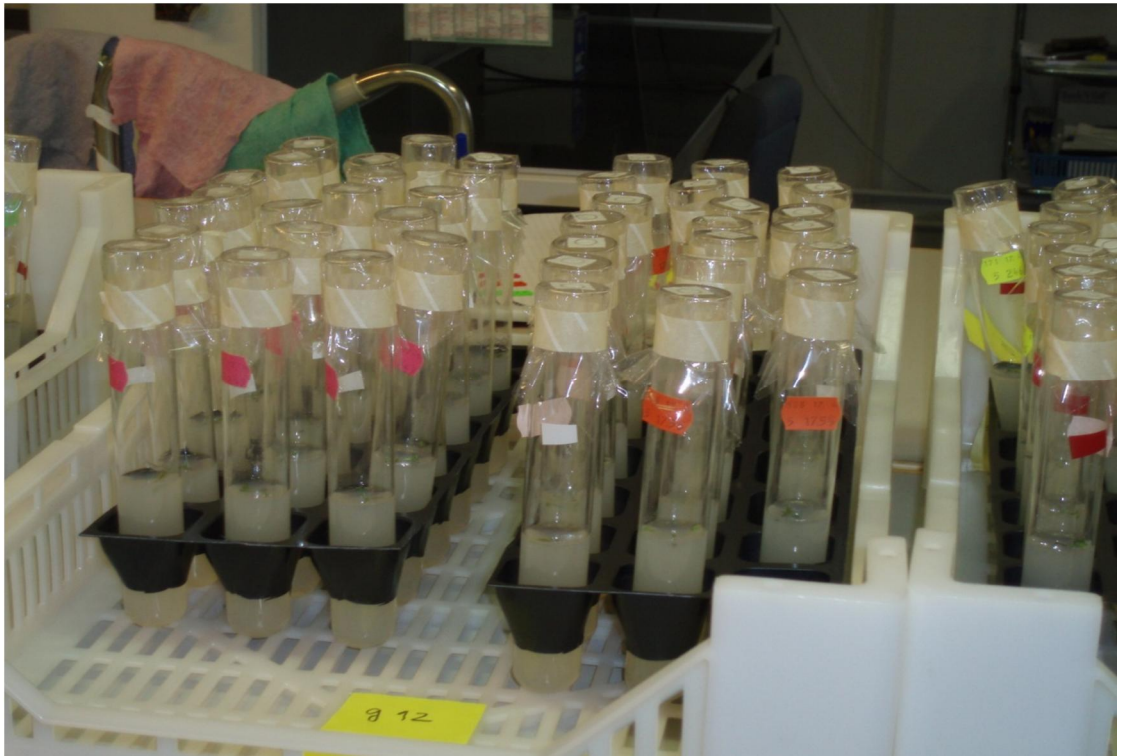
Reagenssi	Perusliuos (g/l)	Perusliuosta alustaan (ml/l)
ABKN:		50
NH ₄ NO ₃	33,0	
KNO ₃	5,0	
KH ₂ PO ₄	5,0	
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	20,0	
C 10:		10
H ₃ BO ₃	0,62	
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,025	
CoCl x 6H ₂ O	0,0025	
KI	0,083	
E-Knopp:		10
MgSO ₄ x 7H ₂ O	20,0	
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0025	
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,86	
MnSO ₄ x 4H ₂ O	2,23	
F:	0,78	50
Na ₂ -Fe-EDTA (Na ₂ EDTA+ FeSO ₄ x 7H ₂ O		
Vitamiinit:		10
Glysiini	0,2	
Pyridoksiini	0,05	
Tiamiini	0,1	
Nikotiinihappo	0,05	
Hormonit:		
BAP	0,1	1,0
IBA	0,1	0,5
Sokeri:		
Glukoosi	30,0	
Muut:		
Myo-inositoli	0,1	
Agar	7,75	
Bacto Peptone	0,27	
Liuoksen pH: 5,0		

TAULUKKO 2. Murashige-Skoog-alustan perusliuosten pitoisuudet ja alustoihin mitatut perusliuosten määrät (Bremer 1983, 32.)

	Perusliuos	MS	½MS
	(g/l)	(ml/l)	(ml/l)
Makrosuolat			
NH ₄ NO ₃	16,5	100	50
KNO ₃	19,0	100	50
CaCl x 2H ₂ O	4,4	100	50
MgSO ₄ x 7H ₂ O	37,0	10	5
KH ₂ PO ₄	17,0	10	5
Mikrosuolat			
MnSO ₄ x 4H ₂ O	1,69	10	10
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,39	10	10
H ₃ BO ₃	0,62	10	10
KJ	0,083	10	10
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,025	10	10
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0025	10	10
CoCl x 6H ₂ O	0,0025	10	10
Rauta: Na ₂ -Fe-EDTA (Na ₂ EDTA + FeSO ₄ x 7H ₂ O)	0,78	50	50
Vitamiinit:		10	10
Glysiini	0,2		
Pyridoksiini	0,05		
Tiamiini	0,1		
Nikotiinihappo	0,05		
Hormonit:			
NAA	0,1	1,0	1,0
BAP	0,1	MS0,5 5,0 MS2,5 25,0 MS3,75 37,5	½MS0,5 5,0 ½MS2,5 25,0 ½MS3,75 37,5
Sokeri:			
Sakkaroosi	30,0		
Muut:			
Myo-inositoli	0,1		
Agar	7,75		
Bacto Peptone	0,27		
Liuoksen pH: 5.8			

6.4 Lisäys

Versoja lisättiin yhteensä kolme kertaa. Versot jaettiin laminaarissa kirurgin veitsen ja pinsettien avulla steriilisti. Syreenin versot jaetaan hankaväleistä. Yksi verso on voinut lisääntyä useaksi versoksi, ja niissä jokaisessa on mahdollisesti useita hankavälejä. Verson isot lehdet leikataan pienemmiksi, miltei kokonaan pois, koska ne vaan kuivuisivat. Jokaisesta alustasta oli 20 putkea ja jokaiseen putkeen asetettiin yksi verson pala vaakaan agarin pinnalle. Putkien päälle laitettiin kirkkaat korkit, joiden päällä oli ilmastointiaukko. Kannot laitettiin autoklaaviteipillä kiinni. Putket asetettiin koejärjestelyn mukaisesti kennoihin ja laitettiin kasvatushuoneeseen kasvamaan viideksi viikoksi (ks. kuvio 5). Tilan puutteen vuoksi putket vietiin solukkoviljelylaboratorion ulkopuolella olevaan kasvatushuoneeseen, jonka olosuhteet ovat samat kuin syreenille normaalisti käytetyssä kasvatushuoneessa. Kasvatushuoneessa valitsee normaali päivän ja yön pituus ja lämpötila on 20,0 °C. Kasvit saavat lisävaloa klo. 16.00–08.00 välisenä aikana. Muutamana päivänä kasvatushuoneen valaistus ja lämpötila vaihtelivat rajusti teknisen vian vuoksi, kun huoneen ilmastointi oli epäkunnossa. Tästä tuskin oli oleellista haittaa syreenien kasvulle, koska lisäysjakso oli juuri loppuillaan vian ilmaantuessa.



KUVIO 5. Koeputket kennoissa

Ensimmäisellä lisäyskerralla versot otettiin koetta varten lisätyistä versoista. Seuraavilla lisäyskerroilla yhden alustan versot lisättiin satunnaisesti, ei putki-kohtaisesti. Käytännössä siis yhden alustan 20 versoa nostettiin maljalle, jaettiin ne ja laitettiin yksitellen 20 putkeen. Näin ollen ei pystytty seuraamaan tiettyjen versojen menestymistä. Jos joltain alustalta versoja tuli yli 20, niin ylimääräiset laitettiin perusalustalle lasipurkkiin.

6.5 Koeasetelma

Koska kokeessa oli mukana kaksi eri syreenilajia, tehdään tavallaan kaksi eri koetta ja molemmissa oli seitsemän eri kasvatusalustaa. Jotta koeputkien sijainnilla kasvatushuoneen hyllyllä ei olisi vaikutusta koetulokseen, jaettiin hylly molempien kokeiden sisällä 20 riviin (lohkoon), joihin kuhunkin arvottiin kaikki käsittelyt eli seitsemän kappaletta satunnaiseen järjestykseen. Käytännössä

hyllylle mahtui kuusi koria, joihin molempiin mahtui 21 kennoriviä. Laitimmaisiksi molempiin päihin sekä eturiviksi ja takariviksi laitettiin suojarivit tyhjästä koeputkista, jotta varjostus olisi samanlainen jokaiselle koeputkelle. Koeasetelman pystyivät numeroitiin 1–7, ja vaakarivit merkittiin aakkosilla A–T. Arpomisesta helottamiseksi alustat koodattiin väreillä. Kunkin alustan väri ilmenee paikkakartoista. Koeputkiin laitettiin värillinen teippi sekä putket numeroitiin 1–20. Arpalappuihin kirjoitettiin väri ja numerot 1–20. Putkien paikat arvottiin järjestyksessä vasemmasta alakulmasta aloittaen vasemmalta oikealle rivi kerrallaan. TTA-608:n paikkakartta on liitteessä 2 ja TTA-171:n liitteessä 3. Kuviossa 6 on kuva koeasetelmasta kasvatushuoneessa.



KUVIO 6. Koeasetelma kasvatushuoneessa

6.6 Havainnointi

Ensimmäisen lisäyksen versoja havainnoitiin viikoittain, jotta nähtiin kuinka pitkän lisäysvälin versot tarvitsivat. Havaintojen perusteella päätettiin, että lisäykset tehdään viiden viikon välein, koska alussa versojen kasvu oli melko hidasta, joten normaalit 3–4 viikkoa ei riittänyt kunnon havaintoihin. Versot havainnointiin alusta kerrallaan viiden viikon kasvatuksen jälkeen. Havainnointikohteina olivat versojen lisääntyminen ja kunto. Lisäyskertojen jälkeen tehdyt havainnot 'Liisa'-lajikkeesta (TTA-608) löytyvät liitteistä 4–6 ja 'Andenken an Ludwig Späth'-lajikkeen (TTA-171) havainnot ovat liitteissä 7–9.

6.7 Juurrutus ja koulinta turpeelle

Kolmannen eli viimeisen lisäyskerran jälkeen, kun versot olivat kasvaneet viisi viikkoa, ne siirrettiin juurrutusalustalle. Juurrutusalustana käytettiin tuotannosakin syreenille käytettyä alustaa (G27). Juurruttamiseen käytettiin vain yhtä ja samaa alustaa kaikille, jotta nähtäisiin, onko lisäysalustalla vaikutusta verson juurtumiseen. Toisaalta versojen vähäinen määrä esti useamman juurrutusalustan vertailun. Juurrutettaessa versoja jaetaan useammaksi mikäli mahdollista, mutta versoja ei saa pilkkoa liian pieniksi, jotta juurtuminen onnistuu. Myöskään valmiiksi liian pieniä ja kitukasvuisia versoja ei laitettu turpeelle. Juurrutusalustan valmistukseen käytettyjen perusliuosten pitoisuudet sekä alustaan mitatut perusliuosten määrät litraa kohden löytyvät taulukosta 3. Juurrutusalustaan käytettiin osittain samoja liuoksia kuin aiemmin mainittuun G12-alustaan, joten niiden tarkat koostumukset löytyvät taulukosta 1 sivulta 40.

TAULUKKO 3. G27-alustan perusliuosten pitoisuudet ja alustaan mitatut perusliuosten määrät

Reagenssi	Perusliuos (g/l)	Perusliuostaalustaan (ml/l)
ABKN		25
F		50
C 10		10
E-Knopp		10
K: KH ₂ PO ₄	17,0	25
Vitamiini		10
Hormonit: IBA	0,1	10
Sokeri: Glukoosi	20,0	
Muut: Myo-inositoli Apteekin agar Rothin agar Bacto Peptone	0,1 4,375 4,375 0,27	
Liuoksen pH: 5,0		

18 vuorokauden kasvatuksen jälkeen juurrutusaluustoilla olevat versot havainnoitiin. Havainnoinnin kohteena olivat versojen eloonjääminen, kunto sekä juurien määrä ja koko. Juurrutusaluustoilta versot kouluttiin turpeelle (B2-turvetta). Jokainen versot pisteltiin yksitellen turpeeseen. Tämän jälkeen ne suihkutettiin homeenestoainella ja kasteltiin vedellä. Lopuksi astioiden päälle laitettiin kannet ja ne vietiin kasvihuoneeseen kasvamaan. 17 vuorokauden kasvatuksen jälkeen versot havainnoitiin. Tällöin havainnoitiin versojen kasvuun lähtöä, kuntoa sekä versojen kokoa. Havainnot juurrutusalustalta ja turpeelta löytyvät liitteestä 10.

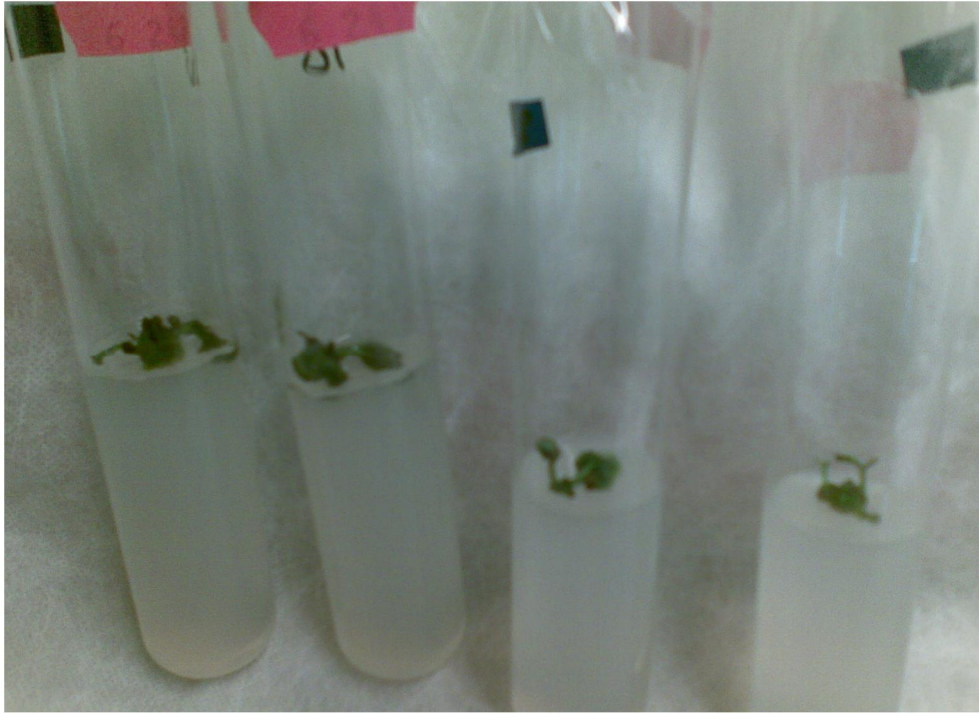
7 TULOKSET

7.1 Yleiset havainnot

Jo ensimmäisen lisäyksen jälkeen pystyttiin havaitsemaan, että alustojen välillä on silmämääräisesti huomattaviakin eroja. Alusta asti molemmissa lajeissa kaikista parhaimman näköiset ja parhaiten lisääntyneet versot kasvoivat vahvimalla MS-alustalla. 'Liisa'-lajikkeella ero ei ollut niin huomattava muihin alustoihin verrattuna kuin "Andenken an Ludvig Späth"-lajikkeella. Kuviossa 7 on kuva hyvin kasvaneesta ja lisääntyneestä versosta. Verso on hyvin pitkä ja siinä on monta hankaväliä eli lehtiparia, joiden välistä verso voidaan jakaa useammaksi versoksi. Vastaavasti kuviossa 8 on kuolleita ja huonosti kasvuun lähteneitä versoja.



KUVIO 7. Esimerkki hyvin kasvavasta versosta MS3,75-alustalla



KUVIO 8. Kuolleita versoja

7.2 Kontaminaatiot

Kokeen aikana kontaminaatiota ilmeni ensimmäisen lisäykerran jälkeen 'Liisa'-lajikkeessa kahdella eri alustalla, jotka olivat MS2,5 ja MS3,75. MS2,5-alustan versot olivat muutenkin kuolleita ja versojen lehden muotoakaan ei ollut oikeanlainen toisin kuin MS3,75-alustalla, jossa kontaminoituneetkin versot olivat suurimmaksi osaksi elossa ja kaikki lehdet oikeanmuotoisia. Tästä päätellen versojen kuolleisuus MS2,5-alustalla ei johtunut kontaminaatiosta vaan alusta ei muuten sopinut lajille.

7.3 Lisääntyminen ja kuolleisuus

Koska kokeessa tutkittiin lisääntymistä, laskettiin jokaisella lisäykerralla lisääntymisprosentit alustoilla kasvaville versoille. Lisääntymisprosentti saadaan kun jaettujen versojen määrästä vähennetään alkuperäinen versojen

määrä. Saatua lukua verrataan alkuperäiseen versojen määrään ja arvo muutetaan prosenteiksi kertomalla se sadalla. Jos lisääntymisprosentti on miinusmerkkinen, se tarkoittaa, että versojen määrä on vähentynyt. Lisäksi lisäyskerroilla arvioitiin kuolleisuutta laskemalla kuolleisuusprosentit. Kuolleisuusprosentti saadaan, kun kuolleiden versojen määrää verrataan alkuperäiseen versojen määrään ja saatu arvo kerrotaan sadalla. Juurrutusvaiheessa versot eivät enää lisäänty, joten arvioitiin kuolleisuutta ja laskettiin, moneenko verso on muodostunut juuria. Turpeelle koulituille versoille laskettiin kasvuunlähtöprosentit eli kuinka monta prosenttia versoista lähti kasvamaan ja kuinka monta prosenttia niistä kuoli.

Taulukossa 4 on esitetty yhteenveto 'Liisa'-lajikkeen lisääntymisestä kokeen aikana. Taulukossa on ilmoitettu myös kuolleisuus. Taulukosta ilmenee myös juurrutus- ja koulintavaiheen tiedot. Taulukosta ilmenee, että parhaiten versot lisääntyivät MS3,75-alustalla, jonka lisääntymisprosentti kasvaa ensimmäisen lisäyskerran -30 prosentista viimeisen lisäyskerran 105,6 prosenttiin. Lai-meimmalla MS-alustalla lisääntymistä esiintyi vain ensimmäisellä kerralla ja sitten versojen määrä alkoi vähentyä. Huonoin lisääntyminen MS2,5-alustalla, jonka versot kuolivat jo ensimmäisen lisäyskerran jälkeen. Hengissä olevista versoista huonoiten lisääntyivät $\frac{1}{2}$ MS-alustalla olevat, jonka lisääntymisprosentti on miinusmerkkinen ja kasvaa koko ajan, -15 prosentista -45,5 prosenttiin. Myöskään $\frac{1}{2}$ MS2,5- ja $\frac{1}{2}$ MS3,75-alustoilla versot eivät erityisemmin lisääntyneet. Perusalustalla (G12) olevat versot lisääntyivät ensimmäisellä ja toisella kerralla hieman, mutta eivät enää kolmannella.

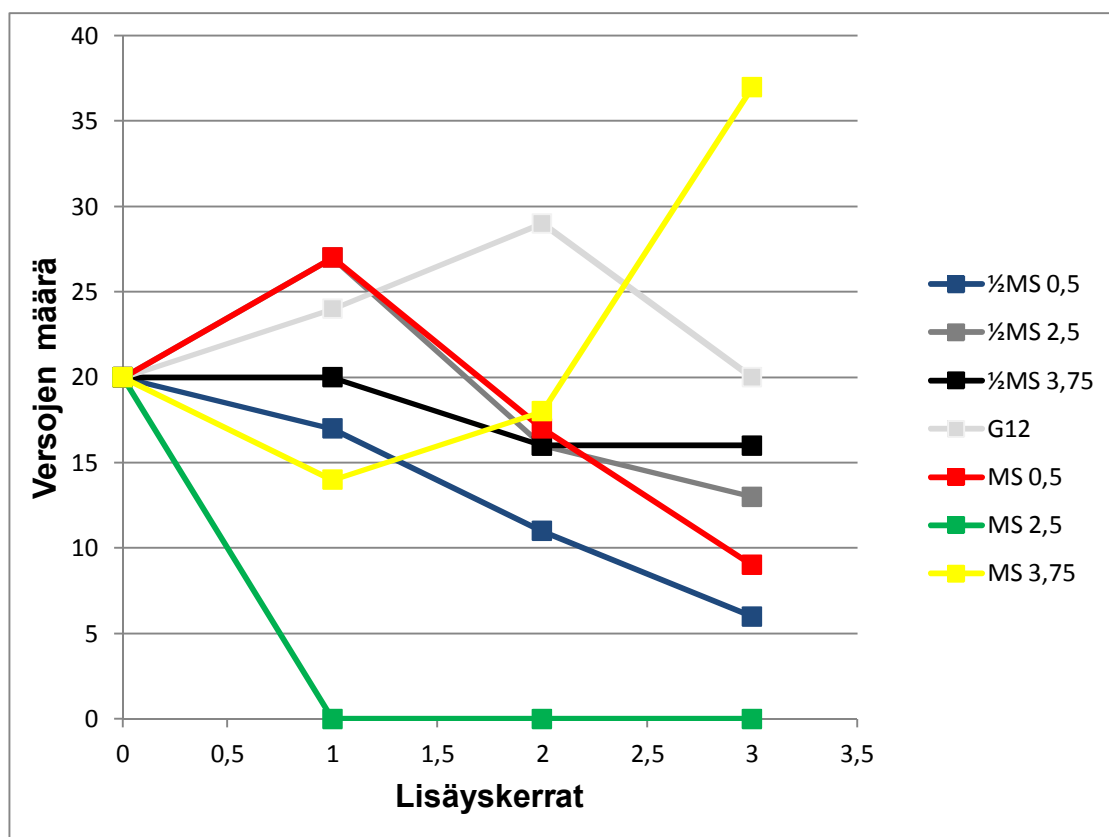
Juurutusvaiheeseen päässeistä versoista mikään ei kuollut juurrutuslialustalla, mutta $\frac{1}{2}$ MS0,5- ja MS0,5-alustoilla jotkin versot olivat niin pieniä, että niitä ei voinut koulia turpeelle. Juuria muodostui joihinkin versoihin, mutta yleisesti juurten muodostus ei ollut kummoista. Turpeella kasvuunlähtö oli joko 100 % tai hieman alle kaikilla alustoilla paitsi MS0,5-alustalla, jonka versoista vain neljäsosa lähti kasvuun.

TAULUKKO 4. TTA-608. 'Liisa'-lajikkeen lisääntyminen ja kuolleisuus

Ensimmäinen lisäyskerta 17.4.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	20	20	20	20	20	20	20
Kuollut	3	3	2	2	0	20	11(*)
Jaettu versoja	17	27	20	24	27	0	14
Ylimääräisiä	0	0	0	4	7	0	0
Lisääntyminen	-15 %	35 %	0 %	20 %	35 %	0 %	-30 %
Kuolleisuus	15 %	15 %	10 %	10 %	0 %	100 %	55 %
Toinen lisäyskerta 25.5.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	17	20	20	20	20	-	14
Kuollut	5	4	4	4	3	-	0
Tyhjiäputkia	3	0	0	0	0	20	6
Jaettujaversoja	11	16	16	29	17	-	18
Ylimääräisiä	0	0	0	9	0	-	0
Lisääntyminen	-35,3 %	-20 %	-20 %	45 %	-15 %	-	28,6 %
Kuolleisuus	29,4 %	20 %	20 %	20 %	15 %	-	0 %
Kolmas lisäyskerta 26.6.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	11	16	16	20	17	-	18
Kuollut	4	4	5	4	7	-	3
Tyhjiä putkia	9	4	4	0	3	20	2
Juurtumaan	6	13	16	20	9	-	37
Lisääntyminen	-45,5 %	-18,6 %	0 %	0 %	-47,1 %	-	105,6%
Kuolleisuus	36,4 %	25 %	31,3 %	20 %	41,2 %	-	16,7 %
Juurrutus 3.8.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	6	13	16	20	9	-	37
Kuollut	0	0	0	0	0	-	0
Versot, joissa juuria	0	3	5	11	1	-	9
Turpeelle	3	13	16	20	4	-	37
Kuolleisuus	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	-	0 %
Koulinta turpeelle 21.8.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	3	13	16	20	4	-	37
Kuollut	0	0	3	0	3	-	1
Kasvuun lähtö	100 %	100 %	81,3 %	100 %	25 %	-	97,3 %
Kuolleisuus	0 %	0 %	18,7 %	0 %	75 %	-	2,7 %

(*)=kontaminaatio

Kuviossa 9 on viivadiagrammi 'Liisa'-lajikkeen versojen määrästä eri lisäyskerroilla. Kuten kuviossakin näkyy, MS3,75-alustan viiva nousee kaikista korkeimmalle. Muiden viivat kääntyvät joko heti ensimmäisen lisäyskerran jälkeen tai viimeistään kolmannen jälkeen alaspäin. Kaavion mukaan toiseksi parhain alusta on perusalusta G12.



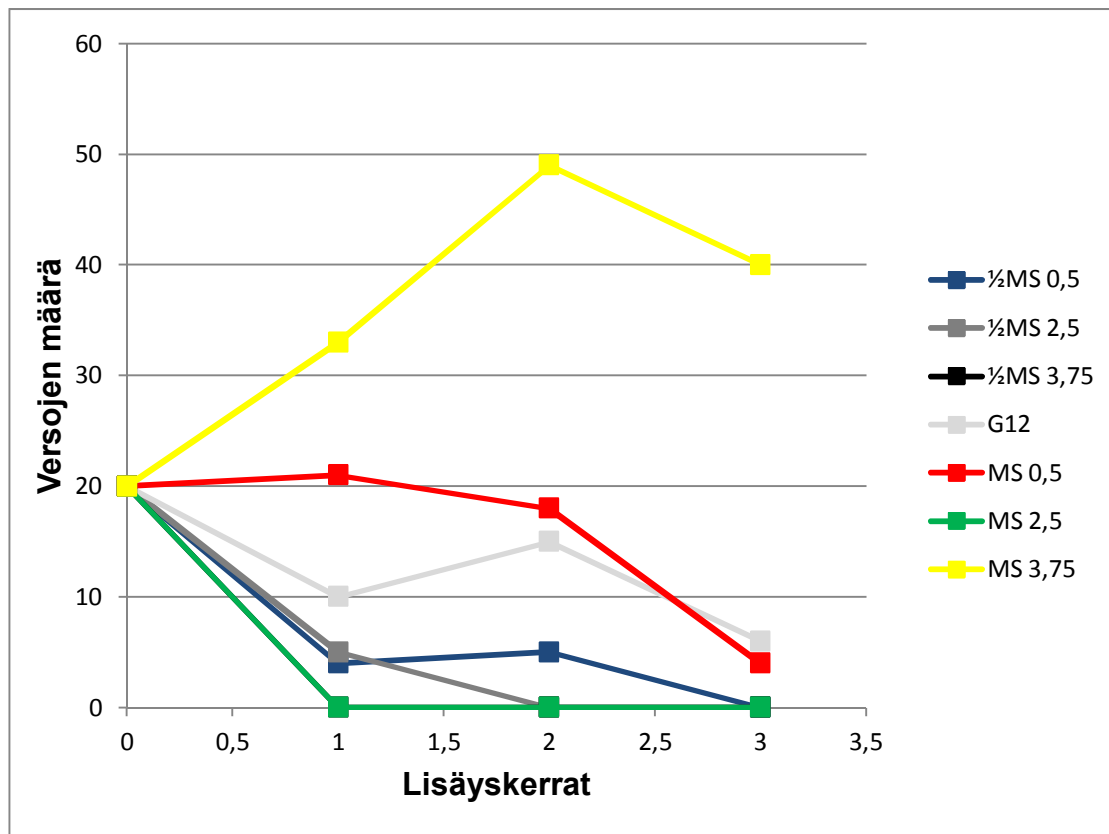
KUVIO 9. TTA-608. Viivadiagrammi 'Liisa'-lajikkeen versojen määrästä lisäyskerroilla

Yhteenveto 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen lisääntymisestä on taulukossa 5. Parhaiten ja ainoastaan versot lisääntyivät MS3,75-alustalla, jonka lisääntymisprosentti ensimmäisellä lisäyskerralla oli 65 %, toisella kerralla 145 % ja viimeisellä kerralla 100 %. Muilla alustoilla lisääntyminen on erittäin keuhnoa ja useimmilta alustoilta versot kuolivat kokonaan. Ainoastaan muutamat G12- ja MS0,5-alustojen versoista ja MS3,75-alustan versot selvisivät juurrutukseen. Juurrutuslualustalla juuria ei muodostunut kuin yhteen G12-alustalta tulleeeseen versoon. Turpeella lähti kasvuun 90 % MS3,75-alustan versoista ja hyvin lähtivät kasvuun ne muutamat G12- ja MS0,5-alustojen versotkin.

TAULUKKO 5. TTA-171. 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen lisääntymisen ja kuolleisuus

Ensimmäinen lisäyskerta 17.4.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alku. versoja	20	20	20	20	20	20	20
Kuollut	16	15	20	12	11	20	9
Jaettu versoja	4	5	0	10	21	0	33
Ylimääräisiä	0	0	0	0	1	0	13
Lisääntyminen	-80 %	-75 %	0 %	-50 %	5 %	0 %	65 %
Kuolleisuus	80 %	75 %	100 %	60 %	55 %	100 %	45 %
Toinen lisäyskerta 25.5.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alku. versoja	4	5	-	10	20	-	20
Kuollut	1	5	-	2	2	-	4
Tyhjiä putkia	16	15	20	10	0	20	0
Jaettu versoja	5	0	-	15	18	-	49
Ylimääräisiä	0	0	-	0	0	-	29
Lisääntyminen	25 %	0 %	-	50 %	-10 %	-	145 %
Kuolleisuus	25 %	100 %	-	20 %	10 %	-	20 %
Kolmas lisäyskerta 26.6.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	5	-	-	15	18	-	20
Kuollut	5	-	-	9	13	-	8
Tyhjiä putkia	15	20	20	5	2	20	0
Juurtumaan	0	-	-	6	4	-	40
Lisääntyminen	0 %	-	-	- 60 %	-77,8 %	-	100 %
Kuolleisuus	100 %	-	-	60 %	72,2 %	-	40 %
Juurrutus 3.8.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	-	-	-	6	4	-	40
Kuollut	-	-	-	0	1	-	0
Versot, joissa juuria	-	-	-	1	0	-	0
Turpeelle	-	-	-	6	3	-	40
Kuolleisuus	-	-	-	0 %	25 %	-	0 %
Koulinta turpeelle 21.8.2009							
Alusta	½MS0,5	½MS2,5	½MS3,75	G12	MS0,5	MS2,5	MS3,75
Alkup. versoja	-	-	-	6	3	-	40
Kuollut	-	-	-	0	1	-	4
Kasvuun lähtö	-	-	-	100 %	66,7 %	-	90 %
Kuolleisuus	-	-	-	0 %	33,3 %	-	10 %

Kuviossa 10 on viivadiagrammi 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen versojen määrästä. Kuviossa nähdään että ylivoimaisesti korkeimmalle nousee MS3,75-alusta viiva. Muiden viivat ovat sumassa kaavion alimmilla arvoilla.



KUVIO 10. TTA-171. Viivadiagrammi 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeen versojen määrästä lisäyskerroilla

7.4 Tilastolliset testit

Tulosten tilastollinen käsittely tehtiin SAS-ohjelmistolla. SAS-ohjelmistosta löytyy laaja joukko eri analyysejä joista tämän kokeen analysointiin valittiin mediaanitesti. Syy tähän oli se, että määrittelyyn käytettävät arvot ovat ei-parametrisiä ja luokittelevia ja koe on täysin satunnaistettu. Tilastoajojen tarkoituksena oli katsoa onko käsittelyiden välillä eroa. Kummankin lajin kustakin lisäyskerrasta tehtiin omat ajot sekä verson lisääntymisen eli määrän että kunnan suhteen. Ensin ohjelma teki koko aineistosta ei-parametrisen varians-

sianalyysin, josta nähtiin onko käsittelyiden välillä ylipäänsä eroa määrän tai kunnan suhteen. Jos eroa löytyi, tehtiin pareittaiset vertailut niin, että jokaista alustaa verrattiin perusalustaan eli G12:ta. Lisäksi pareittainen vertailu tehtiin hormonin suhteen vahvimman ja laimeimman alustan kesken.

Ohjelma antaa tuloksena useita taulukoita arvoineen, joista yksi on p-arvo. Tämä arvo on todennäköisyys sille, että käsittelyiden välillä on eroa. Sekä varianssianalyysissä että mediaanitestissä tarkasteltiin p-arvoja. Jos p-arvo on yli 0,05 eli yli 5 %, tarkoittaa se sitä, että käsittelyiden välillä ei ole eroa. Täten jos p-arvo on alle 0,05, tarkoittaa se, että käsittelyiden väliltä löytyy eroa. Mitä pienempi p-arvo on, sitä enemmän eroa on. Varianssianalyysissä osoittautui, että molemmissa lajeissa oli käsittelyiden välillä eroa sekä verson määrän että kunnan suhteen. Näin ollen kaikista lisäyskerroista tehtiin pareittaiset vertailut verson määrän ja kunnan suhteen erikseen. Testissä käsiteltiin putkikohtaisia tietoja, eli montako versoa on elossa per putki ja mikä sen tai niiden kunto on.

Tilastollisten testiajojen tulosten tueksi piirrettiin lisäksi pylväsdiagrammit versojen määrän ja kunnan keskiarvoista. Kunnan suhteen versot saivat arvon nolla, yksi, kaksi tai kolme, jotta nekin saatiin ajetuksi ohjelmalla ja niille voitiin laskea keskiarvot. Yleensä luokittelevien arvojen keskilukuja ovat moodi ja mediaani, mutta ne olisivat olleet lähes joka käsittelylle sama arvo, jolloin niiden välille ei eroa olisi saatu. Keskiarvon perusteella käsittelyiden välille saatiin jonkinlaisia eroja.

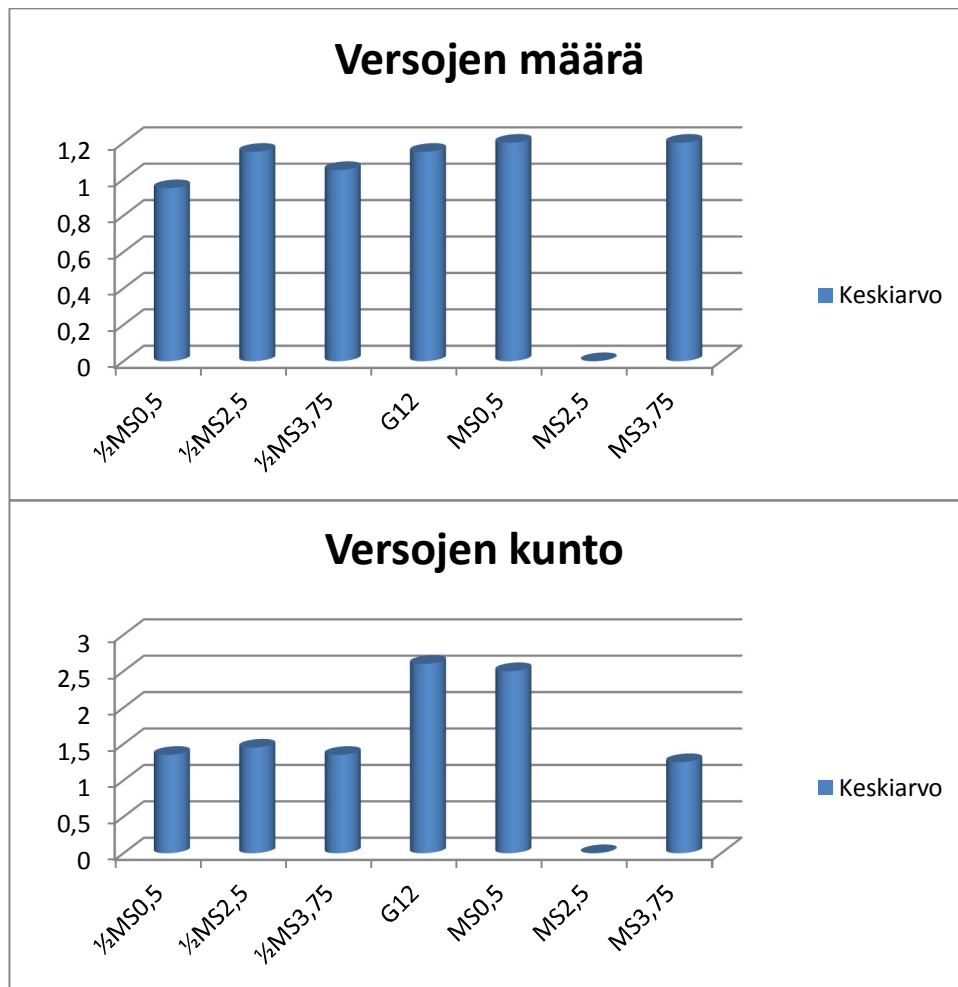
Edellä oleviin taulukoihin on taulukoitu alustojen pareittaiset vertailut. Taulukoihin on merkitty nolllalla tai ykkösellä onko alustojen välillä eroa. Nolla tarkoittaa, että eroa ei ole ja yksi tarkoittaa, että eroa alustojen välillä on. Eli eroa on, jos p-arvo on pienempi kuin 0,05. Ykkönen sulkeissa tarkoittaa, että ero on melkein merkittävä. Kunkin taulukon jälkeen on kuvio, jossa on versojen määrien ja kunnan keskiarvoista tehdyt pylväsdiagrammit.

7.4.1 'Liisa'-lajike

Ensimmäisen lisäyskerran pareittaiset vertailut ovat taulukossa 6 ja keskiarvot kuviossa 11. Versojen määrän suhteen keskiarvot eivät oikein tue p-arvoja. Ohjelman mukaan G12-alusta eroaa versojen määrän suhteen melkein kaikista muista alustoista, vaikka keskiarvojen perusteella se on tasaväkinen muiden kanssa, lukuun ottamatta MS2,5-alustaa, jonka versot kuolivat. Määrän suhteen paras alusta on MS3,75. Versojen kunnon suhteen keskiarvot tukevat ohjelman tuloksia, koska G12-alustan versot ovat parempia kuin muut ja MS0,5-alustan versot melkein yhtä hyviä kuin perusalustan.

TAULUKKO 6. TTA-608. Alustojen pareittainen vertailu, ensimmäinen lisäyskerta

Parit	Versojen määrä		Versojen kunto	
	p-arvo	eroa?	p-arvo	eroa?
½MS0,5 - G12	0,005	1	0,001	1
½MS2,5 - G12	0,252	0	0,021	1
½MS3,75 - G12	0,215	0	0,017	1
½MS0,5 - ½MS3,75	0,338	0	0,334	0
MS0,5 - G12	0,027	1	0,094	0
MS2,5 - G12	0,000	1	0,000	1
MS3,75 - G12	0,012	1	0,908	0
MS0,5 - MS3,75	0,002	1	0,152	0

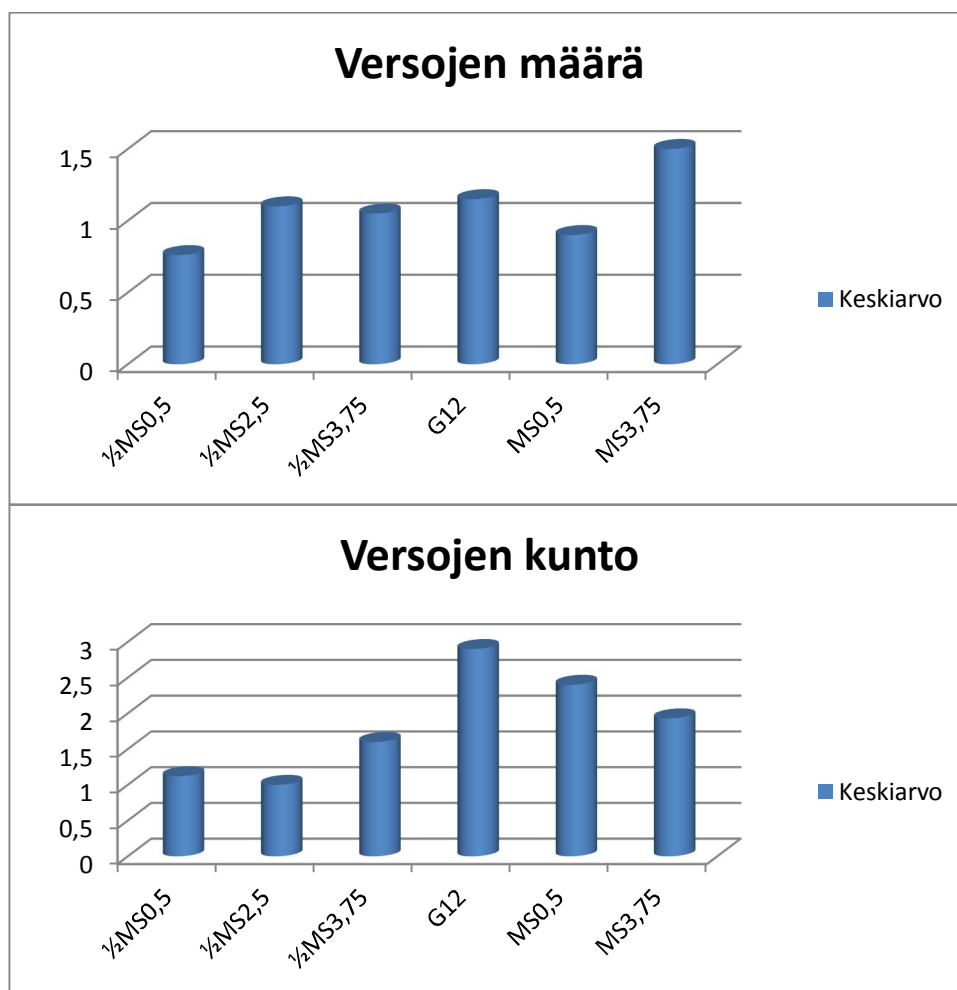


KUVIO 11. TTA-608. Versojen määrän ja kunnan keskiarvot ensimmäisellä lisäyskerralla

Toisen lisäyskerran pareittaiset vertailut ovat taulukossa 7 ja pylväsdiagrammit kuviossa 12. P-arvojen mukaan ainoastaan laimeimman ja vahvimman MS-alustan välillä on eroa versojen määrän suhteen. Keskiarvot tukevat tätä tulosta, sillä G12 on muiden kaltainen ja huomattavasti eniten versoja on vahvimalla MS-alustalla (MS3,75). G12-alustan versot ovat kuitenkin parhaimmassa kunnossa keskiarvojen mukaan ja samaa mieltä ovat myös p-arvot, sillä G12 eroaa kaikista muista alustoista.

TAULUKKO 7. TTA-608. Alustojen pareittainen vertailu, toinen lisäyskerta

Parit	Versojen määrä		Versojen kunto	
	p-arvo	eroa?	p-arvo	eroa?
½MS0,5 - G12	0,312	0	0,000	1
½MS2,5 - G12	0,864	0	0,000	1
½MS3,75 - G12	0,767	0	0,000	1
½MS0,5 - ½MS3,75	0,526	0	0,225	0
MS0,5 - G12	0,780	0	0,043	1
MS2,5 - G12	-	-	-	-
MS3,75 - G12	0,251	0	0,020	1
MS0,5 - MS3,75	0,030	1	0,175	0

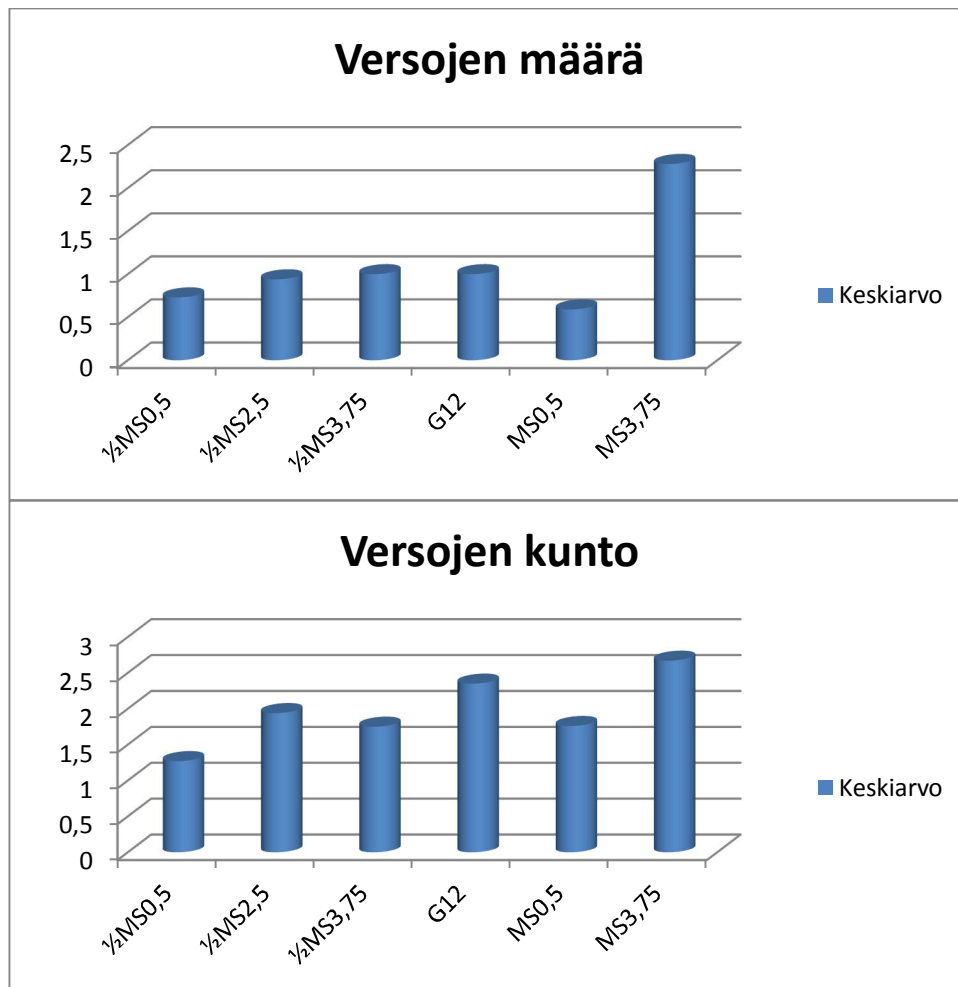


KUVIO 12. TTA-608. Versojen määrän ja kunnan keskiarvot toisella lisäyskeralla

Kolmannen lisäskerran pareittaiset vertailut löytyvät taulukosta 8 ja pylväsdiagrammit kuviosta 13. Versojen määrän keskiarvojen mukaan MS3,75-alusta on ylivoimaisesti paras ja myös p-arvojen mukaan se eroaa laimeimmasta alustasta (MS0,5) ja perusalustasta (G12) hyvin paljon, koska arvot ovat todella pieniä. Kunnan suhteen perusalustan versot eivät eroa kuin laimeimmasta ½MS-alustasta, vaikkakin keskiarvojen mukaan se eroaa hieman muistakin. Myös kunnan suhteen parhaat versot ovat MS3,75-alustalla.

TAULUKKO 8. TTA-608. Alustojen pareittainen vertailu, kolmas lisäskerta

Parit	Versojen määrä		Versojen kunto	
	p-arvo	eroa?	p-arvo	eroa?
½MS0,5 - G12	0,347	0	0,000	1
½MS2,5 - G12	0,767	0	0,080	0
½MS3,75 - G12	0,709	0	0,075	0
½MS0,5 - ½MS3,75	0,590	0	0,345	0
MS0,5 - G12	0,068	(1)	0,266	0
MS2,5 - G12		-	-	-
MS3,75 - G12	0,003	1	0,459	0
MS0,5 - MS3,75	0,000	1	0,152	0



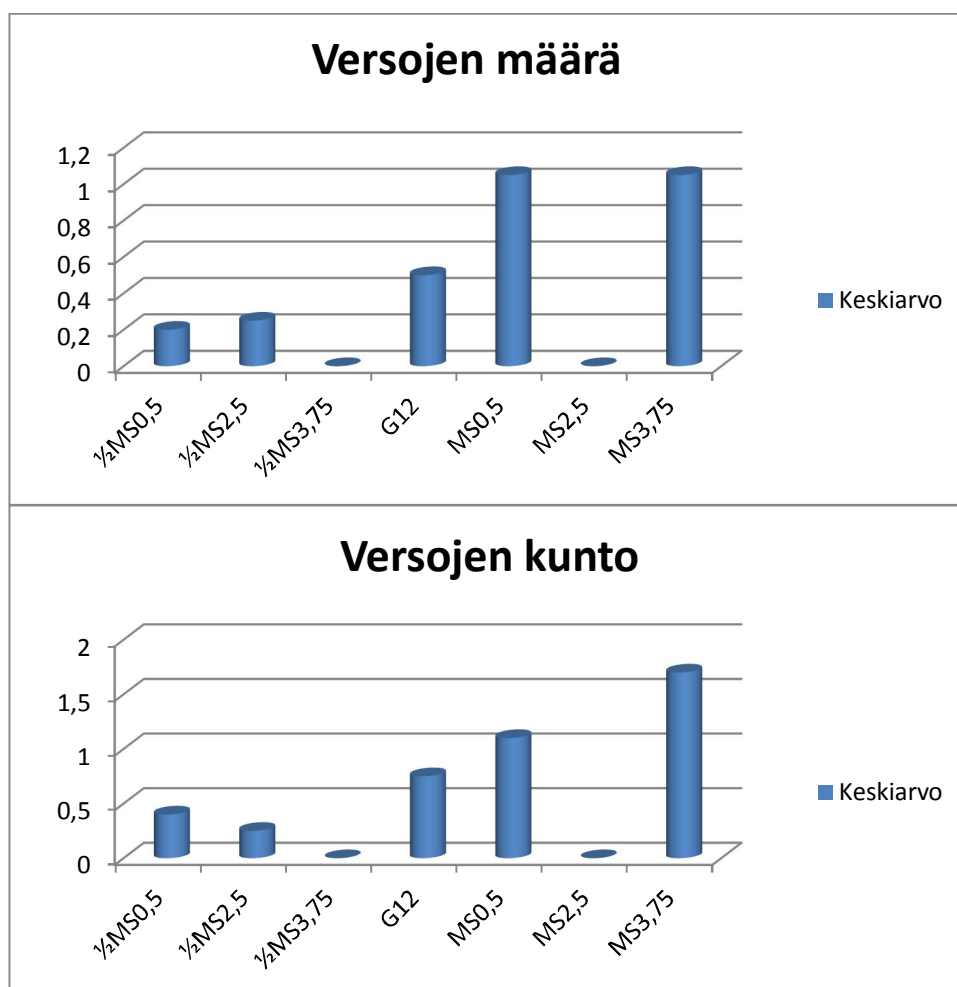
KUVIO 13. TTA-608. Versojen määrän ja kunnan keskiarvot kolmannella lisäyskerralla

7.4.2 'Andenken an Ludwig Späth' -lajike

Ensimmäisen lisäyskerran pareittaiset vertailut löytyvät taulukosta 9 ja pylväsdiagrammit kuviosta 14. Keskiarvojen mukaan eniten versoja on 0,5- ja 3,75MS-alustoilla ja versojen määrä niillä on huomattavasti suurempi kuin G12-alustalla. Pareittaisten vertailujen mukaan G12-alusta eroaa sekä määrän että kunnan suhteen ainoastaan 1/2MS3,75- ja MS2,5-alustoista, joiden versot kuolivat. Kunnan suhteen parhaimmat versot ovat vahvimalla MS-alustalla.

TAULUKKO 9. TTA-171. Alustojen pareittainen vertailu, ensimmäinen lisäykerta

Parit	Versojen määrä		Versojen kunto	
	p-arvo	eroa?	p-arvo	eroa?
½MS0,5 - G12	0,301	0	0,229	0
½MS2,5 - G12	0,502	0	0,504	0
½MS3,75 - G12	0,003	1	0,003	1
½MS0,5 - ½MS3,75	0,113	0	0,106	0
MS0,5 - G12	1,000	0	1,000	0
MS2,5 - G12	0,005	1	0,003	1
MS3,75 - G12	0,529	0	0,534	0
MS0,5 - MS3,75	0,764	0	0,753	0

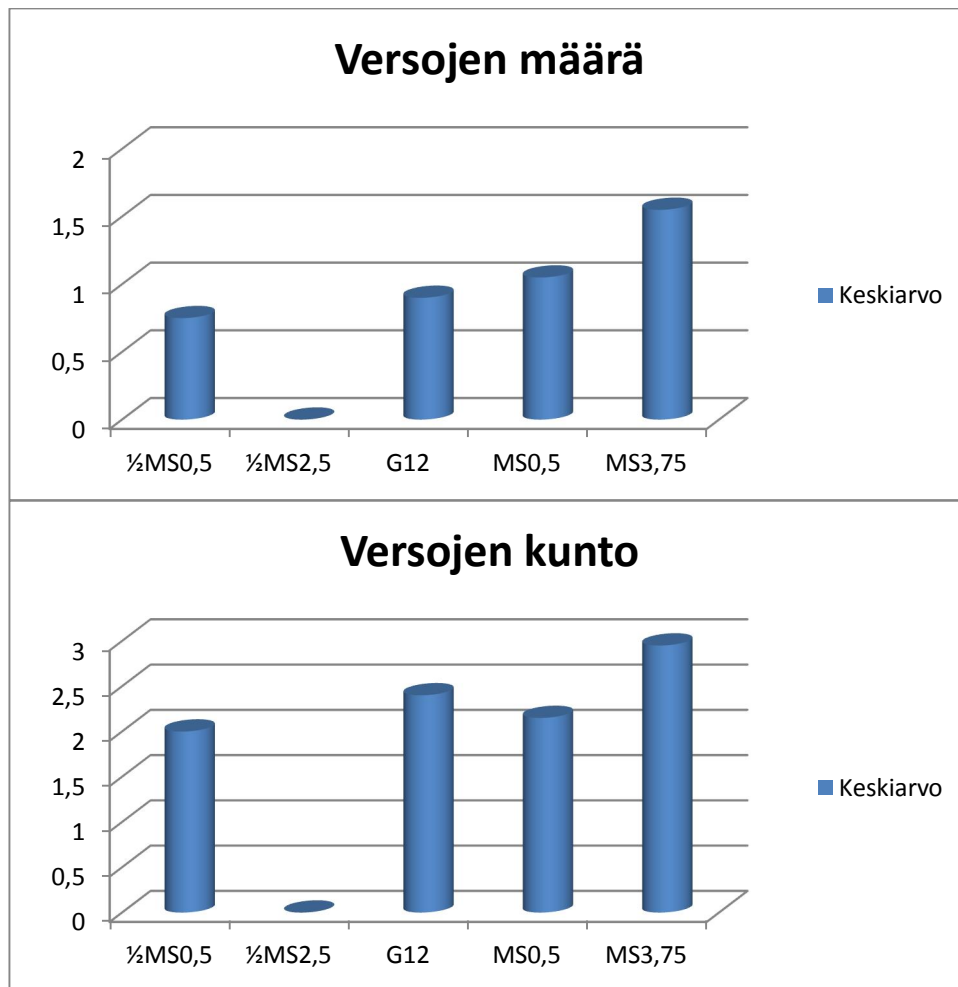


KUVIO 14. TTA-171. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot ensimmäisellä lisäyksellä

Toisen lisäykerran pareittaiset vertailut on esitetty taulukossa 10 ja pylväsdiagrammit ovat kuviossa 15. Keskiarvojen mukaan huomattavasti eniten versoja on MS3,75-alustalla. P-arvojen mukaan perusalusta eroaa versojen määrän suhteen ainoastaan ½MS2,5-alustasta ja keskiarvojen mukaan niiden ero on pienin. Kunnan suhteen keskiarvot ovat tasaväkisiä ja parhaimmat versot MS3,75-alustalla. P-arvojen mukaan perusalusta eroaa ½MS2,5- ja MS3,75-alustasta ja myös laimeimman ja vahvimman MS-alustan välillä on eroa.

TAULUKKO 10. TTA-171. Alustojen pareittainen vertailu, toinen lisäykerta

Parit	Versojen määrä		Versojen kunto	
	p-arvo	eroa?	p-arvo	eroa?
½MS0,5 - G12	1,000	0	0,656	0
½MS2,5 - G12	0,008	1	0,023	1
½MS3,75 - G12	-	-	-	-
½MS0,5 - ½MS3,75	-	-	-	-
MS0,5 - G12	0,712	0	0,342	0
MS2,5 - G12	-	-	-	-
MS3,75 - G12	0,090	0	0,036	1
MS0,5 - MS3,75	0,116	0	0,002	1

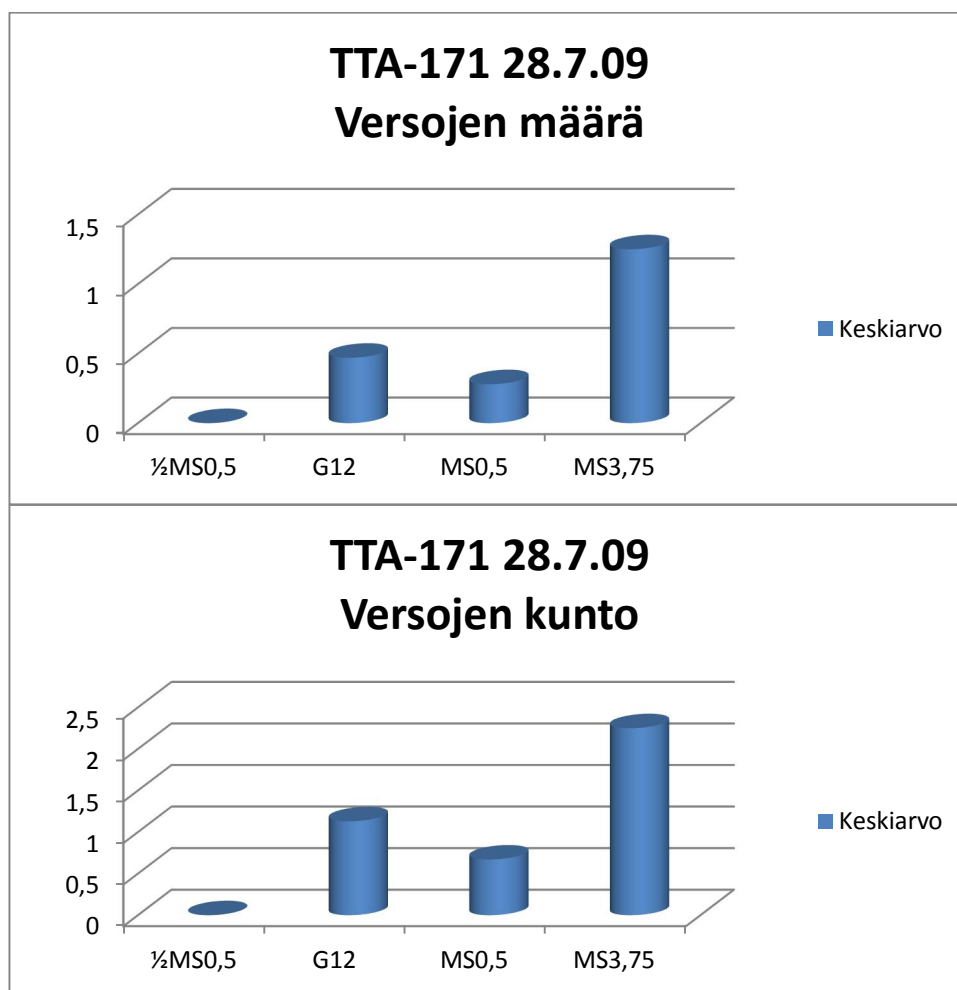


KUVIO 15. TTA-171. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot toisella lisäyskerralla

Kolmannen lisäyskerran pareittaiset vertailut ovat taulukossa 11 ja pylväsdia-grammit kuviossa 16. P-arvojen mukaan eroa sekä versojen määrän, että kunnon suhteen on vain vahvimman ja laimeimman MS-alustan välillä. Keskiarvojen perusteella MS3,75-alusta on ehdottomasti paras niin versojen määrän kuin kunnonkin suhteen.

TAULUKKO 11. TTA-171. Alustojen pareittainen vertailu, kolmas lisäykerta

Parit	Versojen määrä		Versojen kunto	
	p-arvo	eroa?	p-arvo	eroa?
½MS0,5 - G12	0,261	0	0,257	0
½MS2,5 - G12	-	-	-	-
½MS3,75 - G12	-	-	-	-
½MS0,5 - ½MS3,75	-	-	-	-
MS0,5 - G12	0,716	0	0,711	0
MS2,5 - G12	-	-	-	-
MS3,75 - G12	0,176	0	0,178	0
MS0,5 - MS3,75	0,061	(1)	0,057	(1)



KUVIO 16. TTA-171. Versojen määrän ja kunnon keskiarvot kolmannella lisäykerralla

8 TULOSTEN POHDINTA

Molemmilla lajikkeilla ja etenkin hankalammin lisääntyvällä 'Andenken an Ludwig Späth' -lajikkeella lisääntyminen oli parasta BAP-hormonin suhteen vahvimalla MS-alustalla (3,75 mg/l). Vaikka molemmilla lajikkeilla MS3,75-alustalla oli joillakin lisäyskerroilla kuolleisuuttakin jonkin verran, niin elossa olevat olivat puolestaan niin erinomaisen hyviä ja pitkiä, että niistä saatiin jaetua useita versoja.

Asennolla todettiin jo aiemmin olevan vaikutusta lisääntymiseen. Vaaka-asennossa verson pinnasta koskettaa isompi osa ravinnealustaa kuin pystyasennossa, jolloin vain tyvi on alustassa. Vaaka-asennossa olevan verson hankaväleistä uusien versojen on helpompi ponkaista kasvuun ylöspäin.

Koeastialla ja näin ollen valon määrälläkin näyttäisi olevan positiivinen vaikutus syreenin kasvuun. Syreeni on paljon pituutta kasvava kasvi, ja normaalisissa lasipurkissa kasvaessaan sen pisimmät versot kasvavat foliokorkkiin asti. Jos tilaa olisi, ne kasvaisivat vieläkin pitemmälle. Koeputki on oikein otollinen astia syreenille, joka kasvaa mieluummin korkeutta kuin tuuheutta. Huono puoli tietenkin tuotannon kannalta on, että versoja ei koeputkeen mahdu kuin yksi tai, jos on pieniä versoja, niin ehkä kaksi tai kolmekin voisi mahtua. Joka tapauksessa koeputkissa kasvattaminen veisi todella paljon nykyistä enemmän tilaa kasvatushuoneesta.

Ilmastoidun korkin vaikutuksista tässä kokeessa on vaikea sanoa, koska olisi pitänyt olla verrokkina toinen koeasetelma, jossa ei olisi käytetty ilmastointia. Näin olisi helpompi sanoa, oliko sillä positiivinen vai negatiivinen vaikutus kasvuun ja lisääntymiseen. Mutta voihan olla, että versot saivat karaistua liikaa, kun perusalustallakaan olevat versot eivät erityisemmin menestyneet tässä kokeessa. Paremmin lisääntyvällä 'Liisa'-lajikkeella perusalusta menestyi toiseksi parhaiten ja 'Andenken an Ludwig Späth'-lajikkeella se oli yhtä huono

kuin muutkin huonoimmat alustat. Ehkäpä syynä oli juuri ilmastoitu korkki, koska tuskin perusalustan huono menestys koeastiastakaan johtui. Muutoinhan versoilla oli samanlaiset olosuhteet kuin normaalissakin syreenien lisäyksessä. Karaisua käytetään vähentämään kasvin kokemaa stressiä, kun se siirretään tiiviistä astiasta juurrutus-alustalle ja lopuksi turpeelle. Ehkä parempi vaihtoehto olisi ollut käyttää ilmastoitua korkkia vasta viimeisellä lisäyskerralla, jotta versot olisivat saaneet karaistua ennen juurrutukseen ja lopulta turpeelle menoa. Tai sitten versoja olisi voinut karaista vasta juurrutus-alustalla, kuten MTT:llä usein tehdään muillekin kasveille.

Työn tavoitteena oli löytää optimaalinen lisäysalusta kahdelle syreenilajikkeelle ja etenkin vaikeasti lisääntyvälle jalosyreenilajikkeelle. Aivan täysin optimaalista alustaa tässä kokeessa ei löydetty, mutta erittäin hyvät suuntaa antavat tulokset kuitenkin saatiin. Ja ajan määrän niin sallien olisi tätä koetta voinut jatkaa eteenpäin, jotta optimaalisin alusta olisi löytynyt. Uskoisin, että sellainen alusta löytyisi makrosuolojen osuutta ja hormonipitoisuutta hiomalla. Kokeen perusteella voidaan todeta, että Murashige-Skoogin alusta sopii syreenille hyvin ja syreeni vaatii selvästikin korkeampia hormonipitoisuuksia. Tulevaisuudessa kannattaisikin testata vieläkin korkeampia BAP-pitoisuuksia, kuten alun perin aiottuja pitoisuuksia 5,0 mg/l ja 7,5 mg/l. Ehkä myös auksiinipitoisuutta muuttamalla voisi saada parempia tuloksia, koska sytokiniini kuitenkin vaatii auksiinia toimiakseen. Jos sytokiniiniä olisi 7,5 mg/l niin siihen verrattuna 0,1 mg/l auksiinia on aika vähän.

Myös eri sokereiden testaamisessa voisi olla ideaa. Perustana voisi pitää MS-alustaa, mutta siitä voisi tehdä sokereiden suhteen eri versioita: yhden, johon sakkaroosin tilalle laitettaisiin fruktoosia, ja toisen, jossa sakkaroosin tilalla olisikin glukoosia. Tällaista on ainakin harvoin testattu syreenillä, koska yhtään sellaista tutkimusta ei ole tullut vastaan kirjallisuusviitteitä etsiessä. Tähän kokeeseen voisi lisäksi yhdistää BAP-pitoisuuden ja NAA-pitoisuuden sarjat.

Juurtumiseen ja turpeella kasvuun lähtöön ei näyttänyt lisäysalustojen välillä olevan juurikaan eroa, vaikka lisäysalustan koostumuksella on yleensä vaikutusta kasvin kasvuun *in vitro*. Syreenien juurtumisessa ei ole isompia ongelmia MTT:llä, mutta tulevaisuudessa voisi olla mielenkiintoista tehdä juurrutuskoee, jossa voisi testata erilaisia juurrutusalustoja samalta lisäysalustalta tuleville versoille ja näin tutkia syreenien juurten muodostusta. Kaiken kaikkiaan parhaat tulokset voisivat löytyä niin, että ensin etsittäisiin optimaalisin lisäysalusta ja sen jälkeen suoritettaisiin juurrutuskoee. Ja nimenomaan niin, että juurrutuskokeeseen erilaisille alustoille versot siirrettäisiin siltä optimaalisimmalta lisäysalustalta. Näin löydettäisiin parhaiten toimiva parivaljakko ja tuotantokin tehostuisi.

LÄHTEET

- Bennet, W. F. 1993. Nutrient Deficiencies & Toxicities In Crop Plants. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Bremer, K. 1983. Ydinkasvien tuottaminen kasvisolukkoviljelyn avulla. Maatalouden tutkimuskeskus, Kasvitautilien tutkimuslaitos. Tiedote No 38.
- Collin, H. A. & Edwards, S. 1998. Plant Cell Culture. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Debergh, P. C. & Zimmerman, R. H. 1991. Micropropagation Technology and Application. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers.
- George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G-J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1 The Background. 3rd edition. Netherlands: Springer.
- George, E. F., Puttock D. J. M. & George H. J. 1987. Plant Culture Media. Volume 1. Edington Westbury, England: Execetics Limited.
- George, E. F. & Sherrington, P. D. 1984. Plant Propagation by tissue Culture, Handbook and directory commercial laboratories. Edington, Westbury England: Exegetics
- Haapala, T. & Niskanen, A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikro-lisäys. Helsinki: VAPK-kustannus.
- Hokka, H., Laamanen, J., Lahtonen, V., Pöyhönen, P. & Uosukainen, M. 2009. Varmennetun taimituotannon emokasvihinnasto vuonna 2010 Laukaa. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen Laukaan toimipaikka.
- Jalosyreeni Andenken an Ludwig Späth. Ahosen Taimiston sivusto. Viitattu 23.1.2011.
http://www.ahosentaimisto.fi/product/841/jalosyreeni_andenken_an_ludwig_sp_ath.
- Juhlista Vihervuotta syreeneillä. 2011. Puutarhaliiton sivusto. Tiedote julkaistu 26.5.2008. Viitattu 27.2.2011.
<http://www.puutarhaliitto.fi/index.php?action=view&id=7&module=newsmodule&src=%40random4816a5978a514>.

Kallio, P. & Rousi, A. 1981. Kasvien maailma, Otavan iso kasvitietosanakirja. Keuruu: Kustannusyhtiö Otavan painolaitokset.

Kamruzzaman, M., Pierik, R. L. M. & Schornagel, M. J. 1997. Effect of MS macro salt and sucrose with two levels of NAA on micropropagation of rejuvenated lilac. Thai Journal Agricultural Science (Thailand)

Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.)

Nesterowicz, S., Kulpa, D., Moder, K. & Kurek, J. 2006. Micropropagation of an old specimen of common lilac (*Syringa vulgaris* L.) from the dendrological garden at przelewice. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 5(1) 2006, 27-35.

Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Dordrecht. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.

Pierik, R. L. M., Steegmans, H.H.M., Elias, A.A., Stiekema, O.T.J. & Velde, A. J. van der 1988. Vegetative propagation of *Syringa vulgaris* L. *in vitro*. *ISHS Acta horticultrae* 226: International Symposium on Propagation of Ornamental Plants.

Pihasyreeni. *Syringa vulgaris*, pihasyreenin kuva. Oulujoen Taimisto Ky:n sivusto. Viitattu 23.1.2011.

<http://koti.kapsi.fi/~titenno/taimisto/tietokannankuvat3/653.jpg>.

Pöyhönen, P. 2010. Syringoista. Sähköpostiviesti. 6.5.2010. Vastaanottaja T. Natri. Tutkimusmestarin viesti syreenien historiasta MTT:llä.

Refouvelet, E., Daguin, F., Buffet, D., Forest, L. & Letouzé, R. Effect of different media and of a CO₂-enriched atmosphere on growth of lilac (*Syringa vulgaris* L.) vitroplants. *ISHS Acta Horticulturae* 530: International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation.

Refouvelet, E., Le Nours, S., Tallon, C. & Daguin, F. 1998. A new method for *in vitro* propagation of lilac (*Syringa vulgaris* L.): regrowth and storage conditions for axillary buds encapsulated in alginate beads, development of a pre-acclimatisation stage. *Scientia Horticulturae*, volume 74, 233-241.

Taiz, L., Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Second Edition. Sunderland: Sinauer Associates.

Tomsone, S., Galeniece, Ā., Akere, A., Priede, G. & Zīra, L. 2007. In vitro propagation of *Syringa vulgaris* L. cultivars. *Biologija*, 53, 2, 28–31. University of Latvia.

Uosukainen M. 1996. Kontaminaatiot solukkoviljelylaboratorioissa. Teoksessa *Solusta tuottavaan kasviin, hyötykasvien solukkoviljelyseminaari*. Toim. Sirkka Immonen. Jokioinen. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja.

Uosukainen M. 1992. Rooting and weaning of apple rootstock YP. *Agronomie* 12: 803-806

LIITTEET

Liite 1. Alustojen valintaan käytetyt kirjallisuusviitteet

RAVINTEET	SOKERI	SYTOKINIINIT		AUKSIINIT		Agar (g/l)	pH	TULOS	LÄHDE
	sakkarooosi (g)	BAP (mg/l)	2iP (mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)				
1,5 MS (makrot)	30		3	0,05	0,15	6,1	5,8	Alustoista 150 % MS:llä versojen lisääntyminen parempi kuin 100 % MS: llä tai Andersonilla, sytokiniini ja auksiini yhdessä vaikuttavat parhaiten kasvuun.	1
1,5 MS (makrot)		1		0,05	0,15				
MS			3	0,05	0,15				
MS		1		0,05	0,15				
Anderson			3	0,05	0,15				
Anderson + MS		1		0,05	0,15				
MS	30	5		0,01		7	5,8	Lisääntyminen 100 %, alustalla hyvät olosuhteet kasvulle	2
MS, jossa kaksinkertainen määrä MgSO ₄	30	5				Ei mainittu	Ei mainittu	Versoilla paras pituuskasvu alustalla, jossa kaksinkertainen määrä MgSO ₄ , vaikkakaan versot eivät paljoa eronneet alustan, jossa kaksinkertainen määrä KH ₂ PO ₄ , versoista.	3
MS, jossa kaksinkertainen määrä KH ₂ PO ₄		5							
MS, jossa kaksinkertainen määrä CaCl ₂		5							

MS, jossa kaksinkertainen määrä MgSO ₄	30	0						Sytokiniinin määrällä vaikutusta. Paras pituus-kasvu, paino ja hankavälien määrä versoilla, joiden alustassa 1,0 mg/l BAP:a.	3
MS, jossa kaksinkertainen määrä MgSO ₄		0,5							
MS, jossa kaksinkertainen määrä MgSO ₄		1				Ei mainittu	Ei mainittu		
MS, jossa kaksinkertainen määrä MgSO ₄		3							
MS, jossa kaksinkertainen määrä MgSO ₄		5							
0 MS (makrot)	3 eri tasoa: 0, 10, 35			2 eri tasoa: 0,1 ja 1,0		Ei mainittu	Ei mainittu	Paras yhdistelmä: 0,5MS, 20 g/ 35 g sokeria, 0,1 mg/l NAA	4
0,5 MS (makrot)									
1,0 MS (makrot)									
1,5 MS (makrot)	35		0,8			8	6	Paras tulos verson kasvussa 1,0 mg/l 2iP:n pitoisuudella.	5
MS	30	7,5		0,1		7	Ei mainittu	Lisääntyminen hyvä.	6







Lähteet

1. Tomsone ym. 2007
2. Refouvelet ym. 1998
3. Nesterowicz ym. 2006
4. Kamruzzaman ym. 1997
5. Pierik ym.
6. Ei tiedossa

Liite 2. TTA-608. Paikkakartta

7	17	20	11	19	8	4	16	10	20	14	5	13	18	3	5	14	8	15	9	10
6	1	15	7	1	5	10	17	14	18	16	2	18	12	5	19	6	2	13	10	10
5	11	2	3	9	12	18	7	17	2	6	16	16	19	6	6	11	8	17	14	14
4	12	17	19	16	17	7	9	7	8	4	1	15	11	20	4	4	2	13	6	19
3	3	1	20	14	14	15	9	16	12	15	18	3	4	18	11	15	20	8	3	4
2	15	2	7	19	12	10	10	1	13	9	7	8	18	17	13	12	3	1	8	16
1	13	5	9	3	11	5	20	11	20	4	13	2	1	9	6	19	6	12	7	5
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T







Värien merkitys

	½MS0,5
	½MS2,5
	½MS3,75
	G12
	MS0,5
	MS2,5
	MS3,75

Liite 3. TTA-171. Paikkakartta

7	17	12	16	3	10	1	17	7	16	18	15	13	3	8	16	14	6	16	15	15
6	16	12	5	3	17	7	7	17	3	2	3	4	8	6	17	17	13	18	18	11
5	20	4	9	19	1	13	10	6	20	2	19	5	13	1	8	10	6	15	14	6
4	9	5	12	18	8	16	11	18	12	8	10	1	15	16	10	12	2	9	19	14
3	5	11	9	14	19	20	11	3	8	15	18	5	4	13	9	14	1	19	3	9
2	19	5	1	15	6	2	1	4	2	13	5	8	12	9	7	2	10	12	6	20
1	11	13	11	7	20	19	4	14	18	11	7	17	2	4	10	20	20	14	4	7
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T

Värien merkitys

	½MS0,5
	½MS2,5
	½MS3,75
	G12
	MS0,5
	MS2,5
	MS3,75

Liite 4. TTA-608. Ensimmäinen lisäskerta, havainnot 18.5.2009

Putket	½MS 0,5			½MS 2,5			½MS 3,75			G12		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	1	huono	1	3	pieniä	2	1	hyvin pieni	1	1	ilmassa, hyvä	3
2	1	huono	1	0	kuollut	0	1	huono	1	2	hyviä	3
3	1	kuivahko	1	1	hyvä	3	1	pieni	2	1	isolehtinen	3
4	1	pieni	2	1	huono	1	2	hyvin pieniä	1	2	pieniä	3
5	2	pieniä	2	3	pieniä	2	1	pieni	2	2	pieniä, isot lehdet	3
6	1	huono	1	1	huono	1	1	pieni, kuivahko	1	2	pieniä, isot lehdet	1
7	1	pieni	2	1	huono	1	1	pienehkö	2	0	ei kasvua, kuiva	1
8	0	kuollut, 2 kallusta	0	1	hyvä	3	1	hyvin pieni	1	1	hyvä	3
9	1	pieni	2	1	kuivahko	1	2	pieniä	2	1	hyvä	3
10	0	kuollut	0	1	hyvin pieni	1	0	kuollut	0	1	pienehkö, hyvä	2
11	1	kuivahko	1	1	pieni	2	2	pieniä	2	1	hyvä	3
12	1	huono	1	1	pieni	2	1	pieni, hyvä	2	0	vesittynyt, iso	0
13	1	matala	2	2	1 hyvä, 1 huono	2	1	pieni, kuivat lehdet	1	1	hyvä, isot lehdet	3
14	1	pieni, kuiva	1	2	hyviä	3	1	pienehkö	1	1	isolehtinen	3
15	2	hyvin pieniä	2	0	kuollut, 2 kallusta	0	0	kuollut	0	1	isolehtinen	3
16	1	pieni, iso kallus	1	1	pieni, kuivahko	1	1	pienehkö	2	1	hyvä	3
17	1	hyvä	3	0	kuollut, 2 kallusta	0	1	huono, kuiva	1	1	hyvä	3
18	1	hyvä	3	1	pienehkö, hyvä	1	1	huono	1	1	isolehtinen	3
19	0	home	0	1	pieni	2	1	pieni	2	1	iso, hyvä	3
20	1	huono	1	1	hyvin pieni	1	1	ilmassa, pieni	2	2	hyviä	3

Putket	MS 0,5			MS 2,5			MS 3,75		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	1	hyvä, matala	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	0	kuollut, kontaminaatio	0
2	1	hyvä	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	pieni, kontaminaatio	0
3	2	pieniä, hyvä	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	pieni, kontaminaatio	0
4	2	hyviä	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	hyvä, kontaminaatio	0
5	1	pieni, ylösalaisin	1	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	hyvä, kontaminaatio	0
6	2	hyviä, isompia	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	2	hyviä, kontaminaatio	0
7	1	isolehtinen, hyvä	4	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	hyvä, kontaminaatio	0
8	1	pieni, kuivahtanut	1	0	kuollut, kontaminaatio	0	0	kuollut, kontaminaatio	0
9	1	pieni, hyvä	2	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	pieni, kontaminaatio	0
10	1	pieni, hyvä	2	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	hyvä	3
11	2	hyviä	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	0	kuollut	0
12	1	hyvä, iso	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	pieni, kontaminaatio	0
13	1	hyvä, suht pitkä	4	0	kuollut, kontaminaatio	0	2	tuuhea, hyviä	4
14	1	hyvä, iso	4	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	hyvä	3
15	1	pieni, ilmassa	1	0	kuollut, kontaminaatio	0	2	1 pieni, 1 hyvä	3
16	1	hyvä, pitkä	4	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	pieni	2
17	1	hyvä	3	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	hyvä	3
18	1	kallusmöykky	0	0	kuollut, kontaminaatio	0	2	pieniä	2
19	1	pieni	2	0	kuollut, kontaminaatio	0	1	hyvä	3
20	1	hyvin pieni	1	0	kuollut, kontaminaatio	0	4	pieniä	2

Liite 5. TTA-608. Toinen lisäskerta, havainnot 24.6.2009

Putket	½MS 0,5			½MS 2,5			½MS 3,75			G 12		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	1	pieni	2	0	kuollut	0	1	hyvä	3	0	kuollut	0
2	1	huono	1	1	huono	1	0	kuollut	0	1	hyvä, juuria	3
3	1	hyvä	3	0	kuollut	0	1	hyvä, kuivat lehdet	2	1	hyvä	3
4	0	kuollut	0	1	huono	1	3	ok, juuri	2	0	uponnut, kuollut	0
5	0	kuollut	0	1	huono	1	4	pieniä	2	0	uponnut, kuollut	0
6	1	huono	1	2	ok	2	1	hyvä	3	1	hyvä, isolehtinen	4
7	1	huono	1	2	huonoja	1	0	kuollut	0	1	hyvä, isolehtinen	4
8	2	pieniä	2	1	huono	1	1	hyvä	3	1	hyvä, isolehtinen	4
9	0	kuollut	0	1	huono, isolehtinen	1	1	huono	1	1	hyvä, iso	4
10	1	pieni	2	2	kuivahtaneita	1	1	huono	1	1	hyvä	3
11	0	kuollut	0	2	toinen elossa	1	0	kuollut	0	1	hyvä, isolehtinen	4
12	1	hyvä	3	1	huono	1	1	ok	2	2	hyviä, juuri	3
13	1	huono	1	1	huono	1	1	huono	1	1	hyvä, isolehtinen	4
14	0	kuollut	0	0	kuollut	0	1	hyvä, pieni	3	1	hyvä	3
15	1	huono	1	1	huono	1	0	kuollut	0	2	hyviä, pitkiä	4
16	1	huono	1	1	hyvä	3	1	hyvä	3	0	pieni, kuivunut	1
17	1	huono	1	1	huono	1	1	huono	1	1	hyvä, isolehtinen	4
18	0	tyhjä	0	0	kuollut	0	1	hyvä	3	2	hyviä	3
19	0	tyhjä	0	3	ok	2	1	huono	1	1	hyvä	3
20	0	tyhjä	0	1	huono	1	1	huono	1	5	2 isoa, 3 pientä	4

Putket	MS 0,5			MS 2,5			MS 3,75		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	2	pieniä	2	-	tyhjä	-	1	huono	1
2	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	huono	1
3	0	kuollut, ilmassa	0	-	tyhjä	-	2	hyviä	3
4	1	oikein hyvä	4	-	tyhjä	-	1	hyvä, pitkähäkö	4
5	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	huono	1
6	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	huono	1
7	1	ok, isolehtinen	3	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
8	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	5	hyviä, isoja	4
9	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	huono	1
10	1	huono	1	-	tyhjä	-	2	hyviä	3
11	1	ok	2	-	tyhjä	-	1	huono	1
12	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	1	pieni, kontaminaatio	0
13	1	hyvä, juuri	3	-	tyhjä	-	2	hyviä	3
14	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	huono	1
15	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	0	uponnut, kontaminaatio	0
16	1	ok, isolehtinen	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, kontaminaatio	0
17	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	0	kuollut, kontaminaatio	0
18	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, kontaminaatio	0
19	1	hyvä, ilmassa	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, kontaminaatio	0
20	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	1	hyvä, kontaminaatio	0

Liite 6. TTA-608. Kolmas lisäskerta, havainnot 28.7.2009

Putket	½MS 0,5			½MS 2,5			½MS 3,75			G 12		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	1	ok	2	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
2	0	kuollut	0	1	hyvä	3	1	ok	2	0	kuollut	0
3	1	pieni	2	1	hyvä	3	0	vesittynyt	0	1	hyvä	3
4	0	kuollut	0	1	hyvä, kuivat lehdet	2	1	huono	1	0	kuollut	0
5	-	tyhjä	-	1	hyvä	3	1	hyvä	3	2	hyviä	3
6	0	kuollut	0	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
7	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	2	1 pitkä, 1 pieni	3	1	hyvä, juuri	3
8	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	paljon lehtiä, hyvä	3	1	oikein hyvä	4
9	1	ok	2	1	huono	1	3	hyviä, pieniä	3	0	kuollut	0
10	-	tyhjä	-	2	hyviä	3	1	paljon lehtiä, ok	3	1	hyvä, juuri	3
11	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä	3	1	hyvä	3
12	2	pieniä	2	2	ok	2	1	hyvä, pieni	3	1	hyvä	3
13	1	ok	2	2	hyviä	3	0	vesittynyt	0	2	hyviä	3
14	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	2	hyviä	3
15	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	2	ok	2	1	hyvä	3
16	1	ok	2	0	kuollut	0	0	kuollut	0	1	hyvä	3
17	1	ok	2	1	ok	2	1	pieni	2	1	hyvä	3
18	-	tyhjä	-	1	oikein hyvä	4	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
19	-	tyhjä	-	1	pieni	2	-	tyhjä	-	2	hyviä	3
20	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	0	kuollut	0	1	huono	1

Putket	MS 0,5			MS 2,5			MS 3,75		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	5	tiheä, hyvä	4
2	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	3	hyviä, +uusia alkuja versoissa	4
3	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	2	hyviä	4
4	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	3	ilmassa, ok	2
5	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	3	hyviä	3
6	1	pieni	2	-	tyhjä	-	3	hyviä	3
7	1	oikein hyvä	4	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
8	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	2	hyviä	3
9	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	2	hyviä	3
10	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
11	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
12	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	ok, isolehtinen	3
13	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	3	2 pientä, 1 pitkä	3
14	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	5	pitkiä, hyviä, uusia alkuja	4
15	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
16	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	4	hyviä, molemmissa alkuja	4
17	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
18	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
19	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
20	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	2	pieniä	2

Liite 7. TTA 171. Ensimmäinen lisäskerta, havainnot 18.5.2009

Putket	½MS 0,5			½MS 2,5			½MS 3,75			G 12		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	1	pieni	2	0	vesittynyt	0	0	vesittynyt	0	1	hyvä	3
2	0	kuollut	0	1	pieni, huono	1	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
3	1	pieni	2	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
4	0	kuollut	0	1	pieni	1	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
5	0	kuollut	0	1	pieni	1	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
6	0	kuollut	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	1	pieni	2
7	0	kuollut	0	1	hyvin pieni	1	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
8	0	kuollut	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	1	huono	1
9	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
10	1	pieni	2	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
11	0	kuollut	0	1	huono	1	0	kalluspallo	0	0	kuollut	0
12	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	vesittynyt	0	2	1 ok, 1 huono	1
13	1	pieni	2	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	1	pieni	2
14	0	kuollut	0	0	kuollut	0	0	kuollut	0	0	kuollut	0
15	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
16	0	kuollut	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	1	pieni	2
17	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	0	kuollut, ylösalaisin	0
18	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	kalluspallo	0	1	hyvä	2
19	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0
20	0	kuollut	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0	2	hyviä	2

Putket	MS 0,5			MS 2,5			MS 3,75		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	4	pieniä	2	0	kuollut	0	1	hyviä, kallus ilmassa	3
2	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0
3	2	hyviä	3	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0
4	2	pieniä	2	0	kuollut	0	0	kuollut, uponnut	0
5	0	kuollut, 4 kallusta	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0
6	3	1 iso, 2 pienehköä	3	0	kuollut	0	1	hyvä	3
7	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	3	pieniä, kallus ilmassa	2
8	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	3	1 vesit. 2 hyvää, toinen pitkä	3
9	1	hyvin pieni	1	0	kuollut	0	3	oikein hyviä	4
10	2	huonoja	1	0	kuollut	0	2	hyviä, toinen pitkä	4
11	1	hyvä	3	0	kuollut	0	1	hyvä, tosi pitkä	4
12	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	2	hyviä	3
13	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	2	1 pieni, 1 pitkä, hyviä	4
14	2	hyviä	3	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0
15	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0
16	0	kuollut, ylösalaisin	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0
17	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0
18	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	1	pieni, ylösalaisin	2
19	0	vesittynyt	0	0	kuollut	0	2	ok	2
20	4	1 pitkä, 3 pientä	4	0	kuollut	0	0	vesittynyt	0

Liite 8. TTA-171. Toinen lisäykerta, havainnot 24.6.2009

Putket	½MS 0,5			½MS 2,5			½MS 3,75			G 12		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
2	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
3	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
4	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
5	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
6	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
7	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
8	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
9	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
10	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
11	-	tyhjä	-	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
12	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
13	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
14	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
15	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	2	hyviä	3
16	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä, isolehtinen	4
17	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-
18	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
19	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	ok, kuivat lehdet	2
20	1	ok	2	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-

Putket	MS 0,5			MS 2,5			MS 3,75		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	1	huono, ylösalaisin	1	-	tyhjä	-	2	hyviä, ilmassa lehden varassa	3
2	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	1	oikein hyvä	4
3	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
4	1	hyvä, ilmassa	3	-	tyhjä	-	2	oikein hyviä, pitkiä	4
5	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
6	1	ok	2	-	tyhjä	-	4	1 pitkä (10 cm), 3 hyvää	4
7	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, tuuhea	4
8	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	3	hyviä, tuuhea, ilmassa	4
9	1	huono	1	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
10	1	pieni, ok	2	-	tyhjä	-	2	oikein hyviä, ilmassa	4
11	1	hyvä, ylösalaisin	3	-	tyhjä	-	3	2 hyvää, 1 vesittynyt	3
12	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
13	2	pieniä	2	-	tyhjä	-	1	hyvä, ilmassa lehden varassa	3
14	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, pitkä	4
15	1	hyvä, ylösalaisin	3	-	tyhjä	-	2	oikein hyviä	4
16	2	pieniä	2	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
17	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, ilmassa lehden varassa	3
18	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	3	tuuhea, 1 pitkä(10 cm), oikein hyviä	4
19	2	pieniä	2	-	tyhjä	-	2	oikein hyviä	4
20	1	huono	1	-	tyhjä	-	2	hyviä, toinen iso	4

Liite 9. TTA- 171. Kolmas lisäskerta, havainnot 28.7.2009

Putket	½MS 0,5			½MS 2,5			½MS 3,75			G 12		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
2	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	tyhjä	0
3	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	2	ok, 1 pitkä, 1 lyhyt	3
4	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
5	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä, isolehtinen	4
6	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	tyhjä	0
7	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
8	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	vesittyntyt	0
9	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	tyhjä	0
10	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
11	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	vesittyntyt	0
12	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
13	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	tyhjä	0
14	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	vesittyntyt	0
15	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	huono	1
16	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä, pieni	3
17	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	tyhjä	0
18	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	vesittyntyt	0
19	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	kuollut	0
20	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	1	hyvä	3

Putket	MS 0,5			MS 2,5			MS 3,75		
	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka	Versojen määrä	Verson kunto	Kunto-luokka
1	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	hyviä, pitkiä	4
2	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	hyviä, pitkiä	4
3	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	hyviä, pitkiä	4
4	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
5	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	4	hyviä, pitkiä	4
6	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
7	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	hyviä, pitkiä	4
8	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
9	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, pitkä	4
10	1	pieni, ok	2	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
11	1	ok	2	-	tyhjä	-	1	hyvä	3
12	1	pieni, ok	2	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
13	-	tyhjä	-	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
14	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
15	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	3	hyviä, pitkiä	4
16	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	3	hyviä, pitkiä	4
17	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	0	vesittynyt	0
18	1	hyvä	3	-	tyhjä	-	1	hyvä, pitkä, lehtikasa	4
19	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	1 hyvä, 1 vähän vesittynyt	3
20	0	kuollut	0	-	tyhjä	-	2	2 hyvä, 1 vähän vesittynyt	3

Liite 10. Juurrutuksen ja koulinnan havainnot

Juurrutus & Koulinta TTA-608

Alusta	Versoja juurrutus-alustalla	Kuolleita	Versot, joissa juuria	Versojen yleiskunto	Turpeelle	Kasvuun lähteneet	Versojen yleiskunto
½MS 0,5	6	0	0	3, hyvää, 3 huonoa	3	3	1,0-2,5 cm pitkiä, hyviä
½MS 2,5	13	0	3	ok	13	13	6 huonoa, 7 hyvää 2-5 cm pitkiä
½MS 3,75	16	0	5	hyviä, osa pitkiä	16	13	2 pientä, 13 hyvää 2-5 cm pitkiä
G 12	20	0	11	hyviä, pitkiä	20	20	2-6 cm pitkiä, hyviä
MS 0,5	9	0	1	pieniä	4	1	2 cm pitkä, hyvä
MS 2,5	0	-	-	-	-	-	-
MS 3,75	37	0	9	hyviä, isoja	37	36	0,5- 5 cm pitkiä, hyviä

Juurrutus & Koulinta TTA-171

Alusta	Versoja juurrutus-alustalla	Kuolleita	Versot, joissa juuria	Versojen yleiskunto	Turpeelle	Kasvuun lähteneet	Versojen yleiskunto
½MS 0,5	0	-	-	-	-	-	-
½MS 2,5	0	-	-	-	-	-	-
½MS 3,75	0	-	-	-	-	-	-
G 12	6	0	1	hyviä	6	6	2-5 cm pitkiä, hyviä
MS 0,5	4	1	0	huonoja	3	2	1 cm pitkiä, ok
MS 2,5	0	-	-	-	-	-	-
MS 3,75	40	0	0	hyviä	40	36	2-5 cm pitkiä, hyviä

Liite 11. Työssä käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus	Muuta
KNO ₃	J.T. Baker	ba (Baker analyzed), 99,5%	Lot: B47155, UN 1486
NH ₄ NO ₃	J.T. Baker	ba	Lot: 0703101016, UN 1942
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	J.T. Baker	ba	Lot: 0514301003, UN 1454
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck	Pro analysi	903 TA 580182
H ₃ BO ₃	Riedel de Haën	99,8%	31146,
KI	Merck	Pro analysi, 99,5%	5043.0250 235, B447643
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	J.T. Baker	ba	0295, Lot: T20633
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	J.T. Baker	ba	1059, Lot: K49644
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	J.T. Baker	ba	0365, Lot: 0729601040
MnSO ₄	VWR International	-	040130, UN 3077
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	J.T. Baker	ba	0140, Lot: 0622301001
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	J.T. Baker	ba	0168, Lot: 0804301003
6-Benzylaminopurine (BAP)	Sigma	Plant cell culture tested	B-3408, Lot: 59H3868
Naphtaleneaceticacid (NAA)	Sigma	Plant cell culture tested	N0640
Agar Agarhochrein	Merck	Für die Mikrobiologie	86500588
D(+)-Glucose anhydre	Riedel de Haën	-	16325, Lot: 80790
B2-turve,	Kekkilä	Puhdas, tasalaatuinen vaalea-earahkaturve	WHITE 620, pH 6,0, 1090917