

ALPPIRUUSUJEN SIEMENTEN JA SIITEPÖLYN KRYOSÄILYTYS

Milja Rantanen

Opinnäytetyö
Lokakuu 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma
Tekniikan ja liikenteen ala





Tekijä(t)	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 10.10.2011
RANTANEN, Milja	Sivumäärä 66	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi ALPPIRUUSUJEN SIEMENTEN JA SIITEPÖLYN KRYOSÄILYTYS		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) VÄRTÖ-NIEMI, Merja, lehtori		
Toimeksiantaja(t) MTT Kasvintuotannon tutkimus, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, vanhempi tutkija NUKARI, Anna, tutkija		
Tiivistelmä <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää nestetyyppipakastusmenetelmä suomalaisten alppiruusujen siementen ja siitepölyn pitkäaikaissäilytykseen. Työn tilaaja oli Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT), Laukaan toimipaikka. MTT:ssä nestetyyppipakastusta ei ollut aikaisemmin kokeiltu siemenille eikä siitepölylle. Taustatieto löydettiin ulkomaisista julkaisuista. Materiaali kerättiin maaliskuuhun 2011 aikana Laukaan kokoelmista. Siemenet kerättiin kenttäkokoelmista ja siitepöly kasvihuoneista. Yhteensä tutkimuksessa käytettiin 20:tä eri alppiruusulajiketta ja -jalostetta.</p> <p>Siemenille löydettiin pintasterilointiin sopivat liuokset ja välineet, steriilit kasvualustat ja kryopakastukseen sopivat välineet. Siementen kosteuspitoisuus huoneilmakuivatuksen jälkeen oli 6–8 %. Aineistolle sovellettiin kuivuutta sietävien (orthodox) siementen kryomenetelmiä. Kokeilujen perusteella todettiin, että nopea pakastus ja nopea sulatus ovat toimivia menetelmiä näille siemenille. Tutkimuksen tulos oli, että kryopakastettujen siementen itäminen ei merkittävästi eronnut kontrollisiementen itämisestä. Tulos perustuu 1500 siemenen testaamiseen, siemenistä puolet sai nestetyyppikäsittelyn ja puolet oli kontrolleja.</p> <p>Siitepölylle löydettiin kasvatusliuos ja -astia, jolla siitepöly saatiin itämään. Siitepölyhiukkasten erotteluun ponsista löytyi toimiva menetelmä. Toimiviksi menetelmiksi todettiin siitepölyn kuivattaminen huoneilmassa, nopea pakastus ja nopea sulatus. Tutkimuksen tulos oli, että nestetyyppipakastus ei heikennä suomalaisten alppiruusujen siitepölyn itävyyttä. Tulos perustuu usean henkilön silmämääräiseen arviointiin koskien 13:a lajiketta ja jalostetta.</p> <p>Kehitetyt menetelmät sekä siemenille että siitepölylle voidaan ottaa käyttöön sellaisenaan. Siementen osalta menetelmän toistettavuutta voi parantaa.</p>		
Avainsanat (asiasanat) Kryosäilytys, alppiruusu, nestetyppi, kuivuutta sietävä siemen, itävyys, pintasterilointi		
Muut tiedot		



Author(s) RANTANEN, Milja	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 10102011
	Pages 66	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (X)
Title CRYOPRESERVATION OF RHODODENDRON SEEDS AND POLLEN		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) VÄRTÖ-NIEMI, Merja, Lecturer		
Assigned by MTT Plant Production Research, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, Senior Research Scientist NUKARI, Anna, Research Scientist		
<p>Abstract</p> <p>The goal of this research was to develop a cryopreservation method for Finnish rhododendron seeds and pollen. Cryopreservation is one method for the long-term conservation of plant genetic resources. The study was carried out for Agrifood Research Finland (MTT) at Laukaa. Cryopreservation for seeds or for pollen had not been studied before in MTT. Background information was found from foreign publications. The material was collected during March and April in 2011. The seeds were collected from the field collections at MTT Laukaa and the pollen from the greenhouses. In total there were 20 different rhododendron cultivars and selected plants studied in this research.</p> <p>For seeds it was possible to find functional mediums and tools for disinfection, sterile germination mediums and workable tools for cryofreezing. After air-drying the water content of the seeds was 6–8 %. Cryomethods of orthodox seeds were applied for the studied material. Based on the experiments it was discovered that rapid freezing and rapid thawing are workable methods for these seeds. The result of the study was that the germination of cryopreserved seeds was not significantly different from germination of the fresh seeds. The result is based on testing 1500 seeds of which half were plunged into liquid nitrogen and the other half were control seeds.</p> <p>For pollen a suitable germination medium and dish were found. A workable method was found to separate pollen grains from anthers. Dehydration by air-drying, rapid freezing and rapid thawing were discovered as workable methods for pollen. The finding of the study was that cryopreservation does not decrease the germination of Finnish rhododendron pollen. The result is based on a visual estimate of several persons concerning 13 cultivars and selected clones.</p> <p>The methods developed can be introduced as such for both seeds and pollen. The repeatability of the method for seeds can be improved.</p>		
Keywords Cryopreservation, rhododendron, liquid nitrogen, orthodox seed, germination, seed disinfection		
Miscellaneous		

Hyvä Jumala,
anna armostasi sadetta joka päivä
jos vain sopii,
keskiyöstä kello kolmeen,
ja kuten tiedät
hyvin hienoa ja lämmintä,
jotta se hyvin imeytyy maahan.
Ja anna auringon paistaa
koko päivän,
vaikka ei tietenkään liikaa,
eikä Astilben, Gentianan, Hostan eikä
Rhododendronin päälle.
Mutta varjele sateelta
Silene, Alyssum, Helianthemum,
laventeli ja muut, jotka
kuten äärettömässä viisaudessasi tiedät,
pitävät kuivuudesta,
ja joiden nimet
voin kirjoittaa paperille,
jos niin tahdot.
Ja anna aina paljon kastetta
ja vähän tuulta,
runsaasti kastematoja,
mutta ei etanoita
eikä lehtitäitä eikä härmätauteja.
Ja jos sopii,
anna kerran viikossa
sataa lannoiteliuosta.
Aamen.

Teksti: Karel Capek

SISÄLTÖ

TERMINOLOGIA.....	4
1 TUTKIMUKSEN LÄHTÖKOHDAT	7
2 KASVIGEENIVAROJEN SUOJELU	9
2.1 Geneettisen monimuotoisuuden säilyttäminen.....	9
2.2 Säilytysmenetelmät siemenille	10
3 ALPPIRUUSUT.....	12
3.1 Alppiruusujen siemenet	12
3.2 Alppiruusujen siitepöly.....	15
4 KRYOSÄILYTYS.....	16
4.1 Siemenet.....	16
4.1.1 Kryokestävyyteen vaikuttavia tekijöitä	16
4.1.2 Pintasterilointi.....	18
4.1.3 Kryopakastus	19
4.1.4 Sulatus ja elpyminen.....	19
4.2 Siitepöly	21
5 TUTKIMUKSEN MATERIAALIT.....	22
5.1 Tutkittujen siementen lajikkeet ja jalosteet.....	22
5.2 Tutkittujen siitepölyjen lajikkeet ja jalosteet	22
6 TUTKIMUKSEN MENETELMÄT	23
6.1 Siemenet.....	23
6.1.1 Siementen kerääminen ja kuivatus.....	23
6.1.2 Siementen kosteuspitoisuuden määrittäminen	23
6.1.3 Itävyystesti ja kasvatusalusta	24
6.1.4 Pintasterilointi.....	25
6.1.5 Kryopakastus	28
6.1.6 Sulatus ja elpyminen.....	28
6.1.7 Havainnointi	29
6.2 Siitepöly	30
6.2.1 Siitepölyn kerääminen.....	30
6.2.2 Itävyystesti	31
6.2.3 Kuivatus ja irrottaminen ponsista.....	32
6.2.4 Kryopakastus	32
6.2.5 Sulatus ja elpyminen.....	33
7 TUTKIMUKSEN TULOKSET	33
7.1 Siemenet.....	33
7.1.1 Kosteuspitoisuuden määrittäminen.....	33
7.1.2 Itävyystesti ja kasvatusalusta	34
7.1.3 Pintasterilointi.....	35
7.1.4 Kryopakastus	38

	2
7.1.5 Sulatus ja elpyminen.....	40
7.2 Siitepöly	45
7.2.1 Itävyydestesti	45
7.2.2 Irrottaminen ponsista.....	46
7.2.3 Elpyminen	47
8 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA.....	49
8.1 Siemenet.....	49
8.1.1 Itävyydestesti ja kasvatusalusta	49
8.1.2 Pintasterilointi.....	51
8.1.3 Elpyminen	51
8.2 Siitepöly	52
9 JOHTOPÄÄTÖKSET	52
LÄHTEET	54
LIITTEET	57
Liite 1. Työssä käytetyt suomalaiset alppiruusulajikkeet ja -jalosteet sekä niiden vanhemmat	57
Liite 2. MS-kasvualusta siemenille.....	58
Liite 3. Siitepölylle kokeiltuja kasvatusalustoja	59
Liite 4. Käytännön ohje siementen kryosäilytykseen.....	60
Liite 5. Siementen itämistulokset viikoittain ja kasvuvaiheittain.....	62

KUVIOT

Kuvat tekijän itsensä ottamia, ellei toisin mainita.

KUVIO 1. Siemenen koko on suurimmillaankin alle 3 mm.....	12
KUVIO 2. Lajikkeen 'Pekka' kuivuneita siemenkotia ja niistä varisseita siemeniä	13
KUVIO 3. Siemenen epigeaisen itämisen vaiheet.....	14
KUVIO 4. Stereomikroskooppikuva lajikkeen 'Mauritz' siitepölystä	15
KUVIO 5. Tutkimusmikroskooppikuvat lajikkeen 'Mauritz' siitepölystä.....	16
KUVIO 6. Siemenen itämisen vaiheita	30
KUVIO 7. Kukkaterttuja ja niistä irrotettuja ponsia purkeissa.....	31
KUVIO 8. <i>Chaetomium</i> -hometta imupaperilla itäneissä siemenissä epäonnistuneen pintasteriloinnin jälkeen.....	35
KUVIO 9. Tiivistepaketti ja kuperaksi muotoiltu sihti	36
KUVIO 10. Folion koko ja taittelu sekä kryoputki	39
KUVIO 11. Siementen kääriminen folion sisään ennen kryoputkeen laittamista	39
KUVIO 12. Mutaatioita jalosteen St. Michel sisarklooni 2 itäneissä siemenissä	40

KUVIO 13. Siementen itäminen viiden viikon jälkeen kaikilla lajikkeilla ja jalosteilla	41
KUVIO 14. Lajikkeen 'Haaga' itäminen.....	43
KUVIO 15. Jalosteen Haaga sisarklooni 1 itäminen	43
KUVIO 16. Jalosteen St. Michel sisarklooni 2 itäminen	44
KUVIO 17. Siitepölyä ponsineen menossa kryoputkiin.....	47
KUVIO 18. 'Pohjola's Daughter' -siitepöly	48
KUVIO 19. 'Elviiran' siitepöly	48

TAULUKOT

TAULUKKO 1. Varsinaisen koeaineiston siementen kuivatusajat ja määritetyt kosteuspitoisuudet	34
--	----

TERMINOLOGIA

biodiversiteetti	Elollisen luonnon monimuotoisuus.
<i>ex situ</i> -säilytys	Kasvigeenivarojen säilytys muualla kuin niiden luonnonmukaisessa kasvuympäristössä, esim. siementen geenipankit pakastamalla, mikrolisättyinä kasveina koeputkissa (<i>in vitro</i>) ja pelto-geenipankit.
hybridi	Kahden geneettisesti erilaisen yksilön risteytymisestä syntyvä jälkeläinen (usein lajien välinen risteytyminen).
<i>in situ</i> -säilytys	Kasvigeenivarojen säilytys niiden luonnollisessa ympäristössä tai -ympäristöissä, joissa ne ovat kehittäneet erityisominaisuutensa. Esim. luonnonniityt, maataisviljojen viljelysuojelu (<i>on farm</i>) ja puutarhakasvit kotipuutarhoissa.
jaloste	Jalostustyössä kehitettyjä kasviyksilöitä kutsutaan jalosteiksi. Osa niistä nimetään lajikkeiksi.
kanta	Ryhmä sukulaisyksilöitä, jotka eroavat tiettyjen ominaisuuksien suhteen muista vastaavista saman lajin ryhmistä.
klooni	Perintötekijöiltään samanlaisten eliöiden ryhmä. Ts. populaatio, joka polveutuu yhdestä kantayksilöstä suvuttoman lisääntymisen kautta. Solukko- viljelmin saadaan klooneja tuotetuksi keinotekoisesti aloittamalla viljelmä solusta tai solukosta.
kryo	Kreikan kielen sanasta kryos, jäätävä kylmyys.
laji	Keskenään tosiasiallisesti tai potentiaalisesti lisääntyvien yksilöiden tai populaatioiden ryhmä, joka on lisääntymisisolaation eristämä muista tällaisista ryhmistä. Käytännössä lajikäsite on vaikeasti määriteltävä, koska luonnossa tavataan aina alueellista ja geneettistä muuntelua, joten laji ei voi olla staattinen, pysyvä yksikkö.

lajike	Viljelykasvien lajin sisäinen luokitteluyksikkö, jota ei käytetä luonnonkasvien yhteydessä. Lajike täytyy voida tunnistaa jonkin ominaisuuden mukaan, ja sen pitää säilyttää ominaisuutensa sitä viljeltäessä. Lajikkeet syntyvät jalostuksessa.
MMM	Maa- ja metsätalousministeriö.
MS-kasvualusta	T. Murashigen ja F. Skoogin kasvisoluviljelmille kehittämä ravinnealusta.
MTT	Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.
orthodox	Kuivuutta sietävä siemen (desiccation-tolerant behavior).
populaatio	Samanaikaisesti samalla alueella olevat yksilöt, jotka kykenevät lisääntymään keskenään eli kuuluvat samaan lajiin.
siemenpankki	Varasto, jonka tarkoituksena on säilyttää luonnonkasvien ja myös viljeltyjen kasvien geenivaroja tulevia aikoja ja tarpeita vasten. Siemeniä säilytetään suojaetuissa, hyvin kuivissa oloissa tai matalassa lämpötilassa (esim. nestemäisessä työssä, -196 °C), jolloin ne säilyvät useimmiten hyvin ja kauan. Siemenpankkeja on perustettu eri puolille maailmaa.
recalcitrant	Kuivuudelle herkkä siemen (desiccation-sensitive behaviour).
rehydraatio	Veden palauttaminen soluihin pakastuksen jälkeen.
valiotaimi	Taimi, joka on lisätty kasvullisesti ydinkasvista, ellei kasvilajikohtaisissa tuotantovaatimuksissa ole toisin mainittu.
ydinkasvi	Ydinkasvi, joka on tutkittu ja tarvittaessa puhdistettu ja Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) hyväksymä. Ydinkasvi on varmennetun taimiaineiston ydinkasviluetteloon merkitty, perinnöllisesti tunnistetusta lajikkeesta tai kannasta peräisin oleva

kasvi, kasviklooni tai valiosiemmenten tuotannossa
kasvipopulaatio, jonka aitous on varmistettu lajille,
lajikkeelle tai kannalle tyypilliseksi.

1 TUTKIMUKSEN LÄHTÖKOHDAT

Kaksi kolmasosaa maailman kasvilajeista luonnossa on vaarassa kuolla sukupuuttoon 2000-luvun aikana. Kasvilajeja uhkaa väestön kasvu, kulutuksen tuhoisa kehitys, maatalouden laajeneminen, metsien hävittäminen, kasvupaikkojen menetys, aavikoituminen, ilmaston muutos ja vieraiden, nopeasti leviävien rikkaruohojen leviäminen. (Global Strategy for Plant Conservation 2002, 3.) Botanic Gardens Conservation International julkaisi vuonna 2011 alppiruusujen punaisen listan. Heidän arvionsa mukaan 25 % kaikista luonnonvaraisista alppiruusuista on vaarassa kuolla sukupuuttoon. (Gibbs, Chamberlain & Argent 2011, 4.)

Monimuotoisuutta tarvitaan muun muassa uusien lajikkeiden kehittelyyn, jotta kasvit selviäisivät muuttuvassa ilmastossamme. Kasvien monimuotoisuus säilyy ja kehittyy parhaiten, kun uudet kasvit saavat alkunsa suvullisen lisääntymisen seurauksena siemenistä. Silloin perinnöllinen vaihtelu on mahdollista. Siemenpankkien tavoite on säilyttää lajien monimuotoisuus mahdollisimman suurena. Siemeniä pitkäaikaissäilytetään mm. nestetyössä.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää nestetyyppipakastusmenetelmä suomalaisten alppiruusujen siitepölyn ja siementen pitkäaikaissäilytykseen. Alppiruusuja on jalostettu Suomessa vuodesta 1973. Jalostusohjelman tavoitteena oli Suomen talvet kestävä alppiruusulajikkeisto. Alppiruusut valittiin jalostuksen kohteeksi, koska ainavihantien kasvien tarve suomalaisissa puutarhoissa ja puistoissa oli suuri. (Ks. Uosukainen & Tigerstedt 1988.)

Tutkimuksen toimeksiantaja, Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT), on Suomen johtava maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maata-

louden ympäristötutkimusta tekevä laitos. Yksi MTT:n tavoitteista on turvata suomalainen kasviperimä.

Tämä tutkimus edistää alppirusupopulaation säilyvyyttä. Lajit säilytetään populaatioina geneettisen vaihtelun säilyttämiseksi. Vrt. kloonatut kasvit, joissa säilyy vain yhden yksilön perimä. MTT Laukaassa säilytetään kaupalliset, kloonatut alppirusulajikkeet solukkoviljelminä. Alppirusupopulaatioiden pitkäaikaissäilyttäminen solukkoviljelminä ei ole taloudellisesti mahdollista, mutta nestetyypessä geneettisen vaihtelun säilyttäminen siemeninä ja siitepölynä saattaisi onnistua pienempien ylläpitokustannusten vuoksi.

Suomessa kasvatetuista alppirusulajikkeista maailmanlaajuisesti merkittävä on mustilanalppirusu. Se on erittäin talvenkestävä, ja sitä on käytetty useimpien Suomessa jalostettujen alppirusujen äitikasvina. Alkuperäiset, 80 vuotta sitten Koreasta Suomeen lähetetyistä siemenistä kasvatetut yksilöt kasvavat edelleen Mustilan arboretumissa. Niiden siitepölyä ja siemeniä on nyt tarkoitus saada pitkäaikaissäilytykseen. Kenttäsäilytyksessä pensaat ovat alttiita myrskyille ja muille luonnonmullistuksille, vaikka kestäviä ovatkin.

Siitepölyn nestetyypipakastusta ei ole tietävästi ennen kokeiltu Suomessa. Siitepölyn pitkäaikaissäilyttäminen auttaa jalostuksen ongelmassa, kuten kukinnan eriaikaisuudessa ja hybridien jalostuksessa. Siitepölyä ja siemeniä muodostuu eri vuosina vaihtelevia määriä, myös laatueroja on vuosittain. Hyvänä vuonna pakastettua siitepölyä voidaan käyttää jalostukseen vuosien päästä. Tällä hetkellä siitepölyä ei kerätä ja varastoida ”pankkeihin”, kuten siemeniä, ei edes ylläpitoa tai jalostustyötä varten.

Mustikan siementen kryopakastusta on kokeiltu Oulun yliopistossa (Zoratti, Jaakola, Edesi & Häggman 2011). Ulkomaisista julkaisuista löytynyttä tietoa on yhdistelty ja sovellettu tämän tutkimuksen tarpeeseen sopivaksi.

2 KASVIGEENIVAROJEN SUOJELU

2.1 Geneettisen monimuotoisuuden säilyttäminen

Geenipankit ovat keinoja palauttaa tärkeitä kasvilajeja, jos ne menetetään jonkin tapahtuman, kuten luonnonkatastrofin, takia. Nykyaikaisessa maanviljelyssä käytetään pitkälle kehittynyttä kasvivalikoimaa, jonka perustana ovat eniten tuottavat genotyypit. Viljeltyjen lajikkeiden välinen perinnöllinen vaihtelu on nykyisin hyvin suppeaa. Satoisat, nykyaikaiset viljelykasvit ovat siten alttiita uusille taudeille. Alkuperäiset maatiaiskannat ja villit lajit tuottavat vähemmän, mutta niiden suurempi geneettinen vaihtelu sisältää suuremman monimuotoisuuden esim. vastustuskyvyssä sairauksia vastaan. (Ásgrímsson 2009.)

Seuraukset geneettiselle monimuotoisuudelle ovat vakavat, jos emme onnistu suojelemaan arvokkaita geenivaroja, erityisesti ilmaston muuttuessa merkittävästi. On elintärkeää, että sekä entisajan että uudet lajit säilytetään turvatuissa olosuhteissa. (Ásgrímsson 2009.)

Vuoden 1995 Suomen perustuslakiuudistuksen mukaan vastuu luonnosta ja sen monimuotoisuudesta, ympäristöstä ja kulttuuriperinnöstä kuuluu kaikille. Suomen kansallinen kasvigeenivaraohjelma käynnistettiin vuonna 2003 tehostamaan maa- ja metsätalouden geenivarojen suojelua Suomessa. Geenivaraohjelman tavoitteena on turvata tuleville sukupolville arvokas suomalainen kasviperimä osana biologista monimuotoisuutta. MTT vastaa ohjelman koordinaatiosta ja toimintaa seuraa ja kehittää maa- ja metsätalousministeriön asettama geenivaraneuvottelukunta. (Kasvigeenivaraohjelma 2008.) Tämä tutkimus tehtiin osana Suomen kansallista kasvigeenivaraohjelmaa.

MTT:n Geenivarojen kestävä käyttö -tutkimusohjelman tavoitteena on turvata alkuperäisten eläin- ja kasvigeenivarojen monimuotoisuus suomalaisessa maa- ja puutarhataloudessa sekä geenivarojen kestävä hyödyntäminen myös tulevaisuudessa. Geenivaroilla tarkoitetaan eliöiden, kuten viljelykasvien, kotieläinten ja viljelymaan mikrobien, perinnöllistä monimuotoisuutta, eri lajeja ja rotuja sekä lajinsisäistä muuntelua. Suomen maataloudelle ja kulttuuriperinnölle tärkeät geenivarat ovat vuosituhansien kuluessa sopeutuneet paikalliseen ilmastoon, maaperään ja maisemaan, mikä tekee niistä ainutlaatuisia. Geenivarojen kestävällä käytöllä ja suojelulla turvataan monimuotoisuuden saatavuus viljelijöiden, jalostuksen ja tutkimuksen tarpeisiin sekä tulevien sukupolvien käyttöön. Koska tulevaisuuden tarpeet ovat vaikeasti ennakoitavissa, on ylläpidettävä mahdollisimman monipuolista geeniainesta. (Geenivarojen kestävä käyttö 2009.)

2.2 Säilytysmenetelmät siemenille

Kasvigeenivarojen säilytyksessä tulee ottaa huomioon eri lajien lisääntymisbiologia, jotta kukin lajike, linja tai maatiaiskanta voidaan säilyttää geneettisesti aitona ja elinkykyisenä näytteenä. Myös varmuuskysymykset tulee ottaa huomioon säilytysmenetelmää valittaessa. (Kasvigeenivaraohjelma 2008.) Säilytys siemeninä on populaatioiden säilyvyyden kannalta eduksi.

Yleisimmin saatavilla olevat vaihtoehdot siementen säilytykselle ovat kylmiöt tai jäädytetyt varastot, pakastimet ja nestetyppiastiat. Valinta riippuu siementen määrästä, koosta ja valitusta lämpötilasta. Nestetyppisäilytys sopii parhaiten pienille siemenille, jotka sietävät kuivuutta. (Ababa, Jorge & Hanson 2010.)

Kryosäilytystä on onnistuneesti kokeiltu laajalle määrälle kuivuutta sietäviä siemeniä. Kryosäilytys on tulossa yhä laajemmin käyttöön myös kuivuudelle herkille (recalcitrant) siemenille ja *in vitro* -solukkoviljelmille. Kryosäilytys on vaihtoehto varmistaa kustannustehokkaasti ja turvallisesti geenivarojen pitkäaikaissäilytys. Aineisto säilytetään useimmiten nestemäisessä työssä (-196 °C). Kryosäilytyksen äärimmäisen alhaiset lämpötilat käytännöllisesti katsoen lopettavat solukoiden ja siementen aineenvaihdunnan säilytyksen aikana ja siten mahdollistavat pitkäaikaissäilytyksen. Säilytettävä aineisto on suojattu kontaminaatioilta. Kun siemenet on kerran varastoitu nestetyypeen, niitä voidaan säilyttää siellä ilman aikarajaa (Ababa, Jorge, Hanson & Panis 2011).

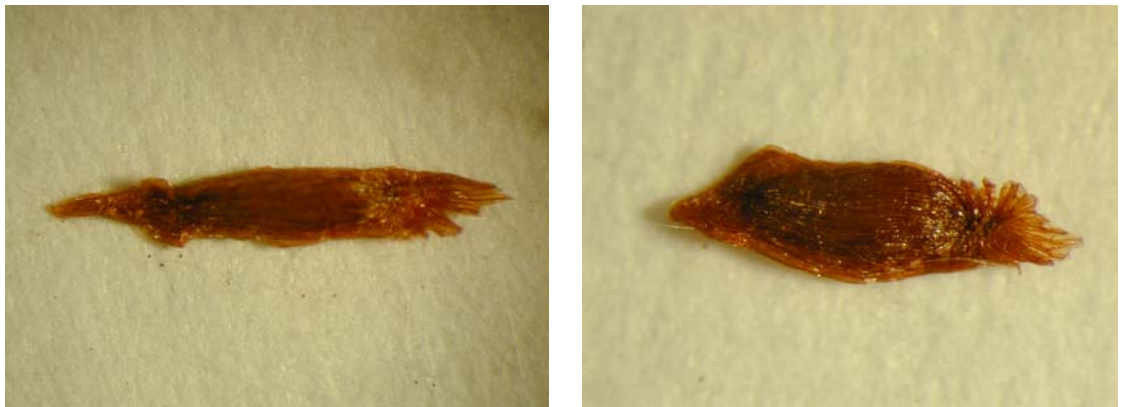
Kryosäilytys käyttää nestemäistä tyypeä eikä ole riippuvainen jäähdytyksestä tai jatkuvasta sähkönjakelusta. Se on kustannustehokasta, koska ei ole tarvetta säännölliseen kasvimateriaalin uudistamiseen, tilan tarve on rajallinen ja energiakulut ovat alhaisemmat. (Ababa ym. 2011.)

MTT Laukaassa on käytössä nestetyypeen kaasufaasisäilytys (alle -150 °C). Kryosäilytysmenetelmä luo MTT:lle edellytykset hoitaa sille asetetun velvoitteen säilyttää Suomen kasvigeenivarat kasvullisesti ja suvullisesti lisättävien puutarhakasvien osalta. Kryosäilytyksen avulla voidaan ylläpitää puutarhakasvien tuotannossa tarvittavaa monimuotoista lajistoa. Se mahdollistaa perinteisiä kenttäkokoelmia laajempien kokoelmien pitkäaikaissäilytyksen. Myös harvinaisten ja vain ajoittain kysytyjen lajikkeiden ylläpito ja taimituotannon nopea uudelleen käynnistäminen tarvittaessa on mahdollista. (Kylmäsäilytystekniikan soveltaminen kasvullisesti lisättävien kasvien geenivarojen pitkäaikaissäilytyksessä 2009.)

3 ALPPIRUUSUT

3.1 Alppiruusujen siemenet

Alppiruusut tekevät runsaasti siemeniä, joiden itämisprosentti on suuri. Siementen koko vaihtelee pienestä hyvin pieneen (ks. kuvio 1). Siementen keräämiseen paras aika on, kun siemenkota on muuttunut ruskeaksi tai mustaksi. (Ks. kuvio 2.) Useimpien lajien kodat kypsyvät ja avautuvat hitaasti. Alppiruusu varistaa siemenensä keväällä jo lumen pinnalle ja lumen sisään. Kevyet siemenet leviävät tuulten ja sulamisvesien mukana. (Cox 1993, 187–192.)



KUVIO 1. Siemenen koko on suurimmillaankin alle 3 mm. Kuvassa vasemmalla 'P. M. A. Tigerstedt' ja oikealla St. Michel sisarklooni 2.

Mitä suurempi siemen, sitä paremmin se säilyy. Alppiruusun siemenet säilyttävät itämiskykynsä joitakin vuosia huoneenlämmössä ja jääkaapissa. Kotipakastimessa siemenet voivat säilyttää itämiskykynsä kuusi vuotta. Siementen kuivattaminen parantaa säilyvyyttä. Jotta itäminen lähtisi alkuun siemenet tarvitsevat lämpöä 16–21°C, kosteutta ja kasvatusalustan. (Cox 1993, 192–195.)

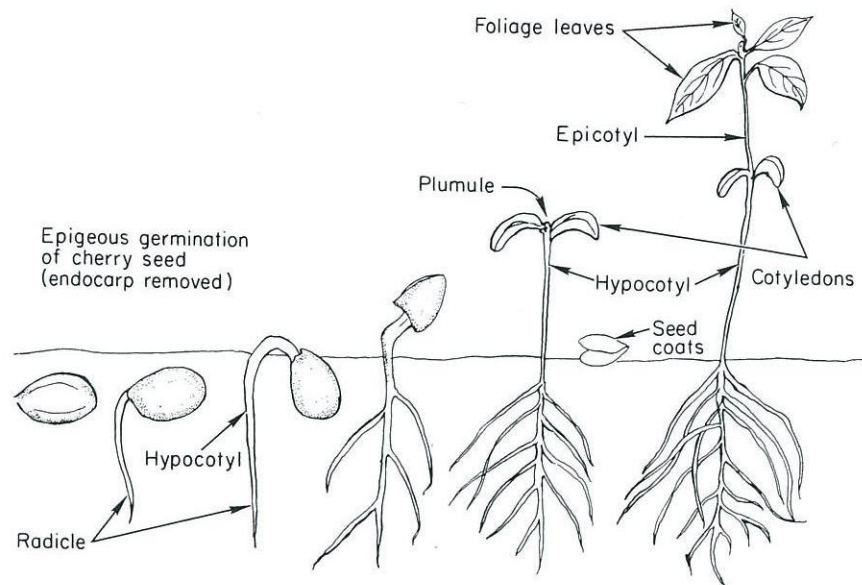


KUVIO 2. Lajikkeen 'Pekka' kuivuneita siemenkotia ja niistä varisseita siemeniä

Kuten monet muut suvut, alppiruusut ovat tavattoman monimuotoisia. Ne ristiinpölytyvät helposti lähellä olevien sopivien lajien ja hybridien kanssa. Monet suuret alppiruusut ovat itsesteriilejä. (Mts. 188.) Itsepölytyksellä syntyneet siemenet itävät huonosti ja siemenet kärsivät itsesiitoksen aiheuttamasta elinkyvyn heikkenemisestä. Itsepölytyneet siemenet kasvattavat usein albiinosirkkalehdet eivätkä lainkaan kärkisilmua. Jos on huono pölytysvuosi, myös siemenet kehittyvät huonosti. (Uosukainen 2011.)

Alppiruusun siemenen itämistapa on epigeeminen itäminen (ks. kuvio 3). Tässä itämistavassa sirkkalehdet nousevat maanpinnalle. Vrt. hypogeeinen, jossa sirkkalehdet jäävät siemenkuoren sisään maan alle. Ennen kuin itäminen voi alkaa, kolme edellytystä täytyy täytyä. Ensiksikin siemenen pitää olla elinkelpoinen. Siemenaiheen täytyy olla elossa ja itämiskykyinen. Toiseksi, siemenen sisäisten olojen täytyy olla suotuisat itämiselle. Itämisen fyysisten ja kemikaalisten esteiden on täytynyt hävitä. Kolmanneksi, siemenen täytyy altistua sopiville ympäristöolosuhteille. Oleelliset vaatimukset ovat vesi, sopiva lämpötila, happi ja joskus valo. Siemenen sisäiset olosuhteet voivat muuttua

ajan kanssa. Sen seurauksena myös ympäristölliset vaatimukset voivat muuttua, koska siemenen sisäinen tila voi vaikuttaa myös ulkoisiin vaatimuksiin. (Hartman & Kester 1975, 108–113.)



KUVIO 3. Siemenen epigeeisen itämisen vaiheet, (radicle) sirkkajuuri, (hypocotyl) hypokotyyli eli sirkkavarsi sirkkalehtien alapuolella, (plumule) kasvupiste, (seed coats) siemenkuoria, (cotyledons) sirkkalehdet, (epicotyl) epikotyyli eli sirkkavarsi sirkkalehtien yläpuolella, (foliage leaves) lehvistö. (Mts. 108–113.)

Itämisprosessin *ensimmäisessä vaiheessa* (herääminen tai aktivoituminen) vesi imeytyy kuivaan siemeneen. Siemenen kosteusprosentti nousee ensin nopeasti ja sitten vakiintuu. Siemen turpoaa ja siemenkuori saattaa haljeta. Koska veden imeytyminen on enimmäkseen fyysinen prosessi, se voi tapahtua myös elinkelvottomissa siemenissä. Itämisen *toiseen vaiheeseen* kuuluu kemiallisten yhdisteiden liukeneminen ja kulkeutuminen (translokaatio). Vedestä turvonneen alkion gibberelliini-hormonit (vain elävissä siemenissä) liukenevat ja siirtyvät siemenen aleuronikerrokseen. Siitä alkaa siemenen proteiinisynteesijärjestelmän toiminta. Muodostuu mm. uusia entsyymejä, joiden eräs tehtävä on

pilkkoa siemenen varastoravintoa (rasvat, proteiinit, hiilihydraatit) alkion kasvusolukon rakennusaineiksi. Hengitys ja veden otto jatkuvat siemenessä tasaisina. Itämisen *kolmas vaihe* koostuu solun jakautumisesta erillisiin kasvupisteisiin (ks. kuvio 3). (Mts. 108–113.)

Solujen laajentuminen ja sirkkajuuren ilmestyminen ovat itämisen ensimerkkejä. Alkion varsi kannattelee ylhäällä sirkkalehtiä ja alkiovarren alaosa kehittyy juuren kasvupisteeksi, sirkkajuureksi. Sirkkavarsi on jaettu kahteen osaan, sirkkalehtien yläpuoli on epikotyyli ja alapuoli hypokotyyli. (Mts. 108–113.)

3.2 Alppirusujen siitepöly



KUVIO 4. Stereomikroskooppikuva lajikkeen 'Mauritz' siitepölystä, 25x suurennos

Siitepöly on siitepölyhiukkasten muodostama hieno pöly. Alppirusujen siitepöly on väriltään vaaleaa (ks. kuvio 4). Siitepölyhiukkasissa on rihmoja (ks. kuvio 5), jotka tekevät niistä takertuvia.

Alppirusun siitepöly säilyttää itämiskykynsä kukintakauden ajan kotijääkaapissa samassa astiassa kuivattavan aineen kanssa. Pakastimessa alppirusun siitepölyn saa säilymään ainakin kaksi vuotta. (Cox 1993, 191.)



KUVIO 5. Tutkimusmikroskooppikuvat lajikkeen 'Mauritz' siitepölystä

4 KRYOSÄILYTYS

4.1 Siemenet

4.1.1 Kryokestävyysvaikuttavia tekijöitä

Useimpien yleisten viljely- ja puutarhakasvien siemeniä voidaan säilyttää nestetyypessä ilman suuria ongelmia. Siemenen koostumus vaikuttaa siemenen kryokäsittelyn sietokykyyn. Kosteuspitoisuuden tiedetään olevan tärkeä tekijä, samoin korkean lipidipitoisuuden (mm. rasvat). Parhaan tuloksen saavut-

tamiseksi kosteuspitoisuus on säädettävä jokaiselle lajille optimaaliseksi.

Yleensä se on 5–10 %, ja jäädytysnopeus riippuu lajista ja siemenen kosteuspitoisuudesta. Siementen jäädytys ja uudelleen lämmitys käyttäen äärimmäisiä lämpötiloja aiheuttavat siemenille suurta fyysistä rasitusta. Jos siemenen soluväliaineet kykenevät laajenemaan ja supistumaan jäädytyksen ja lämmityksen aiheuttamassa rasituksessa, fyysistä vauriota ei todennäköisesti esiinny. (Stanwood 1985, 217–224.)

Siemenen kosteuspitoisuus on kriittinen muuttuja, kun määritetään jäätymisnopeuden vaikutusta kryopakastuksessa. Vertucci tutki herneen (*Pisum sativum*), soijapavun (*Glycine max*) ja auringonkukan (*Helianthus annuus*) siemeniä kosteuttamalla niitä eri pitoisuuksiin ja jäädyttämällä niitä eri nopeuksilla. Vertucci totesi, että jäädytysnopeuden valintaan vaikuttaa paitsi siemenen kosteuspitoisuus myös sen lipidipitoisuus. Kuivuutta sietäville siemenille (orthodox), joilla on korkea lipidipitoisuus, sopii paremmin hidas jäädytys. (Vertucci 1989, 1478–1485.)

Kuivuutta sietäviä siemeniä (true orthodox) voidaan säilyttää pitkiä aikoja, kun siementen kosteuspitoisuus on 5–10 % ja lämpötila alle jäätymispisteen. Kuivuutta sietäviä siemeniä, joilla on korkea lipidipitoisuus tai ohut siemenkuori (sub-orthodox) voidaan säilyttää samoissa oloissa, mutta lyhyempiä aikoja. Lauhkean vyöhykkeen, kuivuudelle herkkiä siemeniä (temperate recalcitrant) ei voi kuivata ollenkaan, mutta niitä voidaan säilyttää 3–5 vuotta, kun lämpötila on lähellä jäätymispistettä. Trooppisen vyöhykkeen kuivuudelle herkkiä siemeniä (tropical recalcitrant) ei myöskään voi kuivata ja ne kuolevat alle 10–15 asteessa. (Bonner 1990, 35–43.)

Kaikki kuivuutta sietävät (orthodox) siemenet eivät ole sopivia kryosäilytykseen, kovakuoriset palkokasvin siemenet voivat haljeta tai pirstoutua ja jotkut siemenet, joilla on korkea öljypitoisuus, voivat menettää elinkykynsä. Kryo-

säilytys on myös kallis menetelmä suurten siementen, kuten maissin ja pavun, säilyttämiseen. (Ababa ym. 2011.) Alginaattikapselointi on havaittu hyödylliseksi sekä solukoille että siemenille kryosäilytyksessä. Kapselointi parantaa hyvin alhaisten lämpötilojen sietokykyä. (Kaviani 2010, 177–180.) Siementen kuivatuksessa on käytetty mm. silikageeliä (González-Benito, Aguilar & Ávila 2009, 143).

Kholinan ja Voronkovan tutkimuksessa tutkittiin 103 lajia, mukana oli mm. *Rhododendron aureum*. Tutkimuksessa oli mukana vain kuivuutta sietäviä siemeniä, joiden kosteuspitoisuus oli 5–10 %. Ennen koetta siemenet olivat laboratoriossa 20–25 asteessa 2–4 kuukautta, kunnes kosteustasapaino oli saavutettu. *Rhododendron aureum* iti paremmin nestetyypikäsittelyn jälkeen kuin kontrollisiemenet. Tutkijat arvelivat, että itämiserot kontrolleista suuntaan tai toiseen johtuivat sattumasta tai luontaisesta, piilevästä muuntelusta populaatioiden sisällä. (Kholina & Voronkova 2008, 262–269.)

Erityyppisille solukkoviljelmillekään ei ole yleispätevää kryokäytäntöä. Sen vuoksi jokainen kryosäilytyksen toimenpide pitää optimoida kullekin uudelle kasvimateriaalille, joka halutaan kryosäilyttää. (Ababa ym. 2011.) Tämä pätee myös siementen kryosäilytykseen.

4.1.2 Pintasterilointi

Nestetyypitankkiin laitettavan aineiston tulisi olla puhdasta bakteereista ja viruksista. Alppiruusujen taimien merkittävin tappaja on harmaahome (Cox 1990, 318). Pintasteriloinnilla estetään siementen pinnalla elävien mikrobien kasvu, mutta sisäisiin kontaminaatioihin pintasterilointi ei vaikuta.

Maailmalla siementen pintasterilointeja on tehty sekä ennen että jälkeen kryopakastuksen. Liljan [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] siemenille tehtiin pintaste-

riointeja siten, että ensin siemeniä huuhdeltiin hanaveden alla 20 minuuttia ja sitten 1 minuutti 70-prosenttisessa etanolissa. Sen jälkeen liotettiin joko 15 minuuttia 1-prosenttisessä tai 10 minuuttia 0,5-prosenttisessä natriumhypokloriitissa ja lopuksi huuhdeltiin kolme kertaa sterilillä vedellä. (Kaviani 2010, 178–179.) Sitruhedelmän siemeniä käsiteltiin ennen tai jälkeen kryopakastuksen siten, että niitä huuhdeltiin 2-prosenttisellä natriumhypokloriitilla 30 sekunnin ajan ja sen jälkeen huuhdeltiin kaksi kertaa vedellä (Hamilton, Ashmore & Pritchard 2009, 270; Pritchard & Nadarajan 2008, 496).

4.1.3 Kryopakastus

Nopeaa jäädytystä on käytetty ainakin sitruhedelmän (*Citrus*) ja tervalepän (*Alnus glutinosa*) siemenille. (Hamilton ym. 2009, 270; Chmielarz 2010, 141.)

Nopeaa jäädytystä on käytetty myös kapseloituille liljan [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] siemenille (Kaviani 2010, 178–179). Nopeassa jäädytyksessä kryoputki siemenineen upotetaan suoraan nestetyyppeen.

Kholina ja Voronkova tutkivat 103 lajin kuivuutta sietäviä siemeniä (orthodox). Ne käärittiin alumiinifolioon ja syväjäädytettiin upottamalla nopeasti nestemäiseen tyypeen kuukaudeksi. Tänä aikana kontrollisiemenet säilytettiin laboratoriossa 20–25 °C. (Kholina & Voronkova 2008, 263.)

4.1.4 Sulatus ja elpyminen

Nopeaa sulatusta on käytetty siten, että sitruhedelmän (*Citrus*) siemenet sisältävä kryoputki upotettiin heti 40 °C:n vesihauteeseen minuutiksi, liljan [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] siemenille käytettiin 37–38 °C vettä 3 minuuttia ja tervalepän (*Alnus glutinosa*) siemenille 40 °C 5 minuuttia. (Hamilton ym. 2009, 270; Kaviani 2010, 178–179; Chmielarz 2010, 141.)

Kaikilla kuivatuilla siemenillä on vaara vaurioitua rehydraatiossa itämisen alkuvaiheessa. Vauriot vältetään parhaiten kosteuttamalla siemenet välttämättä välitöntä kosketusta veteen. Vaurioita havaitaan useimmin silloin, kun kuivatut siemenet laitetaan veteen, verrattuna siihen, että siemenet laitetaan kostutetun suodatinpaperin päälle tai vesiagariin. (Pritchard & Nadarajan 2008, 490.)

Kholinan ja Voronkovan tutkimuksessa kylmäsäilytyksen jälkeen siementen annettiin lämmitä huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Siemenet idätettiin kostutetun imupaperin päällä petrimaljalla kasvatushuoneessa, joka oli lämpösäädeltä ja jonka valojakso oli 16:8 (valo—pimeys). Lämpötila kaikille lajeille oli vähintään 18 °C, koska jokaisen lajin parasta itämislämpötilaa ei tunnettu. (Kholina & Voronkova 2008, 263.)

Liljan [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] siemenille Kaviani kokeili Murashige & Skoog -kasvualustaa. Kasvualusta sisälsi suoloja ja vitamiineja, mutta ei hormoneja. Valojakso oli (valo/pimeys) 16/8 tuntia ja päivä/yö lämpötilat 25/20 °C. (Kaviani 2010, 178—179.)

Tervalepän (*Alnus glutinosa*) kuivuutta sietävät (orthodox) siemenet katsottiin itäneiksi, kun niiden sirkkajuuri oli puolet siemenen pituudesta. Siemenet idätettiin 20 asteen lämmössä ja valojakso oli 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeyttä. (Chmielarz 2010, 141.)

4.2 Siitepöly

Siitepölyn laadulla on merkitystä sen elinkyvyn kannalta. Siitepöly, joka kerätään ennen kukkien avautumista tai hyvin myöhään sen jälkeen, ei säily hyvin. Kuumuudesta tai kuivuudesta kärsivät kasvit tuottavat usein siitepölyä, jolla on alhainen hedelmällisyys. Lajeilla, joilla on kuivuudelle herkät siemenet, voi olla kuivuutta sietävä siitepöly tai toisin päin. Kuivuutta sietävä siitepöly voidaan kuivata alhaiselle kosteustasolle (5–10 % tuorepainosta) kyllästetyllä suolaliuoksella tai ilmakeivatuksella. (Towill 2002, 7.)

Alppiruusun siitepölyn kryopakastukseen ei suoraan löydy menettelyohjetta kirjallisuudesta. Alppiruusun siitepöly on kerättävä nupuista, koska siitepöly on heti valmista ja silloin pölyttäjähönteiset eivät ole vielä sotkeneet siitepölyjä. Marchant, Power, Davey, Chartier-Hollis ja Lynch tutkivat ruusun ('Heritage' ja 'The Countryman') siitepölyn nestetyppisäilytystä. He keräsivät siitepölyn nupuista. Kukkatertut poimittiin, kun nuput olivat levittäytyneet kukkatertussa ja saavuttaneet lopullisen värinsä, mutta niiden terälehdet olivat vielä kiinni. Keräämisaika on silloin optimaalinen, koska siitepöly on juuri sopivasti kehittynyttä ja pölyttäjähönteiset eivät ole päässeet sotkemaan siitepölyjä. Siitepöly saatiin irtoamaan ponsista ravistamalla niitä kryoputkien sisällä koeputkiravistelijalla 30 sekuntia ja sen jälkeen ponnet kerättiin pois. Siitepölylle kokeiltiin sekä nopeaa että hidasta jäädytystä. Näytteitä sulatettiin kahden minuutin ajan +45 asteisessä steriilissä vedessä. Siitepöly katsottiin eläväksi, kun siiteputken pituus ylitti siitepölyhiukkasen koon. (Marchant, Power, Davey, Chartier-Hollis & Lynch 1993, 235–241.)

Trooppisten orkideoiden (*Tropical Orchids*) siitepölylle käytettiin nopeaa sulatusta 40 °C vedessä. Itävyys määritettiin kasvattamalla siitepölyä kuoppalevyllä 24±2 asteessa 12–24 tuntia. (Anonymous 2006, 457–458.)

5 TUTKIMUKSEN MATERIAALIT

5.1 Tutkittujen siementen lajikkeet ja jalosteet

Tutkitut alppiruusulajikkeet olivat 'Haaga', 'P.M.A. Tigerstedt', 'Pekka' sekä jalosteet St. Michel sisarkloonit 1 ja 2 sekä Haaga sisarkloonit 1, 2 ja 3. (Ks. liite 1.) Sisarkloonit ovat lajikkeen sisaryksilöistä suvuttomasti lisättyjä taimia. Sisaryksilöt ovat muodostuneet risteytysjalostusohjelman tuloksena. Ne on pölytetty käsin samoista vanhemmista. Esimerkiksi 'Haagan' kohdalla yksi sisaryksilö on valittu aidoksi 'Haagaksi' ja loput jäivät jalosteiksi. (Uosukainen & Tigerstedt 1988, 235–254.)

Tutkimuksessa käytetyt siemenet ovat vapaapölytteisiä eli pölyttäneyttä yksilöä ei tunneta. Siemenaineiston ei tarvinnut olla tässä tutkimuksessa lajikepuhdasta, koska näitä siemeniä ei jätetty nestetyypitankkiin pitkäaikaissäilytykseen vaan nyt vasta etsittiin toimivaa menetelmää.

5.2 Tutkittujen siitepölyjen lajikkeet ja jalosteet

Tutkitut alppiruusulajikkeet olivat 'Kaino', 'Vieno', 'Venla', 'Axel Tigerstedt', 'St. Michel', 'P.M.A. Tigerstedt', 'Pohjola's Dauhgter', 'Helsinki University', 'Haaga', 'Elviira', 'Mauritz', 'Suvi', 'Hellikki', 'Pekka', 'Raisa' ja R. Williamianum-risteymä (TTA-762). Siitepölyä saatiin myös jalosteista, jotka eivät ole myynnissä: TTA-590, TTA-591 ja KA-24. (Ks. liite 1.)

6 TUTKIMUKSEN MENETELMÄT

6.1 Siemenet

6.1.1 Siementen kerääminen ja kuivatus

Siemenaineisto kerättiin MTT Laukaan pihapiiristä maaliskuun alussa 2011. Silloin oli niin paljon lunta, että siementen kerääminen ei onnistunut Mustilasta, jossa lajikkeita ja jalosteita olisi ollut enemmän. Siemenet kerättiin niistä oksista joihin yletyttiin. Osa oksista oli talvehtinut lumen alla. Siemenkodat olivat jo osittain auenneet ja siemeniä oli varissut lumelle.

Siemeniä kuivatettiin huoneenlämmössä. Siemenkodat aukesivat täysin auki niinkin nopeasti kuin tunnissa sisälle tuonnin jälkeen. Huoneen lämpötila oli noin 20 astetta ja se kohosi kevään ja ilman lämpenemisen myötä. Siemenet olivat kuivuneet myös ulkona talven ajan. Talvella 2011 pakkasta oli ainakin 4 kuukautta. Pakkanen kävi -25 °C:ssa ja tuuli navakasti, jolla on myös kuivattava vaikutus. Kun nestetyypitestejä tehtiin kesäkuussa, kuivatustilan lämpötila oli kohonnut lähelle 30:tä astetta.

6.1.2 Siementen kosteuspitoisuuden määrittäminen

Siementen kosteuspitoisuuden määrittäminen oli aiheellista, koska se vaikutti menetelmien valintaan. Siementen kosteuspitoisuus oli mahdollista mitata, muuta koostumusta (rasvat, lipidit, triglyseridit) ei. Kosteuspitoisuus mitattiin 2–3 viikkoa huoneilmassa kuivuneista siemenistä sekä neljä kuukautta kuivuneista siemenistä. Mitattavat lajikkeet olivat 'P.M.A. Tigerstedt' ja 'Haaga' sekä jalosteet St. Michel sisarkloonit 1 ja 2 ja Haaga sisarkloonit 1 ja 3.

Lämpökaapissa etukäteen olleet pienet petrimaljat jäähdytettiin isojen petrimaljojen sisällä silikageelin päällä puoli tuntia ennen punnitusta. Sen jälkeen siemenet laitettiin maljoille ja maljat siemenineen punnittiin uudelleen. Siemenet kuivatettiin lämpökaapissa 103 °C:ssa 18±1 tuntia. Kuivatuksen jälkeen näytteet petrimaljoineen taas jäähdytettiin silikageelin päällä puoli tuntia ennen punnitusta. Kuivatus, kolme tuntia, ja punnitus toistettiin, jotta nähtiin, ettei kosteutta enää haihtunut. Punnitustuloksista laskettiin näytteen kosteuspitoisuus kaavalla.

$[(a - b) / a] \times 100 =$ kosteuspitoisuus massaprosentteina tuoreen näytteen painosta, jossa

a = näytteen massa ennen kuivausta

b = näytteen massa kuivauksen jälkeen.

(Hamilton ym. 2009, 270.; Eskeli, Hamara, Laukkanen, Lehtonen, Luoto, Viuhavainen & Ylihärtilä.)

6.1.3 Itävyystesti ja kasvatusalusta

Oletus, josta lähdettiin liikkeelle, oli, että siemenet itävät turveseoksessa kahdessa viikossa (Uosukainen 2011). Kaikkien kerättyjen lajikkeiden ja jalosteiden siemenille tehtiin ensimmäiseksi itämistesti turpeella. Jokaisesta lajikkeesta ja jalosteesta kylvettiin 25 siementä neljään pieneen muovipurkkiin Kekkilän havu- ja rodomultaan. Siemenistä valikoitiin suurimpia. Pienet siemenet oli varsin hankala saada lajiteltua ja laskettua. Jopa multaisissa purkeissa siemenet tarttuivat helposti purkin kylkiin ja kanteen.

Neljän viikon kuluttua laskettiin siementen itävyys. Itäneiksi laskettiin sirkka-lehdelliset taimet. Kärkisilmua ei ollut siinä vaiheessa havaittavissa kuin muutamassa taimessa. Purkeissa kasvoi myös hometta, ei paljon, mutta sekin saat-

toi vaikuttaa siementen itävyyteen. Home voi tosin olla itse siemenissä, eli siemenet eivät itäisi luonnossakaan. Hometta poistettiin purkeista pinseteillä nyppien 4 viikon kasvatuksen jälkeen eikä se kasvanut häiritseväksi uudelleen. Turpeella tasaisimmin ja eniten itivät lajike 'Haaga', ja jalosteet Haaga sisarklooni 1 ja St. Michel sisarklooni 2. Kuuden viikon jälkeen laskettiin taimettuneet eli kärkisilmulliset taimet. Eniten kärkisilmuja oli lajikkeissa 'Haaga' ja 'Pekka' sekä jalosteissa Haaga sisarklooni 2 ja St. Michel sisarklooni 2. Varsinaiseksi koeaineistoksi valittiin 'Haaga', Haaga sisarklooni 1 ja St. Michel sisarklooni 2, jotka itivät parhaiten ensimmäisessä testissä.

Nopeamman itämistuloksen saavuttamiseksi kokeiltiin siementen idätykseen eri kasvualustoja. Kasvualustoista kokeiltiin hormonitonta Murashige & Skoog -kasvualustaa (ks. liite 2) ja kostutettua imupaperia petrimaljalla. Petrimalja suljettiin parafilmillä kosteuden haihtumisen ja ulkoa tulevien kontaminaatioiden estämiseksi. Imupapereita oli kokeilussa kahdenlaisia. (MN615, halkaisija 90 mm ja MN617, für Qualitative Analysen, halkaisija 12,5 cm, Macherey-Nagel, Germany) MS-ravintoalusta sisälsi suoloja ja vitamiineja sekä 3 % sakkaroosia ja 0,8 % agaria (Kaviani 2010, 179). MS-alustalla kasvoi niin paljon hometta, etteivät siemenet itäneet siinä lainkaan. Ilmeni siis tarve siementen pintasteriloinnille.

6.1.4 Pintasterilointi

Ensimmäisissä itävyytstesteissä esiintyi kaikilla kasvatusalustoilla (turve, MS, imupaperi) kontaminaatioita, luultavimmin homeita. Kokeellisesti todettiin, että siementen lisäksi myös homeet selviävät typpikäsittelystä. Yksitoista päivää ensimmäisten typpikäsittelykokeilujen jälkeen voitiin todeta, että osa siemenistä iti ja osan pinnalla kasvoi homeita. Sen vuoksi oli tarpeellista etsiä siemenille sopiva pintasterilointimenetelmä. Kirjallisuustietojen perusteella tiedettiin, että pintasteriloinnin voi tehdä ennen tai jälkeen kryopakastuksen.

Tässä tutkimuksessa pintasterilointi ennen pakastusta todettiin toimivaksi. Pakastuksen jälkeistä pintasterilointia ei testattu.

Sterilointivälineinä kokeiltiin puolipallon mallista teesihtiä, jota on käytetty MTT:ssä muun kasviaineiston pintasteriloinnissa. Testattiin steriiliä (MN615) imupaperia teesihdin sisällä. Sitten kokeiltiin nopeammin läpäisevää imupaperia (MN617) lasisuppilossa. Kokeiltiin myös Moka express - espressokeittimen eli ”mutteripannun” suodatinosaa sekä alumiinista että ruostumattomasta teräksestä valmistettua.

Pintasterilointiliuoksia ja niiden väkevyyksiä kokeiltiin aikaisempien julkaisujen perusteella. Liuoksista testattiin 70-prosenttinen etanoli, 1- ja 0,5-prosenttinen natriumhypokloriitti ja huuhteluihin steriili vesi.

Liuoksia kokeiltiin siten, että ensin tavoitteena oli 70-prosenttisessa etanolissa 1 minuutti, 1-prosenttisessa natriumhypokloriitissa 15 min ja lopuksi 3 huuhtelua steriilillä vedellä. Välineiden hankaluuden vuoksi todelliset ajat kuitenkin olivat etanolissa 4 minuuttia, natriumhypokloriitissa 16 min ja vedessä 6 min.

Seuraavaksi kokeiltiin lyhyempiä vaikutusaikoja ja liuoksista 70-prosenttista etanolia, 0,5-prosenttista natriumhypokloriittia ja steriiliä vettä. Etanolissa siemeniä liotettiin 1 minuutti ja natriumhypokloriitissa 4,5 minuuttia ja vesihuuhteluja tehtiin 4. Kokeiltiin myös liotusta etanolissa 1 minuutti ja natriumhypokloriitissa 2 minuuttia ja vesihuuhteluja tehtiin 3.

Tutkittiin sterilointiliuosten eri järjestyksen vaikutusta. Etanolikäsittely jätettiin viimeiseksi, koska veden imeytyminen siemeneen haittaa elpymistä nestetyypipakastuksen jälkeen. Siemeniä liotettiin 0,5-prosenttisessa natriumhypo-

kloriitissa 1,2 minuuttia, huuhdeltiin vedellä 3 kertaa ja liotettiin 70-prosenttisessa etanolissa 1 minuutti.

Vesihuuhtelua kokeiltiin eri tavoin. Kokeiltiin siementen upottamista kolmeen eri petrimaljaan, joissa oli vettä, kokeiltiin siementen vesihuuhtelua pipetillä sekä näiden yhdistelmää.

Pintasterilointia kokeiltiin erikokoisille siemenerille: 25, 100 ja 300 siementä. Pintasterilointi ei ollut tilastollisesti seurattava tieto. Sen vuoksi päädyttiin pintasteriloimaan jokaisen jalosteen ja lajikkeen siemenet yhdellä kertaa ja vasta steriloinnin jälkeen siemenet jaettiin eriin.

Esikokeiden pintasteriloinnit onnistuivat paremmin kuin varsinaisen koeaineiston ensimmäinen erä. Eroina olivat siementen pidempi säilytysaika huonetilassa ja kerralla steriloitavien siementen määrä. Mahdollisia syitä ovat virhe työskentelytavoissa ja sterilointiliuosten vanheneminen tai kontaminoituminen. Arvelen, että pintasteriloinnissa käytetyn 1-prosenttisen natriumhypokloriitin teho oli heikentynyt. *Chaetomium*-suvun homeita ilmeni kahdessa maljassa 18:sta niissä erissä, jotka tehtiin kaksi kuukautta vanhalla liuoksella. Tulosten mukaan home ei vaikuttanut tuloksiin. Liuokset uusittiin ja kokeita tehtiin lisää eikä kontaminaatioita enää ilmennyt. Tämän menetelmäheikkouden perusteella päädyttiin siihen, että jatkossa kokeet tehdään tuoreilla liuoksilla.

Natriumhypokloriitti hajoaa melko nopeasti neutraaleissa ja happamissa oloissa, lämpötilan noustessa yli 20 °C ja valon vaikutuksesta. Tuote hajoaa hitaasti myös itsestään. 10-prosenttisen natriumhypokloriitin pH on noin 12–14 ja se alkaa hajota pH:ssa 11. (OVA-ohje natriumhypokloriitti 2011.) Kesän aikana lämpötilat olivat laboratorioissa lähellä 30 °C ja pulloa säilytettiin tiskipöydällä, johon tulee myös auringon valoa.

6.1.5 Kryopakastus

Kryoputket ovat muovia ja staattisesti sähköisiä. Siemenet tarttuivat putken seinämiin ja olivat hankalia siirrettäviä. Sen vuoksi siementen kääriminen folioon ennen kryoputkeen (Cryopure Tubes, 1,8 ml, Sarstedt) laittamista oli tarpeen. Folion käsittely oli haasteellista, koska sen piti olla juuri sopivan kokoinen mahtuakseen kryoputkeen ja koska siemenet lennähtelivät herkästi pois folion päältä sekä laitettaessa että pois otettaessa. Foliopaloille kokeiltiin erilaisia kokoja ja muotoja. Neliskanttiseen tehtiin taitokset kulmasta kulmaan ja taivutettiin ”kupin” muotoiseksi. Se suljettiin pussin muotoon rutistamalla yläosa kiinni. Suorakaiteen muotoinen folio taiteltiin kolmeen osaan kumpaankin suuntaan ja suljettiin taitosten mukaan. Foliot steriloitiin lämpökäpissa.

Kirjallisuudesta tiedettiin, että siementen jäädyttämiseen voi käyttää nopeaa tai hidasta jäädyttämistä. Tässä työssä kokeiltiin ensin nopeaa jäädytystä eli kryoputket upotettiin suoraan nestetyyppeen eikä tarvetta hitaalle jäädyttämiselle ilmennyt. Kryosäilytyksessä käytetyt putket merkittiin siihen tarkoitettulla tussilla (Sarstedt). Putkia pidettiin nestetyypessä noin tunti, jonka jälkeen ne sulatettiin. Käytännön syistä tunti on hyvä aika.

6.1.6 Sulatus ja elpyminen

Julkaisujen perusteella tiedettiin, että siemenille on käytetty nopeaa ja hidasta sulatusta. Tässä tutkimuksessa käytettiin nopeaa sulatusta. Putket sulatettiin 40 °C:ssa vesihauteessa 1–3 minuuttia. Putken pohjat saatiin pysymään veden alla käyttämällä putkitelinettä. Putket kuivattiin ja pyyhittiin 75-prosenttisellä etanolilla ennen aukaisua steriilitilassa.

Esikokeissa alustoina käytettiin MS-ravintoalustaa sekä kahta erilaista steriiliä imupaperia petrimaljalla. Maljat suljettiin parafilmillä. Esikokeiden perusteella siemenille, joista kryokäsittelyn tulos laskettiin, valittiin idätykseen imupaperi ja itämistä seurattiin viisi viikkoa.

Siementen kasvua pyrittiin nopeuttamaan kasvatushuoneen olosuhteita muuttamalla. Idätysaikaiset lämpötilat olivat (päivä/yö) 20,5/18 °C ja valojakso vuorokaudessa oli (valo/pimeä) 16/8 tuntia.

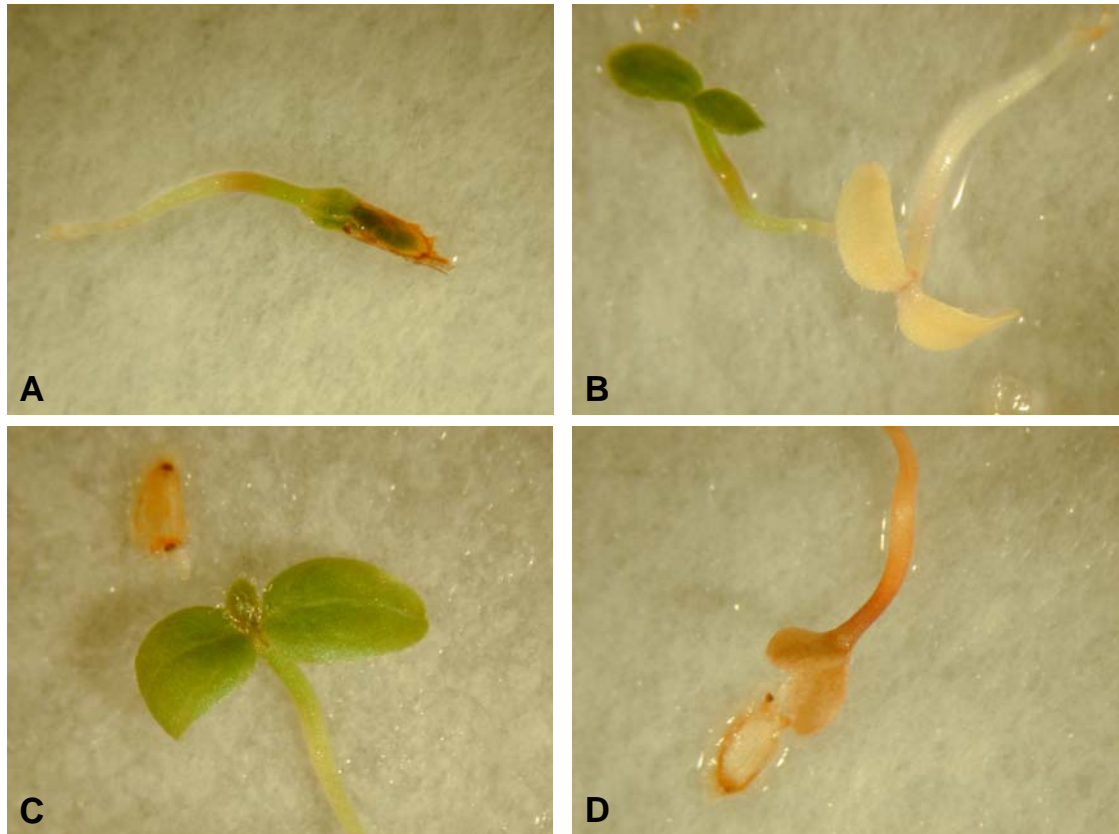
6.1.7 Havainnointi

Kryokäsittelyn tulokset laskettiin kolmesta lajikkeesta ja jalosteesta. Yksi lajike tai jaloste käsiteltiin yhtenä päivänä. Koska pintasterilointi ei ollut tavoitteen kannalta seurattava tekijä, kontrollisiemenet ja nestetypessä käyvät pintasteriloitiin yhtä aikaa ja sen jälkeen jaettiin kolmeen kontrollierään ja kolmeen testierään. Jokainen erä oli 50 siementä.

Itävyyttä ja taimettumista seurattiin viikon välein. Seuraaminen aloitettiin, kun siemenet olivat olleet idätysalustalla kaksi viikkoa. Seurattavia asioita olivat sirkkajuuren puhkeaminen, sirkkalehtien avautuminen, albiinosirkkalehdelliset, kärkisilmun ilmestyminen ja ruskeat ja kuolleet sirkkataimet. Siemeniä, joissa ei näkynyt elämää, ei laskettu erikseen. (Ks. kuvio 6.)

Useissa julkaisuissa siemen katsottiin itäneeksi sirkkajuuren ollessa puolet siemenen pituudesta. Koska alppirusun itämistapa on epigeeinen, tässä tutkimuksessa siemen katsottiin itäneeksi vasta kun sirkkalehdet olivat avautuneet. Taimettuneella siemenellä oli havaittavissa kärkisilmu sirkkalehtien välissä. Osalla sirkkalehdet kasvoivat alaspäin, jolloin pienen kärkisilmun havaitseminen oli mahdotonta avaamatta maljaa. Maljoja ei avattu, vaan odotettiin kärkisilmun kasvavan niin suureksi, että havainnointi onnistui. Albiinoik-

si katsottiin valkoiset sirkkalehdet. Jos lehdissä oli yhtään lehtivihreää, siemen katsottiin itäneeksi. Ruskeiksi ja kuolleiksi katsottiin itäneet siementaimet, jotka olivat selvästi ruskettuneet.



KUVIO 6. Siemenen itämisen vaiheita: (A) sirkkajuuri, (B) vihreät sirkkalehdet ja albiinosirkkalehdet, (C) kasvupiste sekä (D) ruskea ja kuollut sirkkataimi.

6.2 Siitepöly

6.2.1 Siitepölyn kerääminen

Tutkimuksessa käytetty siitepöly kerättiin maaliskuusta—huhtikuussa 2011 MTT Laukaan kasvihuoneilta, ydintaimista sekä myyntiin menevistä valiotaimista. Kasvihuoneissa kasvu on huomattavasti edellä luonnossa tapahtuvaa kasvua.

Kukkatertut poimittiin, kun nuput olivat levittäytyneet kukkatertussa, mutta terälehdet olivat vielä kiinni. Teriöt irrotettiin ensin tieltä pois, jotta päästiin käsiksi heteisiin. Ponnit irrotettiin heteistä pinseteillä (ks. kuvio 7).



KUVIO 7. Kukkaterttuja ja niistä irrotettuja ponsia purkeissa

6.2.2 Itävyystesti

Valmista kirjallista tietoa olosuhteista, joissa alppiruusun siitepöly itää, ei ollut. Oletus oli, että siitepöly itää vesipisarassa parissa tunnissa (Uosukainen 2011). Kaikki idätystestit tehtiin huoneenlämmössä, noin 20 °C:ssa. Siitepöly katsottiin eläväksi, kun siiteputken pituus ylitti siitepölyhiukkasen koon.

Idättämiseen kokeiltiin ritarinkannukselle (*Delphinium*) hyväksi havaittua kasvualustaa. Alusta oli 1-prosenttinen vesiagar, jossa on 15 % sakkaroosia ja 0,0075 % boorihappoa. (Honda, Watanabe & Tsutsui 2002, 316.) Alusta oli valettu maljoille ja kiinteään agarin päälle erottui ohut nestemäinen kerros. Kokeiltiin myös sokkona muista töistä ylimääräiseksi jäänyttä kasvualustaa.

Alusta oli nestemäinen ja pohjautui G-suoloihin (Uosukainen 1992, 804). Lisänä alustassa oli auksiini ja sytokiiniini -kasvihormoneja, fruktoosia ja vitamiineja. Tutkijoiden Ganeshan, Rajasekharan, Shashikumar ja Decruze (2008, 451–454) kokoaman tekstin mukaan siitepölylle kokeiltiin myös sitruunan (*Citrus limon*), miekkaliljan (*Gladiolus*) ja ruusun (*Rose*) nestemäisiä kasvualustoja (ks. liite 3).

Siitepölyn idättämistä kokeiltiin erilaisissa astioissa. Idättämistä kokeiltiin onkalomikroskooppilevyllä (1 mm), pienellä petrimaljalla ja kellolasilla. Testaamalla etsittiin sopivaa elatusaineen määrää astioissa. Kokeiltiin myös eri tekniikoita liuoksen kaatamiseen, suoraan pullosta ja pipetillä.

6.2.3 Kuivatus ja irrottaminen ponsista

Ponsia siitepölyineen säilytettiin ja kuivatettiin pienissä muovipurkeissa huoneenlämmössä. Päällä oli harso, joka suojasi aineistoa pölyltä ja mahdollisilta hyönteisiltä (ks. kuvio 7). Huoneen lämpötila oli yli 20.

Siitepölyn irrottamista ponsista kokeiltiin kahdella tavalla, pinsettien ja kirurginveitsen avulla sekä koeputkiravistelijalla kryoputken sisällä. Pinsetit steriloitiin 75-prosenttisessä etanolissa lajikkeiden vaihtuessa. Testattiin myös siitepölyn eri määriä kryoputkissa, 6 pontta tai enemmän.

6.2.4 Kryopakastus

Siitepöly pakastettiin kryoputkissa (Cryopure Tubes, 1,8 ml, Sarstedt). Kryoputkista eroteltiin kontrollinäyte kahden pinsetin avulla. Loppu näytteestä jäi putkeen ja kävi nestetyössä tunnin verran. Julkaisuista tiedettiin, että siitepölylle on kokeiltu sekä nopeaa että hidasta jäädytystä. Nopea jäädytys toimi, joten hidasta ei tarvinnut kokeilla.

6.2.5 Sulatus ja elpyminen

Nestetypestä näytteet siirrettiin 40 °C:iseen veteen lämpöhauteeseen. Näytteet olivat hauteessa 1,5–3 minuuttia. Kryoputket kuivattiin paperilla. Työskentely ei ollut steriiliä.

Typpikäsittelyn jälkeen näytteet ja kontrollit siirrettiin pienille petrimaljoille. Elatusaine lisättiin kaikkiin maljoihin samaan aikaan. Siitepölyn elpymistä nestetyppikäsittelystä havainnoitiin mikroskoopilla seuraavina päivinä.

7 TUTKIMUKSEN TULOKSET

7.1 Siemenet

7.1.1 Kosteuspitoisuuden määrittäminen

Siemenkotien avautumisen jälkeen (2–3 viikkoa keräämisen jälkeen) mitattiin siementen kosteuspitoisuus. Kosteuspitoisuudeksi saatiin 5,8–6,2 % lajikkeella 'P.M.A. Tigerstedt' ja jalosteilla St. Michel sisarklooni 1 ja Haaga sisarklooni 3. Huonelämpötila oli tuolloin 21 °C.

Varsinaisessa koeaineistossa käytettyjen lajikkeiden ja jalosteiden kosteuspitoisuudet mitattiin neljä kuukautta keräämisen jälkeen. Huoneilmassa säilytettyjen siementen kosteuspitoisuudet olivat 7,5–8,1 % (ks. taulukko 1.)

TAULUKKO 1. Varsinaisen koeaineiston siementen kuivatusajat ja määritetyt kosteuspitoisuudet

Lajike / jaloste	Kuivatus kk	Kosteuspitoisuus %
Haaga sisarklooni 1	4 kk	8,1
'Haaga'	4 kk	7,5
St. Michel sisarklooni 2	4 kk	7,9

7.1.2 Itävyystesti ja kasvatusalusta

Siemenille löytyi kasvuolosuhteet, joissa ne saatiin itämään nopeammin kuin neljässä viikossa turpeella. Yhdeksän vuorokauden kuluttua itämisen ensi merkit olivat havaittavissa mikroskoopilla imupaperilla kasvatetuista siemenistä. Muutama siemen oli turvonnut, kuori haljennut ja sirkkajuuri pilkisti. Itäminen oli silmin havaittavissa 11 vuorokauden kuluttua. Sirkkalehtien puhkeaminen kesti kolmesta neljään viikkoa.

Hormoniton MS-alusta ja kostutettu, steriili imupaperi toimivat yhtä hyvin. Molemmat testatut imupaperit (MN615, MN617) olivat toimivia lasimaljalla. MS-alustat oli valettu muovikannellisiin lasipurkkeihin. Ne eivät ole täysin tiiviitä ja viikkojen kuluessa niihin ilmestyi kontaminaatioita purkin ulkopuolelta.

Liian kuiva tai märkä alusta estää ja hidastaa itämistä. Siemen tarvitsee itääkseen veden lisäksi myös happea. Jos vettä on liikaa, hapen saanti estyy. Tutkimukseen paras kasvualusta oli imupaperi, jossa oli sen verran vettä, että paperi oli märkä, mutta siemenet eivät kelluneet vedessä. Pintasteriloimattomiin siemeniin ilmestyi tällä alustalla hometta huomattavasti vähemmän kuin imupaperilla, jossa oli runsaammin vettä, tai turpeella tai MS-kasvualustalla.

Testivaiheessa siemeniä kasvatettiin sekä imupaperilla että MS-alustalla. MS-alustalla kontaminaatiot tulivat hyvin näkyviin. Imupaperilla homeista ei näyttänyt olevan suurta haittaa itämisen kannalta, mutta kasvun etenemistä ne voivat haitata, jos ne kasvattavat tukahduttavan rihmaston. Kuviossa 8 on *Chaetomium*-suvun sieni, jonka tunnisti MTT:n tutkija. Homeet haittaavat myös jossain määrin havainnointia.



KUVIO 8. *Chaetomium*-hometta imupaperilla itäneissä siemenissä epäonnistuneen pintasteriloinnin jälkeen

7.1.3 Pintasterilointi

Siemenille kehitettiin pintasterilointitekniikka ja -liuokset, joilla ne säilyivät hengissä ja jotka estivät homeiden kasvun. Vaikka kerätyistä alppirusun siemenistä valikoitiin kooltaan suurimmat yksilöt, ne silti menivät palloteesihdistä läpi. Paperi palloteesihdin sisällä oli hankala, koska se piti vaihtaa eri liuoksille, kuivana se ei pysynyt paikoillaan ja kyseinen paperi (MN615) ei läpäissyt liuoksia riittävän nopeasti. Imupaperi (MN617) lasisuppilossa toimi paremmin, muttei riittävän hyvin sekään. Siemeniä meni hukkaan, eivätkä kaikki pysyneet liuoksessa, vaan jäivät imupaperin seinämille kiinni.

Parhaimmaksi välineeksi osoittautui Moka express -espressokeitin eli ”mutteripannun” suodatin, jota myydään tavarataloissa varaosina ja joka maksaa noin kolme euroa (Bialetti Moka Express, Ricambi Originali, 6 cups, Italia). Suodatinosa muotoiltiin pyöreäpöisellä vasaralla hiukan kuperaksi, jotta siemenet yltivät liuokseen. Moka expressin suodatin oli alumiinia ja tummeni sterilointiliuoksista. On mahdollista, että hapettumisen aiheuttamaan kovaan oksidikerrokseen kertyisi epäpuhtauksia, jotka irrotessaan toimisivat ydinpisteenä veden jäätymiselle. Kiteytynyt jää vaurioittaa solukkoa kryopakastuksen aikana ja jälkeen. Sen vuoksi välineeksi pintasterilointiin valittiin samanlainen sihti, mutta ruostumattomasta teräksestä (Bialetti Elegance, Ricambi originale, 6 cups, Italia). Kuuden kupin sihti on ehkä helpompi muotoilla kuin neljän kupin, joka on hiukan pienempi. Tiivistepakettia myydään varaosana induktioliedelle tarkoitettuun espressokeittimeen ja se maksaa noin viisi euroa (ks. kuvio 9.)



KUVIO 9. Tiivistepaketti ja kuperaksi muotoiltu sihti, vasen kuva tuotesittelyn sivulta www.crema.fi

Siemenet sietivät pintasterilointiliuoksia hyvin. Esitestistä, jossa siemeniä liotettiin 70-prosenttisessä etanolissa 4 minuuttia, 1-prosenttisessä natriumhypo-

kloriitissa 16 min ja vedessä 6 min, pääteltiin, että siemenet kestävät liuoksia useita minuutteja. Siemenet vaalenivat käsittelyssä huomattavasti. Ne lähtivät hyvin kasvuun, ehkä jopa nopeammin kuin lyhyemmän käsittelyn saaneet siemenet, eikä hometta esiintynyt. Itämään ne laitettiin MS-alustalle, josta näki helposti, oliko sterilointi onnistunut vai kasvoiko home.

Esitestien perusteella todettiin, että siemenille riittävät muutaman minuutin liotukset sterilointiliuoksissa. Siemenet lähtivät kasvuun, eikä kontaminaatiota ilmennyt. Tämän testin ensimmäisen erän liotusajat olivat etanolissa 1 minuutti ja natriumhypokloriitissa 4,5 minuuttia ja vesihuuhtelu 4 kertaa ja toisen erän etanolissa 1 minuutti ja natriumhypokloriitissa 2 minuuttia ja vesihuuhteluja 3. Näissä testeissä käytettiin 70-prosenttista etanolia, 0,5-prosenttista natriumhypokloriittia ja steriiliä vettä. Ensimmäinen erä idätettiin MS-alustalla ja toinen tehdaspuhtaalla imupaperilla.

Sterilointiliuosten eri järjestyksen testaamisella päädyttiin järjestykseen etanoli, natriumhypokloriitti ja vesi. Päätökseen vaikutti se, että kahdesta samanlaisesta testierästä, joissa etanolikäsittely oli viimeisenä, toinen ei lähtenyt kasvuun ollenkaan. Luultavasti liuokset eivät ehtineet haihtua siemenistä ennen pakastusta. Kirjallisuustietojen perusteella ovat muutkin tutkijat käyttäneet järjestystä etanoli, natriumhypokloriitti ja vesi, ja eri järjestys ei tuonut mitään lisäarvoa.

Vesihuuhteluista paras oli eri menetelmien yhdistelmä. Huuhteluista kokeiltiin upotusta kolmeen eri petrimaljaan, joissa oli vettä. Siemenet kelluvat, joten ne eivät välttämättä upotuksessa huuhtoudu joka puolelta. Paremmin toimi vesihuuhtelu pipetillä, kunhan vesi osui kaikkiin siemeniin. Tapojen yhdistelmässä upotettiin sihti veteen ja varmistettiin pipettihuuhtelulla, että vesi osuu joka puolelle siemeniä.

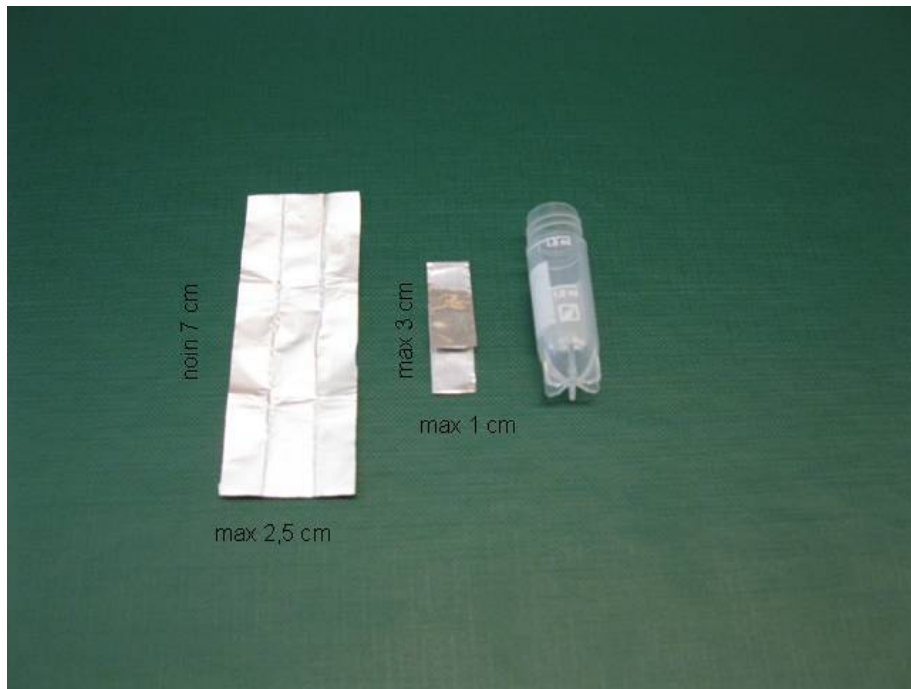
Vesihuuhteluiden perusteella pääteltiin, että sama tekniikka on hyvä muidenkin liuosten kohdalla. Koska siemenet kelluvat liuosten pinnalla, on tärkeää varmistaa, että ne pintasteriloituvat joka liuoksessa. Siementen päälle voi kaataa liuosta pipetillä ja painella niitä pinseteillä upoksiin.

Pintasterilointi onnistui kaiken kokoisille erille: 25, 100 ja 300 siementä.

Varsinaisten koeaineistojen pintasterilointi tehtiin noin 320 siemenen erissä. Siemeniä joutui käsittelyissä helposti hukkaan, joten mukana oli hyvä olla muutama ylimääräinen. Siemeniä liotettiin 70-prosenttisessa etanolissa reilu minuutti ja 1-prosenttisessä natriumhypokloriitissa reilut kaksi minuuttia ja vesihuuhteluja tehtiin noin neljä. Siementen annettiin kuivua noin 30 minuuttia, kunnes ne eivät enää tarttuneet pinsetteihin tai toisiinsa.

7.1.4 Kryopakastus

Jotta koko käsittely pintasteriloinnista kryoputkeen ja putkesta kasvualustalle pysyisi steriilinä, myös foliota piti voida käsitellä pinsetein, käsin koskematta. Neliskanttisessa foliossa siemenet pysyvät paremmin tallessa kuin suorakaiteen muotoisessa, kun niitä käsitelti käsin. Pinsetein käsittely onnistui parhaiten suorakaiteen muotoiselle foliopalalle (ks. kuvio 10). Käsittely vaati harjoittelua, jotta kevyet siemenet eivät lennähdelleet ympäriinsä. (ks. kuvio 11.) Kun siemenet oli aseteltu folion keskelle, paras tapa oli taitella se ensin pitkitäissuunnassa ja sen jälkeen päät sisäänpäin. Liitteessä 4 on käytännön ohje siementen pakastamiseen.



KUVIO 10. Folion koko ja taittelu sekä kryoputki



KUVIO 11. Siementen kääriminen folion sisään ennen kryoputkeen laittamista

7.1.5 Sulatus ja elpyminen

Julkaisujen perusteella valittiin putkien sulatus 40 °C vesihauteessa 1–3 minuuttia. Vaihtelu sulatusajassa riippui siitä, sattuiko putki ensimmäiseksi vai viimeiseksi siirretyistä putkista ja montako putkea kerralla siirrettiin.

Varsinaisen koeaineiston kasvatusolot olivat lämpötila (päivä/yö) 20,5/18 °C ja valojakso vuorokaudessa (valo—pimeä) 16:8 tuntia. Siemenet kasvatettiin petrimaljalla (halkaisija 9 cm), jossa oli kostutettu imupaperi (MN615).

Itäneissä siemenissä esiintyi mutaatioita sekä kontrolleissa että typpikäsittelyn saaneissa: albiinosirkkalehtisiä, yksi-, kolme- ja neljäsiirkkalehtisiä. (Ks. kuvio 12.)



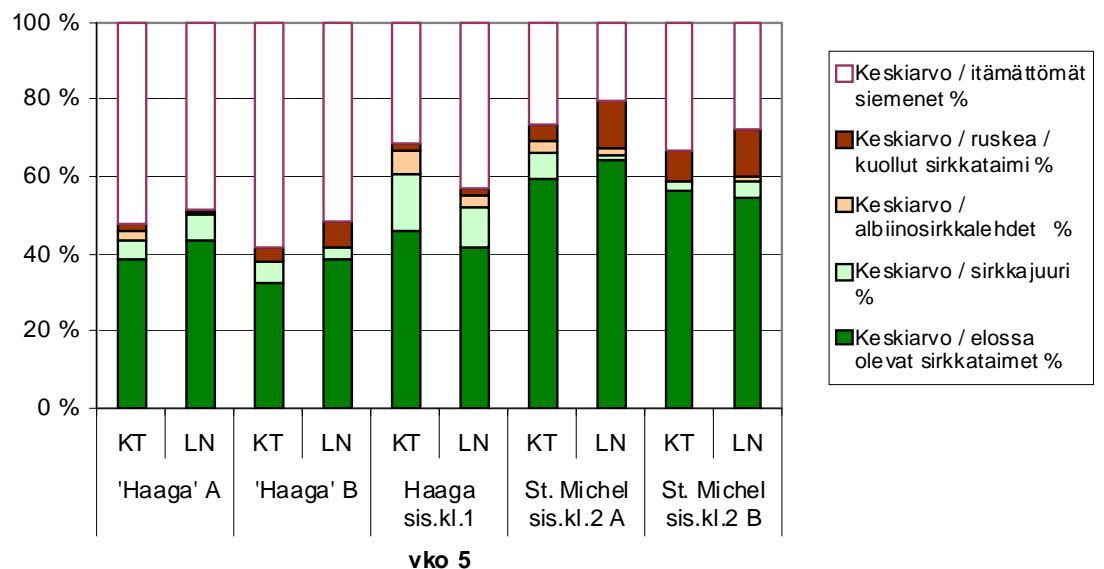
KUVIO 12. Mutaatioita jalosteen St. Michel sisarklooni 2 itäneissä siemenissä. Vasemmalla on yksisirkkalehtinen itänyt siemen ja oikealla nelilehtinen albiino.

Tutkimuksen kannalta kärkisilmun puhkeamisen jälkeinen kasvu ei ollut oleellista. Kasvua seurattiin viisi viikkoa. Kasvua olisi voinut seurata viikon tai kaksi pidempäänkin, mutta maljojen kuivumisen vuoksi tuloksia ei voinut laskea pidemmälle. Näytti kuitenkin siltä, että neljän, viiden viikon jälkeen uusia sirkkajuuria ei ilmestynyt. (Ks. kuvat 14 a, 15 a ja 16 a.)

Siementen itävyysajoissa oli eroa. Neljän viikon idätyksen jälkeen siemeniä oli kaikissa kasvun vaiheissa. Osassa sirkkataimista oli jo kärkisilmu, osassa sirkkalehdet ja osa oli jo kuollut (albiinoja). Osassa siemenistä oli sirkkajuuri ja osa ei ollut itänyt lainkaan. (Ks. Liite 5.)

Varsinaisessa koeaineistossa kahdella maljalla esiintyi *Chaetomium*-suvun homeetta. Siementen kasvu maljoilla ei poikennut muusta linjasta, joten home ei vaikuttanut tuloksiin.

Tulosten perusteella voidaan todeta, että nestetyypikäsittely ei vaikuta alppi-ruusun siementen itävyyteen. Itävyydessä ei ollut merkittävää eroa kontrollin ja typpikäsittelyn saaneiden siementen välillä. St. Michel sisarklooni 2:n ja 'Haagan' typpikäsittelyn saaneet siemenet itivät paremmin kuin kontrollit, mutta vastaavasti Haaga sisarklooni 1:n kontrollisiemenet itivät paremmin kuin typpikäsittelyn saaneet. (Ks. kuvio 13.)



KUVIO 13. Siementen itäminen viiden viikon jälkeen kaikilla lajikkeilla ja jaloosteilla (n=3). (A) ensimmäinen erä, (B) toinen erä, (KT) pakastamaton kontrolli, (LN) nestetyypipakastettu, (sis.kl.1) sisarklooni 1, ((sis.kl.2) sisarklooni 2.

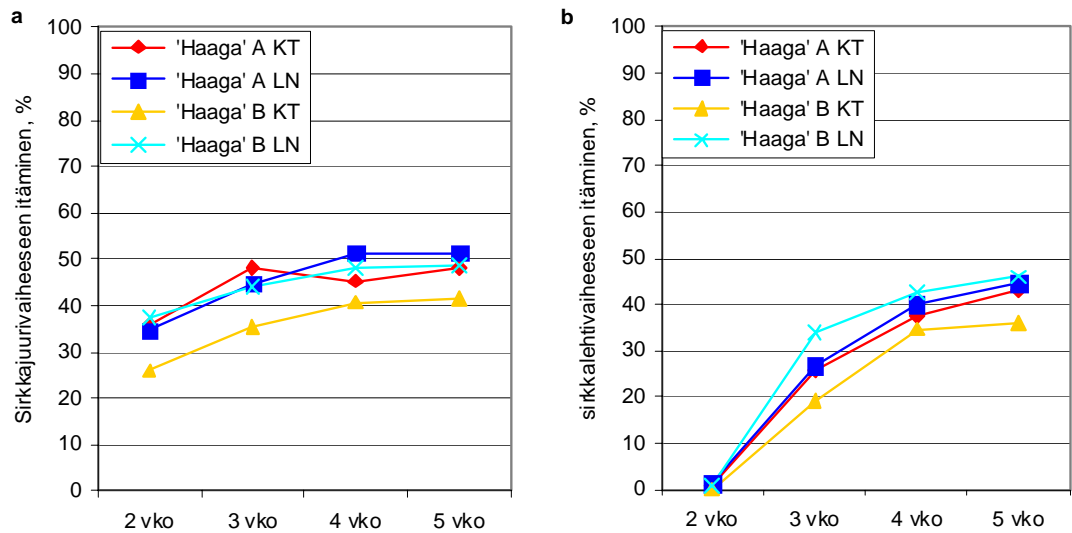
Elossa oleviksi sirkkataimiksi laskettiin sirkkalehdelliset ja kärkisilmulliset taimet (ks. kuvio 13). Taimia, jotka olivat viiden viikon itämisen jälkeen edelleen sirkkajuurivaiheessa, ei laskettu eläviksi, koska elinkelvottomatkin siemenet voivat veden imeytymisen johdosta turvota ja siemenkuori haljeta.

Elävien sirkkatainten osuus viiden viikon itämisen jälkeen oli 33–67 % ja osuus riippui lajikkeesta ja jalosteesta. Jaloste St. Michel sisarklooni 2 iti parhaiten ja lajike 'Haaga' iti huonoiten riippumatta siitä, olivatko siemenet saaneet typpikäsittelyn vai eivät. (Ks. kuvio 13.) Tulos on selitettävissä heteroosilla (risteytyselinvoima, hybridin elinvoima). Heteroosi syntyy, kun perimältään erilaiset ristipölytteisen lajin yksilöt risteytetään keskenään. Heterotsygoottisella yksilöllä toisinaan ilmenee parempi elinvoimaisuus, joka johtuu yksilön suotuisasta geeniyhdistelmästä. Heteroosiksesta saatava hyöty heikkenee seuraavissa sukupolvissa (F2, F3). Tutkituista siemenistä St. Michel sisarklooni 2 oli F1-hybridi ja 'Haaga' sisarklooneineen olivat vähintään F2-hybridejä.

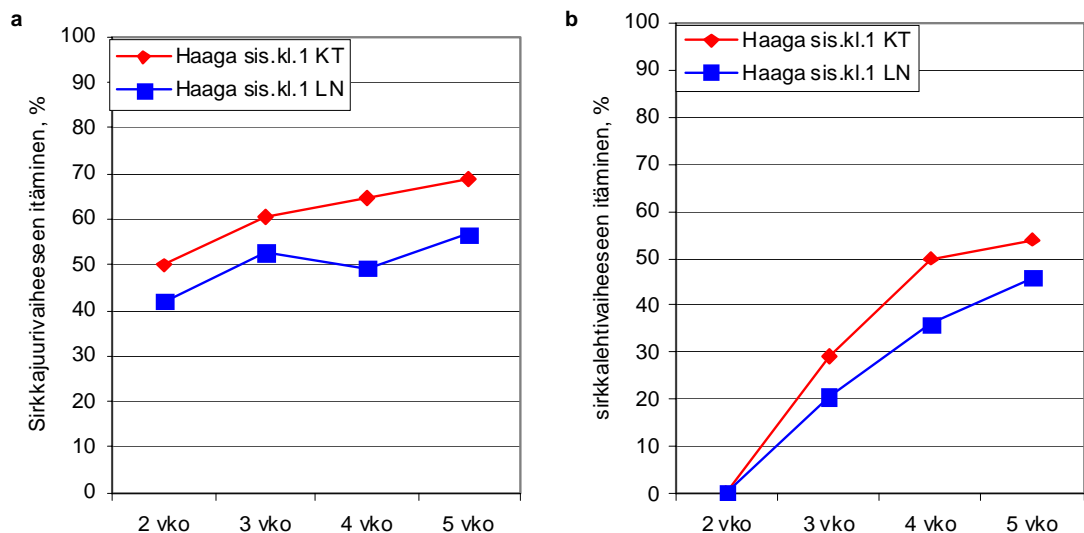
Albiinotaimet kehittyivät sirkkalehtiasteelle ja alkoivat kuolla noin kuukauden kuluttua itämisestä. Albiinotaimia esiintyi sekä kontrolleissa että typpikäsittelyn saaneissa siemenissä, joten albinismi ei aiheutunut typpikäsittelystä. Itse asiassa kahdessa erässä viidestä albinismia esiintyi vähemmän nestetyypessä käyneissä kuin kontrolleissa. (Ks. kuvat 14, 15 ja 16.)

Lajikkeen 'Haaga' siemenistä iti 36–46 %. Lajikkeen 'Haaga' A itäminen sirkkalehtivaiheeseen sisälsi enimmillään albiinosirkkalehdellisiä taimia kontrolleissa 3 % (± 1) ja nestetyypessä käyneissä 1 % (± 1). Lajikkeessa 'Haaga' B oli enimmillään albiinosirkkalehdellisiä taimia kontrolleissa 3 % (± 1) ja nestetyypessä käyneissä 6 % (± 3). 'Haaga' B:n kontrolli poikkeaa nestetyppikäsittelystä ja toisesta kontrollista noin 10 % selittämättömästä syystä. Sen kasvu on

kuitenkin samassa linjassa muiden kanssa. 'Haaga' A:n kontrollissa tapahtuva notkahdus neljän viikon kohdalla johtuu laskuvirheestä.

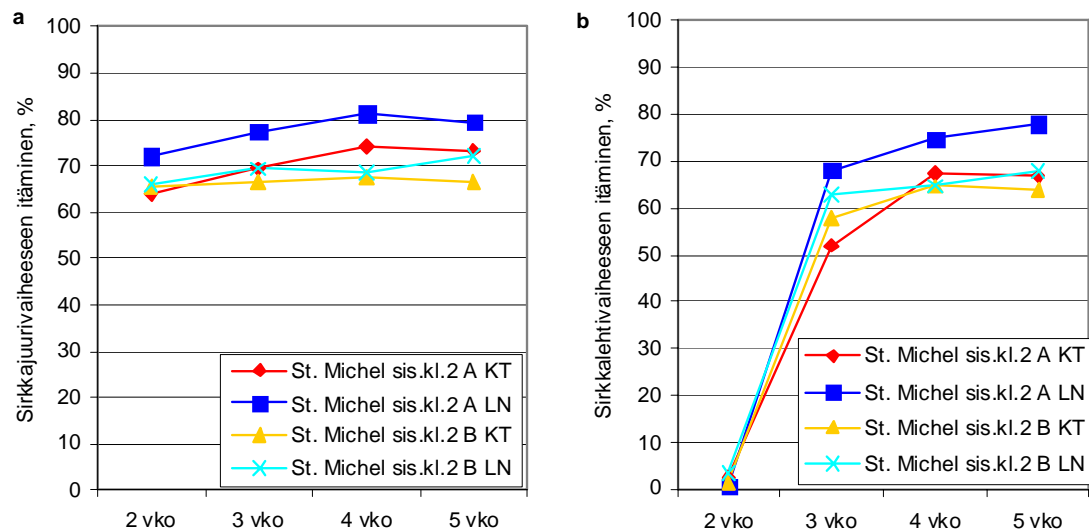


KUVIO 14. Lajikkeen 'Haaga' itäminen (a) sirkkajuurivaiheeseen ja (b) sirkkalehtivaiheeseen (n=3). (A) ensimmäinen erä, (B) toinen erä, (KT) pakastamaton kontrolli, (LN) nestetyypipakastettu.



KUVIO 15. Jalosteen Haaga sisarklooni 1 itäminen (a) sirkkajuurivaiheeseen ja (b) sirkkalehtivaiheeseen (n=3). (A) ensimmäinen erä, (B) toinen erä, (KT) pakastamaton kontrolli, (LN) nestetyypipakastettu.

Jalosteella Haaga sisarklooni 1 itäneitä siemeniä oli 46–54 %. Jalosteen Haaga sisarklooni 1 itäminen sirkkalehtivaiheeseen sisälsi enimmillään albiinotaimia kontroleissa 7 % (± 1) ja nestetyössä käyneissä 4 % (± 2). Kuviossa 15 a näkyvä notkahdus neljän viikon kohdalla (nestetyyppipakastettu) johtuu lasku-
virheestä. (ks. kuvio 15.)



KUVIO 16. Jalosteen St. Michel sisarklooni 2 itäminen (a) sirkkajuurivaiheeseen ja (b) sirkkalehtivaiheeseen (n=3). (A) ensimmäinen erä, (B) toinen erä, (KT) pakastamaton kontrolli, (LN) nestetyyppipakastettu.

Jalosteen St. Michel sisarklooni 2 siemenet itivät parhaiten. Siemenistä iti 64–78 %. Jalosteen St. Michel sisarklooni 2 A itäminen sirkkalehtivaiheeseen sisälsi enimmillään albiinotaimia 5 % (± 3) kontroleissa ja nestetyössä käyneissä 9 % (± 2). Jalosteessa St. Michel sisarklooni 2 B oli albiinotaimia enimmillään kontrollissa 7 % (± 2) ja nestetyössä käyneissä 11 % (± 3).

Esikokeiden siementen kasvua kasvualustoilla seurattiin noin neljä kuukautta. Ne ehtivät kasvattaa muutamia varsinaisia kasvulehtiä eikä niiden kasvussa ilmennyt mitään poikkeavaa.

7.2 Siitepöly

7.2.1 Itävyystesti

Tuloksia saatiin sitruunan (*Citrus limon*), miekkaliljan (*Gladiolus*) ja ruusun (*Rose*) idätysmenetelmillä (ks. Liite 3). Ruusulle toimivalla kasvualustalla myös alppiruusun siitepöly iti parhaiten. Se iti huoneenlämmössä, noin 20 °C:ssa 18 tunnissa. Siitepöly ei itänyt pelkässä vedessä, ritarinkannuksen (*Delphinium*) kasvualustalla eikä yhdellä G-suoloihin pohjautuvalla kasvualustalla, jota tutkimuksessa kokeiltiin.

Pieni kertakäyttöpetrimalja toimi siitepölyn idätykseen parhaiten. Maljaan kuuluu kansi, joka hidastaa nesteen haihtumista, mutta ei tee tilaa hapettomaksi. Siitepölyn itämisen saattoi havainnoida mikroskoopilla suoraan petrimaljalta tai tarvittaessa tarkemman kuvan sai hanging drop -menetelmällä (Observing protocista in water using the hanging drop technique 2009). Siinä pisara liuosta siitepölyineen siirretään pipetillä mikroskooppilasille. Lasi käännetään nopeasti ylösalaisin, jolloin pisara jää roikkumaan lasin alapinnalle. Lasi asetetaan matalan, reunallisen astian tai kannen päälle, jolloin pisara ei koske mihinkään ja siitepölyä voi tarkastella mikroskoopilla lasin läpi. Siitepöly nousee pisaran pinnalle eli lasia vasten.

Testien aikana havaittiin, että elatusainetta on hyvä olla niin paljon, että petrimaljan pohja peittyy. Pohjan on hyvä olla kokonaan peitossa, koska siitepöly hakeutuu pisaran reunalle ja reunalla itäminen ei ole yhtä hyvää, koska siiteputket kasvavat liuosta kohti. Pipetoimalla liuosta, siitepölyn saa paremmin pysymään halutussa paikassa kuin suoraan pullosta kaatamalla.

Siitepölyn idättäminen onkalomikroskooppilevyllä, 1 mm, ei onnistunut. Onkalolevyllä voisi paitsi tutkia näytettä tarkasti (hanging drop), myös idättää

näytteen hyvin pienessä määrässä liuosta. Siitepöly vei mukanaan ilmakuplia eli peitinlevyn laittamisen jälkeen siitepöly ei ollut liuoksessa kokonaan. Voi myös olla, että happi ei riittänyt peitelevyn alla. Siitepöly pyrki myös karkaamaan pois onkalosta peitelevyn ja reunan väliin. Kellolasi ei myöskään ollut toimiva astia idätykseen. Neste ehti haihtua lasilta yön aikana ja kellolasi kaatui helposti.

7.2.2 Irrottaminen ponsista

Kokeiden aikana havaittiin, että idätettävä siitepöly kannattaa irrottaa ponsista. Ponsi homehtui kasvatusliuoksessa ensimmäisenä, pelkkä siitepöly säilyi liuoksessa noin viisi vuorokautta.

Ponsien ja siitepölyn käsittelyyn ei-uritetut pinsetit ovat paremmat kuin uritetut, koska siitepöly tarttuu uriin kiinni. Siitepölyn irrottaminen ponsista pinseteillä onnistui huonosti ja oli todella työlästä. Paras menetelmä siitepölyn irrottamiseen ponsista oli ravistaminen koeputkiravistelijalla 30 sekuntia. Siten siitepölyn sai irtoamaan lähes kaikista lajikkeista ja jalosteista. Ravistelun jälkeen ponnet kerättiin kryoputkista pinseteillä.

Siitepöly ei irronnut ponsista lajikkeissa 'Suvi', 'Hellikki' ja 'Pekka' ja jalosteissa KA-24, vaikka niissä oli siitepölyä. 'Helsinki University' vaati pidemmän ravistelun ja runsaammin ponsia kuin muut lajikkeet ja jalosteet. Työstettävää siitepölyä ei ollut lainkaan lajikkeissa 'Kaino' ja R. Williamsianumeristeymä (TTA-762).

Kryoputkeen kannattaa laittaa enemmän kuin kuusi pontta, koska lajikkeesta ja jalosteesta riippuen ponsista irtoaa eri määrä siitepölyä. (Ks. kuvio 17). Siitepölyä on oltava reilusti myös siksi, että staattisen sähköisyyden vuoksi kaiken siitepölyn siirtäminen kryoputkesta ei onnistu. Koeputkiravistelussa sei-

nämille jääneiden hiukkasten määrä jäi kuitenkin vähäiseksi, koska siitepölyhiukkaset takertuivat toisiinsa paakuksi.



KUVIO 17. Siitepölyä ponsineen menossa kryoputkiin

7.2.3 Elpyminen

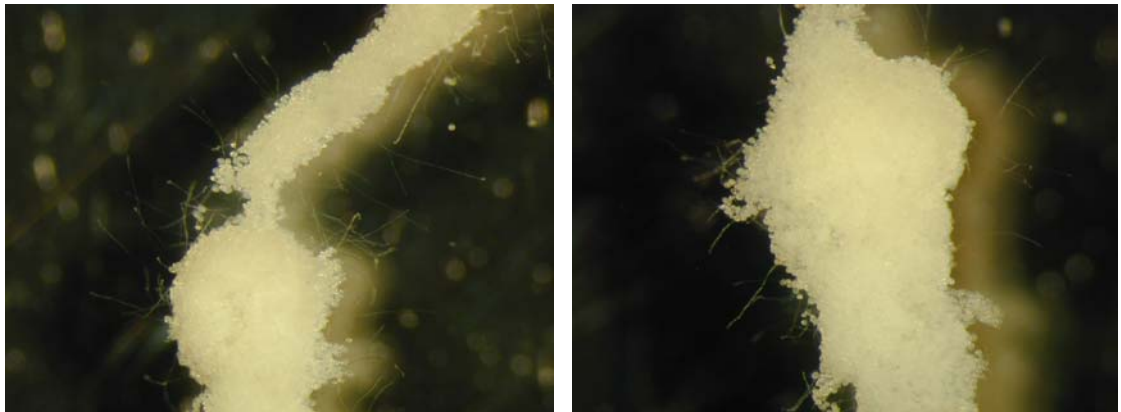
Tulos oli, että useamman henkilön silmämääräisen arvion mukaan nestetyypikäsittely ei heikennä siitepölyn itämistä. Kontrollit ja typpikäsittelyn saaneet siitepölyt olivat itäneet yhtä hyvin 18 tunnissa. Siitepöly tulkittiin eläväksi, kun siiteputken pituus ylitti siitepölyhiukkasen koon. Siiteputket olivat hyvinkin 20 kertaa pidempää verrattuina siitepölyhiukkasiin riippumatta siitä, oliko siitepöly käynyt nestetyypessä vai ei (ks. kuvio 18).

Tulos saatiin lajikkeista 'Raisa', 'Vieno', 'Venla', 'Axel Tigerstedt', 'St. Michel', 'P.M.A. Tigerstedt', 'Pohjola's Dauhgter', 'Helsinki University', 'Haaga', 'Elviira' ja 'Mauritz' sekä jalosteista TTA-590 ja TTA-591.

Siitepöly luokiteltiin kahteen luokkaan, ei itäneeksi ja itäneeksi. Kaikki kontrolli- ja nestetyypessä käyneet siitepölyerät itivät, joten siitepölyn itävyydeksi saatiin 100 %. Lajikkeiden kesken siitepölyjen itävyydessä oli eroja. 'Pohjola's Daughter' iti paremmin kuin esimerkiksi 'Mauritz' tai 'Elviira' (ks. kuviot 18 ja 19).



KUVIO 18. 'Pohjola's Daughter' -siitepöly, kontrolli vasemmalla ja typpikäsittelyn saanut oikealla



KUVIO 19. 'Elviiran' siitepöly, kontrolli vasemmalla ja typpikäsittelyn saanut oikealla. Kuvasta näkee, miten siitepölyhiukkaset ovat liuoksessa paakkuna, useassa kerroksessa. Kuva tarkentuu vain päällimmäiseen kerrokseen.

Jotta tulos olisi ollut tilastollisesti pätevä, siitepölyhiukkaset olisi pitänyt saada yhteen kerrokseen ja riittävän harvaan havainnointia varten (ks. kuvio 19). Marchant ja muut (1993, 236) laskivat ruusun ('Heritage' ja 'The Country-

man') itävyyden levittämällä siitepölyn puolikiinteälle kasvualustalle kame-linkarvasudilla. Silloin siitepölyhiukkaset asettuvat yhteen kerrokseen ja riittävän harvaan havainnointia varten. Alppiruusun siitepöly saatiin itämään nestemäisellä kasvualustalla eikä samaa alustaa hoksattu kokeilla puolikiinteänä. Varmuutta ei ole, että alppiruusun siitepöly olisi itänyt myös puolikiinteällä alustalla.

8 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

8.1 Siemenet

8.1.1 Itävyydesti ja kasvatusalusta

Alustavana tutkimuksena ennen nestetyyppikäsittelyjä on hyvä tehdä elävyydesti turpeella, jotta näkee, ovatko siemenet ylipäitään elinkelpoisia. Tässä tutkimuksessa ei tarkasteltu erikseen pintasteriloinnin vaikutusta itävyyteen. Sekin olisi hyvä testata.

Käytännössä imupaperi on helpompi siementen kasvatuksessa kuin MS-agaralusta. Itämisen havainnointi purkissa olevalta MS-alustalta oli vaikeaa. Siemenet imupaperin päällä petrimaljalla pystyi havainnoimaan mikroskooppilla niihin koskematta. Toisaalta MS-alustalla kaikenlaiset kontaminaatiot tulevat esiin paremmin, mutta tämä tutkimus ei edellyttänyt agarravintoalustan käyttöä. Jos MS-kasvualustan valaisi petrimaljoille, se voisi sopia siementen idättämiseen ja havainnointiin. Imupaperilta siementen siirtäminen jatkokäsittelyyn on helpompaa kuin MS-kasvualustalta (ei pesua ja helpompi napata pinseteillä). Kasvualustana imupaperi vaatii vähemmän toimenpiteitä

kuin agar. Imupaperi ainoastaan steriloidaan ja kastellaan, kun taas agar pitää keittää, valaa purkkeihin ja steriloida sekä ottaa huomioon säilytys ja säilyvyys.

Imupaperi lasimaljalla todettiin toimivammaksi kasvualustaksi kuin pieni imupaperi (ø 90 mm) pienellä muovisella kertakäyttömaljalla (ø 9 cm). Ero ei tullut esille esitestien aikana. Molemmat imupaperit, MN615 ja MN617 (ø 12,5 cm), pysyivät kosteina lasimaljalla vielä neljän kuukauden jälkeenkin. Käytin imupapereita saatavuuden mukaan ja varsinainen koeaineisto kasvatettiin MN615-imupaperilla pienellä kertakäyttömaljalla. Kuudessa viikossa, usealla maljalla, MN615-paperi pienellä kertakäyttömaljalla kuivui liikaa. Vesi helmeili maljan reunoilla, mutta itse paperi oli siemenille liian kuiva. Voi olla, että vesihöyry pääsee muovisesta petrimaljasta läpi. Arvelen kuitenkin, että kosteus pysyy yhtä hyvin lasi- ja muovimaljalla, kun ne on suljettu parafilmillä, ja kosteuserot johtuvat paperin kyvystä imeä vettä ja siitä, että vesimäärät eivät ole tismalleen samat joka maljalla.

MN615 ei mahtunut pienelle kertakäyttöpetrimaljalle suorana. Paperin olisi voinut leikata sopivan kokoiseksi ennen sterilointia, jolloin sen käsittely olisi ollut hieman helpompaa.

Tutkimuksen testeihin parempi kasvualusta olisi ollut iso imupaperi (MN617). MN617 huokoisena paperina imi hyvin vettä, jolloin itämättömät siemenet eivät vaihtaneet paikkaa liikkuvan veden mukana maljoja käsiteltäessä. Isommalla paperilla ja maljalla 50 siemenen havainnointi olisi ollut helpompaa.

8.1.2 Pintasterilointi

Pintasteriloinnin esikokeet onnistuivat hyvin. Vasta viikkojen jälkeen esikokeisiin ilmestyi kontaminaatioita. Havaittiin, että parafilmiin, jolla maljat oli suljettu, oli tullut halkeamia ja ulkoiset kontaminaatiot pääsivät kasvualustoille. Varsinaisiin kokeisiin laitettiin kaksinkertainen parafilmi tämän ilmiön estämiseksi.

Mahdollisia kontaminaatioiden lähteitä ovat siemenen pinnassa olevat mikrobit, joita ei tällä pintasterilointimenetelmällä saada pois, siemenen kuoren sisällä olevat mikrobit, jotka tulevat esiin kuoren haljetessa itämisen johdosta, kontaminaatiot sterilointiliuoksissa ja virhe työskentelytavoissa.

8.1.3 Elpyminen

Itäneitä siemeniä oli vaikea laskea. Kasvaessaan ne eivät pysyneet riveissä ja laskuissa teki helposti virheitä. En keksinyt ajoissa, että laskemisen apuna olisi voinut käyttää vesiliukoista tussia. Petrimaljan kansi sumentui etanolilla pyyhkimisestä eivätkä merkinnät pohjassa näkyneet imupaperin läpi. Päätellen, että tuloksissa näkyvät heitot johtuvat laskuvirheistä. On myös mahdollista, että pientä sirkkajuurta ei huomaa, jos malja onkin eri päin kuin edellisellä kerralla. En pidä mahdollisena, että jo itänyt siemen muuttuisi takaisin itämättömän näköiseksi.

Toistettavuuden onnistumista testattiin toistamalla koe 'Haagalla' ja St. Michel sisarklooni 2:lla. Koska 'Haagan' kontrolli eroaa toisen kontrollin linjasta sirkkajuurten itämisnopeuden suhteen, voidaan ajatella, että toistettavuudessa olisi parannettavaa.

Siementen itävyys vaihteli. Ne itivät turpeella oletettua huonommin, vaikka eivät olleet vielä saaneet nestetyppi- tai pintasterilointikäsittelyä. Uosukaisen (2011) mukaan, siementen ja siitepölyn laatu ja määrä vaihtelevat vuosittain. Siementen itävyyteen on saattanut vaikuttaa vuoden 2010 huono pölytyskeivät. Pölyttäjien vähäisyys ja kevähalla olivat vaikuttaneet mm. mustikkasaaton ja ovat saattaneet vaikuttaa myös tutkittuihin alppirusuuyksilöihin, jonka vuoksi usean lajikkeen siemenet itivät huonosti ja epätasaisesti.

Tutkitut siemenet kerättiin keväällä ja keväällä kerätyt siemenet ovat altistuneet mahdollisille talvivaurioille. Paras itävyys on syksyllä kerätyillä siemenillä (Uosukainen 2011). Syksyllä kerätyt siemenet saattavat käyttäytyä kryosäilytyksessä eri tavalla ja tarvita erilaisia käsittelyjä tai liotusaikoja.

8.2 Siitepöly

Siitepölyn tutkiminen osoitti, että pitkäaikaissäilytys nestetyössä ei vähennä suomalaisten alppirusujen siitepölyn itävyyttä. Jotta voisi sanoa, ettei kryosäilytys vaikuta siitepölyn elävyyteen, pitäisi siitepölyllä hedelmöitetyn kukkan kehitystä seurata siemenvaiheeseen asti. Jos työstetään tuoretta siitepölyä, kannattaa huomioida, että se saattaa käyttäytyä kryosäilytyksessä eri tavalla kuin vähintään viikon kuivunut siitepöly.

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää kryosäilytysmenetelmä suomalaisten alppirusujen siementen ja siitepölyn pitkäaikaissäilytykseen. Tutkimus osoit-

ti, että siementen syväjäädytys nestetyypessä tunnin ajan ei vähennä niiden itävyyttä. Tulos on samansuuntainen kuin Kholinan ja Voronkovan (2008, 262–269) tutkimuksen tulos *Rhododendron aureumin* siementen itämisestä eli nestetyypikäsittely saattaa jopa parantaa joidenkin alppiruusujen siementen itävyyttä. Tutkimuksen koejärjestely ei kuitenkaan ollut riittävä tilastollisesti pätevään näyttöön.

Menetelmää on tällaisenaan mahdollista kokeilla ilman suuria investointeja muillekin kuivuutta sietäville siemenille (orthodox). Tällaisia siemeniä tuottavat useimmat viljely- ja rehulajit sekä monet puulajit (Ababa ym. 2010). Menetelmää voisi käyttää myös luonnonvaraisten alppiruusupopulaatioiden, suopursun ja lapinalppiruusun, säilyttämiseen.

Tutkimuksen tulos oli, että alppiruusun siitepöly voidaan onnistuneesti elvyttää nestetyypisäilytyksen jälkeen. Silmämääräisen arvion mukaan itävyydessä ei ollut eroa kontrollin ja nestetyypikäsittelyn saaneen siitepölyn välillä. Tulosta tukee Marchantin ja muiden tutkimus ruusun ('Heritage' ja 'The Countryman') siitepölyn säilyttämisestä. He vertasivat siitepölyn säilyttämistä jääkaapissa, pakastimessa ja nestetyypitankissa. Ruusun siitepöly elpyi parhaiten kryosäilytyksen jälkeen eikä sen itävyys ollut alentunut merkittävästi. (Marchant ym. 1993, 235–240.) Tässä tutkimuksessa käytettyä menetelmää on mahdollista kokeilla tällaisenaan muidenkin lajien siitepölylle.

LÄHTEET

Ababa, A., Jorge, A., Hanson, J. & Panis, B. 2011. Cryo bank. The Crop Genebank Knowledge Base 4.5.2011. Viitattu 11.6.2011.

<http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org>, Procedures, Conservation.

Ababa, A., Jorge, A. & Hanson, J. 2010. Seed bank. The Crop Genebank Knowledge Base 9.12.2010. Viitattu 13.6.2011.

<http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org>, Procedures, Conservation.

Anonymous 2006. In Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Ed. by B. M. Reed. Corvallis: Springer, 457–458.

Ásgrímsson, H. 2009. Frozen seeds – safeguarding global food supplies.

EUobserver 21.04.2009. Viitattu 16.6.2011. <http://euobserver.com/9/27971>.

Bonner, F. T. 1990. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. Forest Ecology and Management, vol. 35, issues 1–2, 35–43.

Viitattu 3.8.2011. <Http://www.jamk.fi/kirjasto>, Nelli-portaali, Elsevier.

Chmielarz, P. 2010. Cryopreservation of orthodox seeds of *Alnus Glutinosa*.

Cryoletters 31, 139–146. Viitattu 12.6.2011. <Http://www.jamk.fi/kirjasto>, Nelli-portaali, PubMed.

Cox, P. A. 1990. The Larger *Rhododendron* Species. Revised ed. London: B. T. Batsford Ltd.

Cox, P. A. 1993. The Cultivation of Rhododendrons. London: B. T. Batsford Ltd.

Eskeli, H., Hamara, J., Laukkanen, M., Lehtonen, P. O., Luoto, K., Vihavainen, M. & Ylihärtilä A. Kosteuden määrittäminen elintarvikkeesta. Opetushallitus. Viitattu 4.7.2011.

http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/elintarvikeanalyysit_kosteus.html

Ganeshan, S., Rajasekharan, P. E., Shashikumar, S. & Decruze, W. 2008.

In Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Ed. by B. M. Reed. Corvallis: Springer, 451–454.

Geenivarojen kestävä käyttö 2009. MTT. Viitattu 27.7.2011. <http://www.mtt.fi>, Kestävä tuotanto, Geenivarojen kestävä käyttö.

Gibbs, D., Chamberlain, D. & Argent, G. 2011. The Red List of Rhododendrons. Published by Botanic Gardens Conservation International. Viitattu 29.9.2011. <http://www.bgci.org/ourwork/Rhododendron-Red-List>.

Global Strategy for Plant Conservation. 2002. Canada: The Secretariat of the Convention on Biological Diversity World Trade Centre. Botanic Gardens Conservation Internationalin sivustolla. Viitattu 28.9.2011. <http://www.bgci.org>, Our work, Policy frameworks, GSPC.

González-Benito, M. E., Aguilar, N. & Ávila, T. 2009. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. *Cryoletters* 30, 2, 142-147. Viitattu 12.6.2011. <Http://www.jamk.fi/kirjasto>, Nelli-portaali, PubMed.

Hamilton, K. N., Ashmore, S. E. & Pritchard, H. W. 2009. Thermal Analysis and Cryopreservation of Seeds of Australian Wild *Citrus* Species (Rutaceae): *Citrus australasica*, *C. inodora* and *C. garrawayi*. *CryoLetters* 30, 270. Viitattu 12.6.2011. <Http://www.jamk.fi/kirjasto>, Nelli-portaali, PubMed.

Hartman, H. T. & Kester, D. E. 1975. *Plant Propagation principles and practices*. Third ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.

Honda, K., Watanabe, H. & Tsutsui, K. 2002. Cryopreservation of *Delphinium* pollen at -30 °C. *Euphytica* 126, 316. DOI: 10.1023/A:1019931304742. Viitattu 12.6.2011. <http://www.springerlink.com>.

Kasvigeenivaraohjelma 2008. MTT. Viitattu 3.5.2011. <http://www.mtt.fi/kasvigeenivarat>.

Kaviani, B. 2010. Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axe of persian lilac (*Melia azedarach* L.) and tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Omics Journal* 3, 6, 177-182. Viitattu 12.6.2011. <Http://www.jamk.fi/kirjasto>, Nelli-portaali, Elsevier ScienceDirect.

Kholina, A. B. & Voronkova, N. M. 2008. Conserving the Gene Pool of Far Eastern Plants by Means of Seed Cryopreservation. *Biology Bulletin* Vol. 35, 3, 262 – 269. Viitattu 12.6.2011. <Http://www.jamk.fi/kirjasto>, Nelli-portaali, PubMed.

Kylmäsäilytystekniikan soveltaminen kasvullisesti lisättävien kasvien geenivarojen pitkäaikaissäilytyksessä 2009. MTT. Viitattu 27.7.2011. <http://www.mtt.fi/kasvigeenivarat>, Tutkimushankkeet ja projektit.

Marchant, R., Power, J. B., Davey, M. R., Chartier-Hollis, J. M. & Lynch, P. T. 1993. Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. *Euphytica*, 66, 235–241. DOI: 10.1007/BF00025309. Viitattu 12.6.2011.
<http://www.springerlink.com>.

Observing protocista in water using the hanging drop technique 2009. Practical biology -sivusto. Päivitetty May 2009. Viitattu 26.7.2011.
<http://practicalbiology.org/>, Cells to systems, Microscopic organisms, Observing protocista in water using the hanging drop technique.

OVA-ohje natriumhypokloriitti 2011. Turvallisuusohjeet 13.1.2011. Työterveyslaitos. Viitattu 14.7.2011. <http://www.ttl.fi>, Kemikaaliturvallisuus, OVA-ohjeet.

Pritchard, H. W. & Nadarajan, J. 2008. In *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Ed. by B. M. Reed. Corvallis: Springer, 490–496.

Stanwood, P. C. 1985. Cryopreservation of Seed Germplasm for Genetic Conservation. In *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. Ed. by K. K. Kartha. Florida: CRC Press Boca Raton, 199–226.

Towill, L. E. 2002. Introduction and Some Observations. In *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Ed. by L. E. Towill and Y. P. S. Bajaj. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 7.

Uosukainen, M. 1992. Rooting and weaning of apple rootstock YP. *Agronomie* 12, 803-806. DOI:10.1051/agro:19921010. Viitattu 12.6.2011.
<http://www.agronomy-journal.org/>, DOI resolver.

Uosukainen, M. 2010. *The Finnish Rhododendrons*. Tiedote. Laukaa: MTT Plant Production Research.

Uosukainen, M. 2011. Vanhempi tutkija. Laukaa: MTT. Haastattelu 21.6.2011.

Uosukainen, M. & Tigerstedt P. M. A. 1988. Breeding of frosthady rhododendrons. *Journal of Agricultural Science in Finland* vol. 60, 235–254.

Vertucci, C. W. 1989. Effects of Cooling Rate on Seeds Exposed to Liquid Nitrogen Temperatures. *Plant Physiol.* vol. 90, 4, 1478–1485. Viitattu 7.8.2011.
[Http://www.jamk.fi/kirjasto](http://www.jamk.fi/kirjasto), Nelli-portaali, PubMed.

Zoratti, L., Jaakola, L., Edesi, J. & Häggman, H. 2011. Cryopreservation of Bilberry Seed Material. Konferenssijulkaisu. COST Action 871 8.2.2011. Angers, France: Agrocampus Ouest INHP.

LIITTEET

Liite 1. Työssä käytetyt suomalaiset alppiruusulajikkeet ja -jalosteet sekä niiden vanhemmat (Uosukainen 2010; Uosukainen 2011)

Lajike (vuosi)	Emokasvi x pölyttäjä
Kookkaat	
'St. Michel' (1987)	<i>Rhododendron brachycarpum</i> ssp. <i>tigerstedtii</i> x <i>R. smirnowii</i>
'Helsinki University' (1987)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x tuntematon vapaapölytys
'P.M.A. Tigerstedt' (1987)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. catawbiense</i> var. <i>album</i> 'Glass'
'Pekka' (1999)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. smirnowii</i> -risteymä
Keskikorkeat	
'Hellikki' (1987)	<i>R. Smirnowii</i> -risteymä x tuntematon vapaapölytys
'Haaga' (1987)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. 'Dr. H.C. Dresselhuys'</i>
'Axel Tigerstedt' (2002)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. degroaniumum</i>
'Raisa' (2003)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. Brachycarpum</i> -risteymä
'Mauritz' (2006)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. forrestii</i> ssp. <i>forrestii</i>
Matalat	
'Elviira' (1987)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. forrestii</i> var. <i>repen</i> -risteymä
'Kullervo' (1992)	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. degroaniumum</i> ssp. <i>yakushimanum</i>
'Pohjola's Daughter' (1996)	<i>R. 'Cunningham's White'</i> x <i>R. smirnowii</i> Trautv.
'Kaino' (2006)	<i>R. wardii</i> x tuntematon vapaapölytys
'Vieno' (2006)	<i>R. wardii</i> x tuntematon vapaapölytys
'Venla' (2006)	<i>R. wardii</i> x tuntematon vapaapölytys
'Suvi' (2006)	<i>R. Oreodoxa</i> -risteymä x <i>R. Williamsianum</i> -risteymä
TTA-762 (2011)	<i>R. Williamsianum</i> -risteymä
Jaloste	
TTA-590	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x joku keltainen hybridi
TTA-591	<i>R. 'Kullervo'</i> x <i>R. 'Elviira'</i>
KA-24	<i>R. b. ssp. tigerstedtii</i> x <i>R. 'Britannia'</i>

Liite 2. MS-kasvualusta siemenille

MS-jauhe	4,3 g/l
Myo-inositoli	100 mg/l
Sakkaroosi	30 g/l
Vitamiinit	10 ml/l perusliuosta, jossa:
Glysiini	0,200 g/l
Nikotiinihappo	0,050 g/l
Pyridoksiinihappo	0,050 g/l
Tiamiini	0,100 g/l

Liuksen pH muutetaan tässä vaiheessa välille 5,6-5,8.

Gelriitti	206 g/l
Bacto TM Peptone	0,27 g/l

Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS), Sigma-Aldrich, USA.

myo-Inositol, Sigma-Aldrich, USA.

Gelrite, Gellan gum, Scott Laboratorioes, USA.

BactoTMPeptone, Becton, Dickinson and Company, USA.

Glycine, Merck KGaA, Germany.

Nicotinic acid, Sigma-Aldrich, USA.

Pyridoxine (Pyridoxol; vitamin B₆, Sigma-Aldrich, USA.

Thiamine hydrochloride, Sigma-Aldrich, USA.

Liite 3. Siitepölylle kokeiltuja kasvatusalustoja

Citrus limon

Tehdään tislattuun veteen.

20 % Sucrose

100 ppm H_3BO_3

300 ppm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

200 ppm $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 ppm KNO_3

pH 7,3

Gladiolus

Tehdään tislattuun veteen.

15 % Sucrose

100 ppm H_3BO_3

300 ppm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

200 ppm $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 ppm KNO_3

pH 7,0

Rose

Tehdään tislattuun veteen.

15 % Sucrose

100 ppm H_3BO_3

150 ppm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

200 ppm $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 ppm KNO_3

pH 7,0

Liite 4. Käytännön ohje siementen kryosäilytykseen

Laatija: Milja Rantanen 10.10.2011

Siemeniä varten ota pieni muovinen näytepurkki ja pohjalle folio vähentämään sähköisyyttä. Tarvitset laminaariin steriiliä työskentelyä varten lämpökaapissa steriloidut pinsetit, sihdit, imupaperit, valmiiksi leikatut ja taitellut foliot sekä 10 petrimaljaa (ø 11 cm). Tarvitset myös sterilointiliuokset (70 % etanoli, 1 % natriumhypokloriitti ja steriili vesi), 3 pientä steriiliä petrimaljaa, 3 steriiliä kertakäyttöpipettiä, kryoputkia ja kasvualustoja tarvittavan määrän.

Erottele siemenet pieneen näytepurkkiin. Tästä eteenpäin työskentely on steriiliä. Kaada siemenet purkista petrimaljalla olevan suodattimen päälle. Suodatinta siirrellään steriileillä pinseteillä. Petrimaljat, kolme kappaletta, ovat puolitäynnä sterilointiliuoksia (etanoli, natriumhypokloriitti ja vesi), jolloin suodatin uppoaa liuokseen sopivasti. Jos liuosta on liikaa, siemenet karkaavat kellumalla. Käytä apuna pieniä petrimaljoja, joista liuoksia on helppo lisätä pipetillä. Liota siemeniä etanolissa noin yksi minuutti, pidempi aikakaan ei haittaa. Siirrä sihti pinsettien avulla toiseen petrimaljaan, jossa siemeniä liotetaan noin kaksi minuuttia natriumhypokloriitissa. Huuhtelee siemeniä kolmannessa petrimaljassa steriilillä vedellä noin kolme kertaa pipettiä apuna käyttäen. Jos liuos ei valu suodattimen läpi, pohjan koskettaminen maljalle tai liuokseen auttaa. Siirrä sihti petrimaljalla olevalle imupaperille ja anna neste-typpeen menevien siementen pinnan kuivua. Kontrollit voi maljata heti. Aikaa kuivumiseen menee noin 30 minuuttia. Siemenet ovat pintakuivia, kun ne eivät enää tartu pinsetteihin tai folioon. Jaa siemenet pinsettien avulla kontrolleriin maljoille sekä testieriin folioille, jotka menevät kryoputkiin. Taittele foliot varovasti pinseteillä.

Siirrä putket styroksisessa kylmälaukussa olevaan nestetyypeen pitkävartisilla pinseteillä. Tarpeen mukaan putkia pidetään noin tunti kylmälaukussa tai siirretään nestetyypitankkiin. Sulata putket 40 °C:ssa vesihauteessa 1–3 minuuttia. Vaihtelu sulatusajassa riippuu siitä, sattuuko putki ensimmäiseksi vai viimeiseksi siirretyistä putkista ja montako putkea kerralla siirretään. Kasvatusalusta valitaan tarpeen mukaan.

Liite 5. Siementen itämistulokset viikoittain ja kasvuvaiheittain. (A) ensimmäinen erä, (B) toinen erä, (KT) pakastamaton kontrolli, (LN) nestetyppipakastettu, (sis.kl.1) sisarkloonin 1, (sis.kl.2) sisarkloonin 2.

LAJIKE / JALOSTE	KT / LN	2 vko %	3 vko %	4 vko %	5 vko %
Sirkkajuuri näkyvissä					
'Haaga' A	KT	36	26	14	6
'Haaga' A	KT	34	20	4	2
'Haaga' A	KT	36	20	6	6
'Haaga' A	LN	42	18	16	8
'Haaga' A	LN	26	14	6	6
'Haaga' A	LN	32	22	12	6
'Haaga' B	KT	16	20	6	4
'Haaga' B	KT	24	14	6	4
'Haaga' B	KT	38	14	6	8
'Haaga' B	LN	40	12	2	4
'Haaga' B	LN	38	8	6	2
'Haaga' B	LN	32	10	8	2
Haaga sis.kl.1	KT	54	36	14	10
Haaga sis.kl.1	KT	50	30	18	24
Haaga sis.kl.1	KT	46	28	12	10
Haaga sis.kl.1	LN	52	38	18	16
Haaga sis.kl.1	LN	36	34	12	10
Haaga sis.kl.1	LN	38	24	10	6
St. Michel sis.kl.2 A	KT	62	12	10	2
St. Michel sis.kl.2 A	KT	70	20	4	12
St. Michel sis.kl.2 A	KT	52	20	6	6
St. Michel sis.kl.2 A	LN	84	10	6	2
St. Michel sis.kl.2 A	LN	66	4	4	2
St. Michel sis.kl.2 A	LN	64	14	10	0
St. Michel sis.kl.2 B	KT	72	8	2	2
St. Michel sis.kl.2 B	KT	52	14	4	4
St. Michel sis.kl.2 B	KT	68	4	2	2
St. Michel sis.kl.2 B	LN	62	6	4	4
St. Michel sis.kl.2 B	LN	66	2	2	4
St. Michel sis.kl.2 B	LN	60	12	6	4

LAJIKE / JALOSTE	KT / LN	2 vko %	3 vko %	4 vko %	5 vko %
Vihreät sirkkalehdet näkyvissä					
'Haaga' A	KT	0	22	16	18
'Haaga' A	KT	0	22	28	12
'Haaga' A	KT	2	24	28	20
'Haaga' A	LN	2	34	34	30
'Haaga' A	LN	0	20	24	6
'Haaga' A	LN	2	14	20	14
'Haaga' B	KT	0	6	18	12
'Haaga' B	KT	0	12	22	10
'Haaga' B	KT	0	26	30	16
'Haaga' B	LN	0	34	28	8
'Haaga' B	LN	0	28	22	12
'Haaga' B	LN	0	22	16	18
Haaga sis.kl.1	KT	0	32	38	28
Haaga sis.kl.1	KT	0	28	32	14
Haaga sis.kl.1	KT	0	18	32	30
Haaga sis.kl.1	LN	0	18	40	26
Haaga sis.kl.1	LN	0	18	8	20
Haaga sis.kl.1	LN	0	20	24	18
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	44	48	40
St. Michel sis.kl.2 A	KT	4	56	66	52
St. Michel sis.kl.2 A	KT	2	40	44	42
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	64	68	68
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	56	44	26
St. Michel sis.kl.2 A	LN	2	50	54	42
St. Michel sis.kl.2 B	KT	2	54	60	38
St. Michel sis.kl.2 B	KT	2	36	36	22
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	58	60	34
St. Michel sis.kl.2 B	LN	4	50	48	20
St. Michel sis.kl.2 B	LN	2	52	42	26
St. Michel sis.kl.2 B	LN	2	52	46	26

LAJIKE / JALOSTE	KT / LN	2 vko %	3 vko %	4 vko %	5 vko %
Albiinosirkkalehdet näkyvissä					
'Haaga' A	KT	0	0	2	6
'Haaga' A	KT	0	0	2	0
'Haaga' A	KT	0	4	4	2
'Haaga' A	LN	0	2	2	0
'Haaga' A	LN	0	0	0	0
'Haaga' A	LN	0	2	2	2
'Haaga' B	KT	0	0	2	0
'Haaga' B	KT	0	2	4	0
'Haaga' B	KT	0	4	2	0
'Haaga' B	LN	0	2	4	0
'Haaga' B	LN	0	8	6	0
'Haaga' B	LN	0	8	4	0
Haaga sis.kl.1	KT	0	6	8	6
Haaga sis.kl.1	KT	0	2	6	4
Haaga sis.kl.1	KT	0	2	8	8
Haaga sis.kl.1	LN	0	2	4	4
Haaga sis.kl.1	LN	0	0	2	2
Haaga sis.kl.1	LN	0	4	6	4
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	8	8	6
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	2	2	0
St. Michel sis.kl.2 A	KT	2	4	2	4
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	10	10	6
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	10	8	0
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	6	6	0
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	8	6	0
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	8	8	0
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	4	2	0
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	12	12	0
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	14	10	2
St. Michel sis.kl.2 B	LN	2	8	6	2

LAJIKE / JALOSTE	KT / LN	2 vko %	3 vko %	4 vko %	5 vko %
Kärkisilmu näkyvissä					
'Haaga' A	KT	0	0	10	16
'Haaga' A	KT	0	2	12	32
'Haaga' A	KT	0	2	8	18
'Haaga' A	LN	0	0	12	24
'Haaga' A	LN	0	4	12	30
'Haaga' A	LN	0	4	14	26
'Haaga' B	KT	0	4	8	16
'Haaga' B	KT	0	4	6	20
'Haaga' B	KT	0	0	12	24
'Haaga' B	LN	2	0	16	36
'Haaga' B	LN	0	0	10	24
'Haaga' B	LN	0	0	14	18
Haaga sis.kl.1	KT	0	0	12	32
Haaga sis.kl.1	KT	0	0	8	20
Haaga sis.kl.1	KT	0	0	6	14
Haaga sis.kl.1	LN	0	0	4	20
Haaga sis.kl.1	LN	0	0	10	22
Haaga sis.kl.1	LN	0	0	10	18
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	0	8	16
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	2	14	22
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	0	8	6
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	4	8	6
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	0	18	24
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	4	8	26
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	0	2	20
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	2	10	24
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	4	4	30
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	0	4	30
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	0	8	28
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	0	14	34

LAJIKE / JALOSTE	KT / LN	2 vko %	3 vko %	4 vko %	5 vko %
Ruskea / kuollut sirkkataimi					
'Haaga' A	KT	0	2	2	2
'Haaga' A	KT	0	0	0	2
'Haaga' A	KT	0	0	0	2
'Haaga' A	LN	0	0	0	2
'Haaga' A	LN	0	0	0	0
'Haaga' A	LN	0	0	0	0
'Haaga' B	KT	0	0	0	2
'Haaga' B	KT	0	0	0	4
'Haaga' B	KT	0	0	0	4
'Haaga' B	LN	0	0	0	4
'Haaga' B	LN	0	0	2	8
'Haaga' B	LN	0	0	6	10
Haaga sis.kl.1	KT	0	0	0	2
Haaga sis.kl.1	KT	0	0	0	2
Haaga sis.kl.1	KT	0	0	0	2
Haaga sis.kl.1	LN	0	0	0	0
Haaga sis.kl.1	LN	0	0	0	0
Haaga sis.kl.1	LN	0	0	0	4
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	0	0	4
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	0	0	4
St. Michel sis.kl.2 A	KT	0	0	2	4
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	0	0	6
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	0	0	20
St. Michel sis.kl.2 A	LN	0	0	0	10
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	0	2	10
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	0	2	10
St. Michel sis.kl.2 B	KT	0	0	2	4
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	0	0	14
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	0	2	14
St. Michel sis.kl.2 B	LN	0	0	2	8