

# **KUUSEN (*PICEA ABIES*) KRYOPRESERVAATIOMENETELMÄN KEHITTÄMINEN**

Susanna Ahola  
Maisterintutkielma  
Helsingin yliopisto  
Maataloustieteiden laitos  
Kasvinjalostus  
2014

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY  
OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Susanna Ahola			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Kuusen ( <i>Picea abies</i> ) kryopreservaatiomenetelmän kehittäminen			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kasvinjalostus			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Lokakuu 2014	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 59 s.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Kryopreservaatio on tekniikka, jossa elävää materiaalia säilötään nestetyypeen. Oikeilla suoja-ainepitoisuuksilla saadaan materiaali selviämään äärimmäisestä lämpötilasta ja kasvamaan myös sulatuksen jälkeen. Tässä tutkimuksessa etsittiin parempaa menetelmää kuusen alkiontuottokykyisen solukon kryopreservointiin. Kuusen alkiontuottokykyisen solukon säilömisellä pyritään suojaamaan arvokasta geenimateriaalia menetelmällä, joka ei vaadi toimenpiteitä säilytyksen aikana eikä aiheuta solukossa geneettisiä muutoksia. Kuusen jalostusykli vaatii useita vuosia, jonka aikana solukko viljelmät hävittäisivät vähitellen elinkykensä. Kryopreservaation aikana yksilöitä pystytään testaamaan kenttäolosuhteissa ja parhaimmista yksilöistä saadaan materiaalia jatkojalostukseen tai massamonistukseen.</p> <p>Tässä tutkielmassa tutkittiin neljää eri menetelmää, joiden avulla pyrittiin löytämään paras esikäsittely- ja esijäähdytysmenetelmä. Esikäsittelyinä olivat maljaviljely nousevassa sokeripitoisuudessa ja liemiviljely. Esijäähdytysmenetelmät edustivat kryopreservaation hitaan jäähdytyksen menetelmiä. Toiseen menetelmistä tarvittiin jäähdytykseen nestetyypeä, kun taas toinen vaati säilytystä <math>-80^{\circ}\text{C}</math> pakastimessa. Näiden menetelmien ohella tutkittiin menetelmää, jossa esikäsittelyalustalle lisättiin myös kasvihormoni ABA:a. Lisäksi parhaaksi osoittautuneesta menetelmästä näytteiden DNA:sta tutkittiin mikrosatelliittien avulla ettei siinä tapahtunut somaklonaalista muuntelua. Näytteistä tutkittiin myös kryopreservaation mahdollista vaikutusta telomeereihin.</p> <p>Tutkimuksessa löytyi selvästi paras menetelmä, joka koostui maljalla esikasvatuksesta ja nestetyyppellä tapahtuneesta esijäähdytyksestä. Tällä menetelmällä saatiin 89 % linjoista kasvamaan uudelleen sulatuksen jälkeen.</p> <p>Menetelmä ei aiheuttanut somaklonaalisia muutoksia, eivätkä näytteiden telomeerit lyhentyneet kryopreservaation seurauksena.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Kuusi, kryopreservaatio, solukko viljely, telomeerit, somaklonaalinen variaatio			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työtä ohjasivat tohtori Tuija Aronen, tohtori Saila Varis ja professori Helena Korpelainen			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Susanna Ahola			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Developing a cryopreservation method for Norway spruce ( <i>Picea abies</i> )			
Oppiaine — Läroämne — Subject Plant breeding			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year October 2014	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 59 p.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Cryopreservation is a technique where living material is preserved in liquid nitrogen (LN). With right levels of cryoprotectants it is possible to recover the material from extremely low temperature. This study's aim was to develop a better method for cryopreservation of embryogenic cultures of Norway spruce. The purpose of preserving the embryogenic cultures is to maintain the valuable genetic material. Cryopreservation is a technique which doesn't demand actions while the samples are in LN. Also it doesn't cause any somaclonal variation.</p> <p>The breeding of spruce takes several years, during which tissue culture would lose their embryogenetic potential. With cryopreservation it would be possible to do field trials while the tissue is preserved in LN. After the trials the best material could be recovered and used for breeding or mass production.</p> <p>This study concluded on four different treatments. The tested two methods for pre-treatments were tissue culture on solid media in growing sugar concentration and liquid media with high sugar content. For pre-cooling the two methods were considered to be slow cooling methods. The other one uses LN for the pre-cooling and the other needs only a -80°C freezer. In addition to these the effect of plan hormone ABA to cryopreservation results was studied. The best proved method was tested for somaclonal variation with microsattelites. The effect of cryopreservation to telomeres was studied using the Southern Blot technique.</p> <p>The clear best technique in this study proved to be pre-treatment on solid medium and pre-cooling using liquid nitrogen. The survival of samples with this method was 89 %. No sign of somaclonal variation or shortening of the telomeres were detected.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Norway spruce, cryopreservation, tissue culture, telomeres, somaclonal variation			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisors: PhD Tuija Aronen, PhD Saila Varis and Professor Helena Korpelainen			

## Sisällys

<b>LYHENTEET</b> .....	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 TAUSTA</b> .....	<b>8</b>
2.1 Kuusen merkitys Suomen metsätaloudessa .....	8
2.2 Kuusen somaattinen embryogeneesi .....	9
2.3 Kryopreservaatoin teoria .....	12
2.4 Kryopreservaatoin vaikutukset solutasolla .....	12
2.5 Kryopreservaatiotekniikat .....	14
2.6 Kuusen kryopreservatio .....	15
2.7 Abskissihapon merkitys kryopreservaatiossa .....	16
2.8 Somaklonaalinen variaatio .....	16
2.9 Telomeerit .....	17
<b>3 TAVOITTEET</b> .....	<b>18</b>
<b>4 MATERIAALI JA MENETELMÄT</b> .....	<b>19</b>
4.1 Kokeessa käytetty materiaali .....	19
4.2 Kryopreservaatiosäilytys .....	21
4.3 Maturaatiosäilytys .....	24
4.4 ABA-koe .....	25
4.5 FDA-värijäys .....	25
4.6 DNA-eristys .....	26
4.7 Mikrosatelliitit .....	27
4.8 Telomeerit .....	27
4.9 Tilastollinen analyysi .....	28
<b>5 TULOKSET</b> .....	<b>29</b>
5.1 FDA-värijäys .....	29
5.2 Kryopreservatio .....	30
5.3 Kasvunopeus .....	34
5.4 Maturaatiosäilytys .....	36
5.5 ABA-koe .....	38
5.6 Telomeerit .....	41
5.7 Mikrosatelliitit .....	43

<b>6 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>44</b>
<b>6.1 Kryopreservaaation onnistuminen .....</b>	<b>44</b>
<b>6.2 Maturaatiotulokset.....</b>	<b>45</b>
<b>6.3 ABA:n vaikutus kryopreservaatioon .....</b>	<b>46</b>
<b>6.3 Geneettinen stabilisuus .....</b>	<b>47</b>
<b>6.4 Telomeerit .....</b>	<b>48</b>
<b>7 JOHTOPÄÄTÖKSET .....</b>	<b>49</b>
<b>KIITOKSET .....</b>	<b>50</b>
<b>LÄHTEET .....</b>	<b>51</b>

**LYHENTEET**

ABA	Abskissihappo
BA	Bentsyyliadeniini (sytokiniini)
CTAB	Heksadekyylitrimetyyliammoniumbromidi (C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> NBr)
DIG	Digoksigeniini
DNA	Deoksiribonukleinihappo
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
FDA	Fluoreseiinidiasetaatti
Metla	Metsäntutkimuslaitos
PEG	Polyetyleeniglykoli
PVP	Polyvinyylipyrrolidoni
SE	Somaattinen embryogeneesi
2,4-D	2,4-dikloorifenoksietikkahappo (synteettinen auksiini)

## 1 JOHDANTO

Kuusi (*Picea abies*) on Suomen metsätaloudessa erittäin tärkeä puulaji. Sitä käytetään paljon paperi- ja selluteollisuuden raaka-aineena. Kuusi soveltuu rakennusmateriaaliksi ja sitä käytetään myös viherrakentamisessa. Etenkin muuttuvassa ilmastossa on tärkeää, että myös metsien suojele turvataan. Tärkeä tekijä tässä on metsätuotannon tehostaminen optimoiduilla jalostusohjelmilla.

Moderni biotekniikka tuo uusia mahdollisuuksia kuusen viljelyketjuun. Kasvattamalla alkiontuottokykyistä (somaattinen embryogeneesi, SE) solukkoa on mahdollista saada aikaan lukuisia kopioita halutuista puuyksilöistä. Näin saadaan säilöttyä arvokasta geeniperimää ja turvataan myös lisäystaimien tuotanto. Solukkoviljely on kuitenkin aikaa vievää ja pitkällä aikavälillä solukoissa voi tapahtua muutoksia, eli somaklonaalista vaihtelua (Bairu ym. 2011). Solukkoviljelyyn voidaankin lisätä kryopreservatio, jossa elävää materiaalia säilötään nestetyyppien. Nestetyypissä näytteet ovat äärimmäisen alhaisessa lämpötilassa (-196°C), jolloin niiden biologisen aktiivisuuden tulisi olla täysin pysähdyksissä. Solukkoa on kuitenkin suojeltava jäätymiseltä, jotta se olisi vielä sulattamisen jälkeen elinkelpoista.

Tämän tutkielman käytännön osuus suoritettiin Metsäntutkimuslaitoksen (Metla) Punkaharjun toimipisteessä lukuun ottamatta mikrosatelliittianalyysiä, joka suoritettiin Vantaan toimipisteessä.

Tämän maisterintutkielman tarkoituksena oli tutkia ja kehittää Metsäntutkimuslaitoksen kuusen kryopreservatiomenetelmää. Aikaisemmin käytetty kryopreservatiomenetelmä ei ollut tuonut tarpeeksi hyviä eloonjäämisprosentteja. Tämän jälkeen kuusella oli siirrytty männylle optimoituun kryopreservatiomenetelmään, jonka toimivuudesta kuusella ei ollut tietoa. Lisäksi haluttiin testata uusia menetelmiä, jotka voisivat parantaa kryopreservatiotulosta. Tarkoituksena oli myös tarkistaa, ettei käyttöön valittavaan kryopreservatiomenetelmään liittyisi somaklonaalista muuntelua. Lisäksi tutkittiin kryopreservatiion vaikutusta kuusen telomeereihin.

## 2 TAUSTA

### 2.1 Kuusen merkitys Suomen metsätaloudessa

Kuusen kokonaisala Suomen metsistä oli vuonna 2012 30 % (Ylitalo ja Ihalainen 2013). Hakkuupoistuma oli vuonna 2012 yli 20 miljoona kuutiometriä (MetINFO 2014). Kuusen taimia istutettiin vuonna 2012 59 000 hehtaaria (Ylitalo ja Ihalainen 2013). Istutetulla kuusella on iso taimitarhaosuus (Haapanen ja Mikola 2008). Taimitarhat käyttävät jalostettua siementä siemenviljelyksiltä vaihtelevasti siemensatovuosien mukaan. Kuusen hyvinä siemenvuosina myös taimitarhat voivat käyttää enemmän jalostettua siementä lisäystaimien kasvatukseen.

Suomen metsänjalostuksen voidaan katsoa alkaneen 1940-luvun lopulla, kun laadultaan parhaimpia pluspuita alettiin kartoittaa (Haapanen ja Mikola 2008). Kuusen ensimmäiset siemenviljelykset perustettiin 1960-luvulla. Kuusen jalostuksessa yksi suurimmista tavoitteista on kasvattaa runkojen kokoa. Myös runkojen laatuun kiinnitetään huomiota valikoimalla mahdollisimman suoria runkoja. Lisäksi oksatiheys on laadullinen ominaisuus, johon jalostuksessa pyritään vaikuttamaan. Ulkoisten jalostustavoitteiden lisäksi myös ympäristöön liittyvät jalostushyödyt tulevat entistäkin tärkeämmiksi. Myös metsäpuidenjalostuksessa on varauduttava muuttuvaan ilmastoon, jolloin puiden tulisi olla paremmin ympäristöön mukautuvia. Istutetuista taimista osa kuolee ensimmäisten elinvuosien aikana (Saksa ja Nerg 2008). Hallatuhot ja myyrien aiheuttamat vahingot aikaansaavat paljon taimituhoja. Lisäksi myös kuusen tuholaishyönteiset voivat aiheuttaa tuhoja taimivaiheessa. Hallankestävyyteen on mahdollista kiinnittää huomiota myös kuusen jalostusohjelmissä (Haapanen ja Mikola 2008).

Jalostuksen hyödyt on saatu tuotua käytäntöön siemenviljelyksiltä, joista jalostettua siementä myydään taimitarhoille, jotka tuottavat ja myyvät taimia istutettavaksi. Siemenviljelyksillä parhaiksi valituista puista vartetaan uusia yksilöitä tuottamaan siementä. Siementuotantoa viljelyksillä on heikentänyt kuusen huonot kukintavuodet, jolloin siemeniä ei ole saatavilla tarpeeksi. Lisäksi siementuotantoon ovat vaikuttaneet hyvinäkin satovuosina siemen- ja käpytuhot. Ulkopuolinen siitepöly vaikeuttaa kuusen



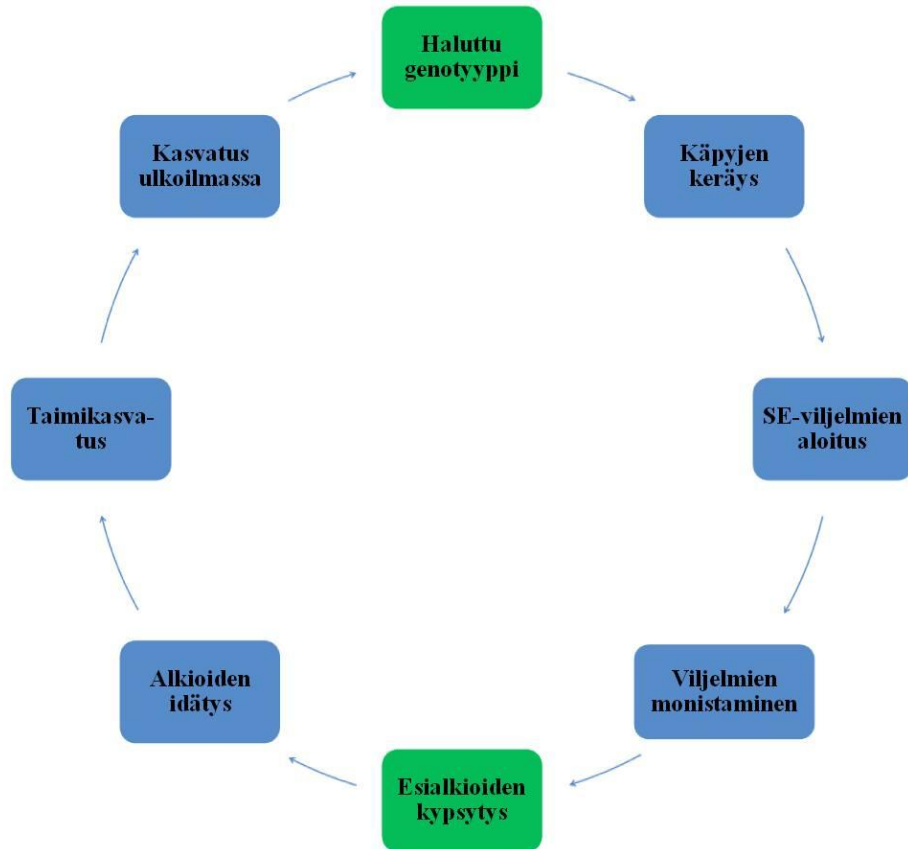
jalostushyödyn täyden potentiaalin saavuttamista. Pakkanen ym. (2000) totesivat, että siemenviljelyksillä ulkopuolisen siitepölyn osuus on suuri, jopa 70 %. Kuusen ollessa yleinen laji Suomen metsissä on kontaminaatioita lähes mahdotonta välttää.

Metsänjalostukseen liittyvä jälkeläistestaus on pitkän aikavälin projekti (Haapanen ja Mikola 2008). Moderneilla tekniikoilla pyritään tuomaan uusia ratkaisuja kuusen jalostukseen (Aronen 2011, Heiska ym. 2012). Somaattinen embryogeneesi tuo mahdollisuuden tuottaa suuren määrän klooneja toivotusta genotyypistä. Uusien yksilöiden tuottaminen on myös nopeampaa kuin siemenviljelyksillä, koska ei tarvitse odottaa puiden vanhenemista siemeniä tuottavaksi.

Kuusen jalostukseen ja tuotantoon liittyy myös koristepuidentuotanto (Nikkanen ym. 2012). Suomesta on löydetty useita kuusen erikoismuotoja, jotka sopivat hyvin viherrakentamiseen. Viherrakentaminen on Suomessa kasvava ala, jonka kasvu on lisännyt tarvetta myös Suomen oloja kestäville havupuiden erikoismuodoille. Solukkoviljelyllä pystyttäisiin tuottamaan nopeammin myös kuusen erikoismuotoja.

## **2.2 Kuusen somaattinen embryogeneesi**

Somaattinen embryogeneesi (SE) on yksi kasvullisen lisäyksen muoto (Aronen 2011). Siinä saadaan siemenestä tuotettua yhden alkion sijaan monta alkiota, jotka ovat kopioita toisistaan. Kuusella somaattinen embryogeneesi luo uusia mahdollisuuksia jalostukseen. Kuusen ja muiden puiden jalostuskielit ovat erittäin pitkiä, jopa kymmeniä vuosia. Testattavia yksilöitä on kasvatettava pitkään, jotta niistä saadaan haluttuja tuloksia. Vanhaksi kasvaneet puut voivat kuitenkin olla sopimattomia kasvulliseen lisäykseen ja niitä voi käyttää enää vain uuden risteytyksen tekoon. Somaattisella embryogeneesillä saadaan kuitenkin säilöttyä halutun puun genotyyppi jalostuskokeiden ajaksi, sillä yhdistämällä SE kryopreservointiin saadaan materiaalia säilöttyä erittäin pitkiä aikoja.



Kuva 1. Somaattinen embryogeneesi von Arnold ym. (2005) mukailleen.

Somaattinen embryogeneesi koostuu monesta vaiheesta (kuva 1) (von Arnold ym. 2005). Ensimmäinen vaihe on hyvien genotyyppien valinta, joka tehdään perustuen puuyksilöiden testaamiseen jälkeläis- tai kloonikokeissa. Näiden yksilöiden kesken tehdään pölytyksiä ja tuloksena syntyneistä kävyistä otetaan talteen laboratorio-oloissa epäkypsiä siemenaiheita. Siemenaiheet pintasteriloidaan ja niiden sisällä olevat alkiot laitetaan solukkoviljelyalustalle, jossa niistä alkaa kasvaa proembryogeenistä solukkoa. Oikealla auksiini- ja sytokiniinipitoisuuksilla saadaan solukko jakautumaan ja tuottamaan uutta solumassaa. Tätä solumassaa voidaan solukkoviljellä tai säilöä kryopreservaatiolla. Solukon sisältämät esialkiot saadaan erikoistumaan ja kypsymään alkioiksi, kun solukko siirretään kasvualustalle, joka sisältää kasvihormoneista vain abskissihappoa (ABA). Alkioiden muodostuttua niitä idätetään hormonittomalla solukkoviljelyalustalla ja juurten muodostuttua ne voidaan siirtää kasvamaan multa. Kaikki syntyneet alkiot ovat kopioita toisistaan ja näin saadaan lisättyä yhtä genotyyppiä erittäin nopeasti.



Kuva 2. Kuusen SE-solukkoa.

SE-solukon viljely ei ole ongelmattonta. Solukon viljely on aloitettu siemenalkioista, jotka voivat olla peräisin tunnetuista, hyviksi arvioituista vanhemmista. Uusien taimien ominaisuudet ovat kuitenkin tuntemattomat. Jälkeläisissä on paljon vaihtelua ja siksi niitä on testattava kenttäolosuhteissa, jotta niiden geneettinen potentiaali tunnetaan. Tämä vaatii kuusella monia vuosia. Pitkäaikainen viljely myös vanhentaa solukkoa, ja se heikentää vähitellen solukon kykyä tuottaa alkioita (Lambardi ym. 2008). Kenttätestauksen aikana solukko voi menettää alkiontuottokykynsä, jolloin on mahdotonta palauttaa saman genotyypin omaavaa alkiontuottokykyistä solukkoa. Tällöin on mahdotonta saada massamonistettua hyviä genotyyppejä. SE-solukon ylläpitäminen solukkoviljelyllä vaatii myös suuren työmäärän ja on siten kallista. Ratkaisu näihin ongelmiin löytyy kryopreservaatiosta. Solukko saadaan säilöttyä nestetyypen, jossa sen biologinen aktiivisuus on pysähdyksissä. Säilöminen ei vaadi merkittäviä toimenpiteitä pitkällä aikavälillä, ja solukkoa voidaan säilöä vuosia muuntumattomana.

### **2.3 Kryopreservaation teoria**

Kryopreservaatio on tekniikka, jossa elävää materiaalia säilötään useimmiten nestetyyppeen, jonka lämpötila on  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Näytteiden solutason biologinen aktiivisuus on tällöin täysin pysähdyksissä.

Kryopreservaatio on hyödyllinen lajeille, joiden siemenet eivät kestä pitkiä säilytysaikoja (Engelmann 2004). Useiden puiden siemenet eivät kestä kuivumista, jolloin niitä ei voida säilyttää perinteisissä siemenpankeissa (Pritchard ja Nadarajan 2008). Tällöin on mahdollista turvata näiden puiden perimä kryopreservaatiolla. Kryopreservaatioon soveltuva materiaali on hyvin monipuolista (Reed 2008). Erilaisia tekniikoita on kehitetty erilaisille solukkoviljelmille, erilaistuneille kasvinosille, siemenille ja siitepölylle.

Kryopreservaatiota käytetään myös kasvullisesti lisättävien kasvien geeniperimän turvaamiseen (Engelmann 2004). Esimerkiksi perunan geeniperimän turvaamiseen sovelletaan myös kryopreservaatiota, koska sen tuottamat siemenet ovat hyvin heterotsygoottisia, jolloin niiden geneettinen arvo säilytystä varten on pieni (Kaczmarczyk ym. 2011). Perunalla kryopreservaatiota on myös käytetty puhtaan lisäysmateriaalin tuottamiseen, jolloin äärimmäinen kylmyys tappaa pakastettavista näytteistä taudinaiheuttajat.

Kryopreservaatiota käytetään myös paljon sperman säilömiseen niin eläimillä kuin ihmisilläkin (Benson ym. 2012). Myös eläinalkioita on mahdollista kryopreservoida.

### **2.4 Kryopreservaation vaikutukset solutasolla**

Äärimmäisen matalissa lämpötiloissa solut eivät selviäisi elossa ilman suojatoimia. Solut ja etenkin kasvisolut ovat suurelta osin vettä, mikä aiheuttaa ongelman kryopreservaatiossa (Benson 2008). Vesimolekyylien fysikaaliset ominaisuudet johtavat siihen, että jäätynyt vesi muodostaa kristallirakenteita, jolloin se vie enemmän tilaa kuin sama määrä nestemäistä vettä. Soluissa ja soluväleissä veden jäätyminen ja siten laajentuminen aiheuttaa solun rikkoutumisen ja kuoleman. Kasvit kuitenkin selviävät

myös luonnossa äärimmäisissä lämpötiloissa. Niille onkin kehittynyt oma mekanisminsa selviytyä jäätymiseltä. Näiden mekanismien tutkiminen on auttanut myös kryopreservaation kehittämistä.

Kryopreservaatiossa on tärkeää erottaa solun sisäinen ja ulkoinen jäätyminen. Etenkin solunsisäinen jäätyminen on hyvin haitallista soluille ja johtaa usein solun kuolemaan (Benson 2008). Jään kristallirakenne kykenee rikkomaan soluseinän. Myös veden kulkeutuminen ulos solusta ja siitä johtuva solun kutistuminen voi johtaa solun kuolemaan. Lisäksi jään muodostuminen poistaa solusta vapaata vettä, jolloin solu konsentroituu. Solun liukoisten aineiden konsentroituuessa ne voivat aiheuttaa solulle vahinkoa (Muldrew ym. 2004). Toisaalta solun konsentroituminen vähentää solun vesimolekyylejä, jotka jäätyessään muodostaisivat jääkristalleja (Benson 2008).

Luonnossa kasvit selviävät kovistakin pakkasasteista. Kylmään tottuneita ja lepotilassa olevia kasvin osia, kuten silmuja, voidaankin kryopreservoida myös ilman suojatoimia (Reed 2008). Luonnolliseen kylmänkestävyyteen vaikuttaa moni asia. Kylmänkestävissä puiden soluissa on todettu olevan suuria määriä sokereita (Hirsch 1987). Sittemmin kylmänkestävyyttä on tutkittu lisää ja soluihin on todettu kerääntyvän sokerien lisäksi muita molekyylejä, kuten antioksidantteja, proliinia ja betaiinia (Benson 2008). Myös solun hormonipitoisuudet vaihtelevat ja soluseinän rakenne muuttuu, kun kasvi saavuttaa kylmänkestävyyden.

Kryopreservaatiossa käytettävät suoja-aineet ovat aineita, joiden lisäys kryopreservaatiomenetelmään lisää huomattavasti selviämistä jäätymisestä (Muldrew ym. 2004). Suoja-aineet voidaan jakaa kahteen kategoriaan; solut läpäiseviin ja läpäisemättömiin. Solut läpäisevät suoja-aineet ovat pieniä ja epäionisia. Ne liukenevat hyvin veteen alhaisissakin lämpötiloissa, eivätkä ne ole toksisia solulle. Niiden suojaava vaikutus perustuu siihen, että korkeissa suoja-ainepitoisuuksissa jäätä muodostuu vähemmän. Lisäksi läpäisevät suoja-aineet toimivat liuotteena suoloille, jolloin suolojen konsentroituminen ei vahingoita solua. Läpäiseviä suoja-aineita ovat esimerkiksi DMSO ja glyseroli (Lambardi ym. 2008). Läpäisevät suoja-aineet ovat tärkeitä etenkin hitaassa jäädyttämisessä. Läpäisettömät suoja-aineet suojaavat taas paremmin nopeassa lämmön laskussa. Ne ovat usein pitkäketjuisia polymeereja, joilla on suuri osmoottinen vaikutus. Niiden toiminta perustuu siihen, että ne kuivaavat soluja ennen jäätymistä

(Muldrew ym. 2004). Lämpäisemättömiä suoja-aineita ovat esimerkiksi polyetyleeniglykoli (PEG) ja sakkaroosi (Lambardi ym. 2008).

## 2.5 Kryopreservaatiotekniikat

Kaikkea kryopreservoitavaa materiaalia ei ole välttämätöntä suojata erikoiskeinoin (Engelmann 2004). Siemenet, joiden kosteusprosentti on alhainen, voidaan kryopreservoida sellaisenaan. Lisäksi luonnollisen kylmänkestävyyden omaavat kasvinosat, kuten lepotilassa olevat silmut, voidaan kryopreservoida ilman muita käsittelyjä. Usein kuitenkin kryopreservaatioprosessissa tarvitaan jonkinlaisia suoja-aineita, jotta materiaali säilyisi elävänä myös sulatuksen jälkeen. Kryopreservaatiotekniikat voidaan jakaa klassisiin eli hitaan jäähdytyksen tekniikoihin ja vitrifikaatioon perustuviin.

Klassisena kryopreservaatiomenetelmänä voidaan pitää tekniikkaa, jossa lämpötilaa lasketaan ensin kontrolloidusti haluttuun lämpötilaan, jonka jälkeen näyte säilötään nestetyyppeen (Engelmann 2004). Menetelmä sopii etenkin solukkoviljelmien ja solususpensioiden kryopreservoimiseen. Menetelmän tarkoituksena on estää solunsisäisen jään muodostuminen. Tämä perustuu solun osmoottiseen säätelyyn ja veden poistoon soluista (Reed ja Uchendu 2008). Jää muodostuu solun sisuksen sijaan suoja-aineliuoksessa solujen ulkopuolisessa tilassa. Sytoplasma pysyy jäätyttömänä konsentraatioeron vuoksi. Myös kasvien vahvat soluseinät suojaavat solunsisäiseltä jäätymiseltä. Jäätyneen jatkuessa solunsisäinen vesi jatkaa kulkua solun ulkopuolelle tasatakseen konsentraatioeroja, jotka syntyvät jäätyneen takia. Tämä johtaa edelleen sytoplasman konsentroitumiseen, joka taas vähentää jäätyneen riskiä. Kun haluttu lämpötila on saavutettu, materiaali upotetaan nestetyyppeen. Tällöin soluissa jäljellä olevan veden tulisi vitrifikoitua, eli muuttua kiinteäksi ilman kristallirakenteita (Reed ja Uchendu 2008).

Eri lajien hitaan jäähdytyksen kryopreservaatioprotokollat ovat eroavia, mutta peruseriaatteet ovat samat. Menetelmät koostuvat näytteiden esikasvatuksesta, suoja-aineiden lisäämisestä, lämpötilan laskemisesta kontrolloidusti, nestetyyppeen säilömisestä, nopeasta sulatuksesta ja uudesta kasvuunlähdestä (Engelmann 2004).

Vitrifikaatio tuli perinteisien kryopreservaatiomenetelmien rinnalle 1990-luvulla (Sakai ym. 1990). Vitrifikaatio sopii hyvin monimutkaisemman materiaalin, kuten alkuiden ja versojen kryopreservoimiseen (Engelmann 2004). Menetelmä perustuu veden nestemäisen muodon muuttumiseen amorfiseksi aineeksi (Sakai ym. 2008). Nopealla lämpötilan laskemisella ja suoja-aineiden avulla vesi ei ehdi muodostaa solua vahingoittavia kristallirakenteita, vaan muuttuu lasimaiseksi. Lasi on käytännössä erittäin viskoosia nestettä, jonka fyysiset ominaisuudet ovat kuin kiinteällä aineella (Buitink ja LePrince 2004). Vitrifikaatiossa käytetään usein yhtenä suoja-aineena glyserolia, joka on hyvin viskoosi aine (Sakai 2004). Lisäksi menetelmään voi kuulua solujen kuivattaminen ennen kryopreservaatiota erilaisilla menetelmillä (Engelmann 2004).

## **2.6 Kuusen kryopreservaatio**

Kuusen kryopreservaatio tapahtuu usein klassisin menetelmin, jolloin lämpötilaa lasketaan hitaasti (Charest ja Klimaszewska 1995). Suoja-aineena käytetään usein DMSO:ta (Norgaard ym. 1993, Find ym. 1998). Käytetty DMSO-pitoisuus on usein 5-10 %:n luokkaa. Esikäsittelyä on käytetty usein kasvatusta sorbitolia sisältävällä maljalla (Norgaard ym. 1993) tai liemiviljelyssä (Find ym. 1998). Hazubska-Przybyl ym. (2013) käyttivät esikäsittelyä myös solukon steriiliä ilmakeivästä ja esikasvatusmaljoilla nousevaa sokeripitoisuutta. Nousevalla sokeripitoisuudella vähennetään solujen vesikonsentraatiota osmoosin avulla. Esijäähdytykseen on käytetty usein ohjelmoituja pakastimia, jotka käyttävät nestetyyppiä jäähdytyksessä (Norgaard ym. 1993, Charest ja Klimaszewska 1995).

Metsäntutkimuslaitoksen aiempi kuusen kryopreservaatiomenetelmä perustui solususpension kasvattamiseen sorbitolia sisältävässä liuoksessa. Suoja-aineena toimi DMSO. Tällä menetelmällä vain alle 35 % linjoista lähti kasvamaan uudelleen sulatuksen jälkeen.

## 2.7 Abskissihapon merkitys kryopreservaatiossa

Abskissihappo (ABA) on kasvihormoni, jolla on suuri merkitys myös kasvien stressireaktioissa (Rai ym. 2011). Sen on todettu lisäävän myös kasvien sietokykyä kylmälle (Bravo ym. 1998). ABA säätelee solussa vesitasapainoa ja suoja-aineiden tuotosta vastaavien geenien ekspressiota. ABA:n lisäyksen esikasvatusmenetelmiin onkin todettu parantavan kryopreservaatiotuloksia muutamilla lajeilla (*Gentiana scabra*, *Begonia x erythrophylla*, *Picea abies*) (Suzuki ym. 2006, Burritt 2008, Hazubaska-Przybyl ym. 2013).

## 2.8 Somaklonaalinen variaatio

Somaklonaalinen variaatio on muuntelua, joka on peräisin solukkoviljelystä (Larkin ja Scowcroft 1981). Soluissa tapahtuu tällöin mutaatioita useammin kuin luonnossa kasvavalla kasvilla tapahtuisi. Mutaatioilla voi olla vaikutusta solun toimintaan, mutta ne voivat myös jäädä vaikutuksiltaan olemattomaksi (Bairu ym. 2011). Muutoksia voi tapahtua myös kromosomiston lukumäärässä tai järjestäytymisessä. Myös epigeneettisiä muutoksia voi seurata somaklonaalisesta muuntelusta. Ilmiön tarkkaa syytä ei tiedetä. Somaklonaalista variaatiota voidaan käyttää hyödyksi kasvinjalostuksessa, kun halutaan löytää uusia genotyyppejä (Jain 2001). Viljeltäessä soluja tarkoituksena on useimmiten kasvattaa niistä uusia, samanlaisia yksilöitä. Tällöin somaklonaalinen variaatio on erityisen haitallista. Kryopreservointi vähentää tarvetta solukkoviljelylle, jolloin myös somaklonaalisen muuntelun mahdollisuus pienenee. Kuitenkin on varmistettava, ettei kryopreservatio itse tekniikkana aiheuta muuntelua solukossa.

Somaklonaalista muuntelua voidaan tutkia monelta eri kantilta (Bairu ym. 2011). Yksinkertainen tapa on tutkia kasvin morfologiaa. Muutoksia voi näkyä epänormaalina muotona tai värityksenä. Myös koon suuret muutokset voivat olla peräisin somaklonaalisesta muuntelusta. Morfologian perusteella tutkiminen on helppoa, jos muutokset ovat ulkoisesti huomattavia. Usein kuitenkin muutos ei näy ulkoisesti. Muutoksia voi myös etsiä fysiologisilla ja biokemiallisilla menetelmillä. Mutatoituneet kasvit voivat reagoida ulkopuolisiin tekijöihin, kuten kasvihormoneihin tai valoon eri



tavalla. Sytologisilla näytteillä saadaan tutkittua mahdollisia kromosomien lukumäärän, koon tai järjestäytymisen muutoksia. Myös proteiineja ja entsyymejä tarkastelemalla voidaan tutkia somaklonaalisia muutoksia. DNA-sekvenssin muutoksiin päästään kiinni myös biotekniikan avulla. Restriktioentsyymeihin perustuvat RFLP:t olivat ensimmäisiä tapoja tutkia somaklonaalista variaatiota. Myös RAPD- ja AFLP-merkkejä, jotka perustuvat PCR-tekniikkaan, on käytetty tutkimuksessa. RAPD-profiileja on käytetty myös kuusen SE-solukon somaklonaalisen muuntelun tutkimiseen (Fourré ym. 1997). Uusimpia tapoja on käyttää mikrosatelliitteja somaklonaalisen muuntelun tutkimiseen (Bairu ym. 2011). Mikrosatelliitit vaativat tuntemusta tutkittavan kasvin genomista, jotta tarvittavat DNA-alukkeet voidaan rakentaa. Mikrosatelliittianalyysit ovat nykyään yksi tehokkaimmista tavoista tutkia somaklonaalista muuntelua ja niitä on käytetty myös puiden somaklonaalisen muuntelun tutkimiseen (Marum ym. 2009).

Kryopreservaatioissa osa käytettävistä suoja-aineista voi olla isoina pitoisuuksina myrkyllisiä kasveille. Aronen ym. (1999) tutkivat dimetyylisulfoksidin (DMSO) vaikutusta kreikanpihdan (*Abies cephalonica*) embryogeenisen solukon kasvuun. Tutkimuksessa todettiin, että 10 % DMSO-liuoksella käsitellyissä solukkomateriaalissa oli nähtävissä muutoksia RAPD-profiileissa. Kuitenkin kun samalla tavalla käsiteltyä solukkoa kryopreservoitiin ja sulatettiin, ei huomattu muutoksia RAPD-profiileissa. On mahdollista, että kryopreservaatio itsessään poistaa soluja, jotka mutatoituvat DMSO:n vaikutuksesta. Kryopreservaatiosta selviävät usein vain alkioden pääsolut ja paljon vettä sisältävät suspensorisolut kuolevat (Klimaszewska ym. 1992). Näin vähenee mahdollisuus somaklonaaliselle variaatiolle. Somaklonaalisen muuntelun lisäksi solukoissa voi tapahtua muutoksia DNA-tasolla luonnon taustasäteilyn vuoksi (Charest ja Klimaszewska 1995). Todennäköisyys merkittävälle vahingolle on kuitenkin hyvin pieni ja vaatisi useita, jopa tuhansia vuosia.

## 2.9 Telomeerit

Telomeerit ovat kromosomien päissä olevia nukleotiditoistoja, joiden merkitys on suojata kromosomeja ja niiden DNA:ta erityisesti solunjakautumisten aikana (McKnight ym. 2002). Kasveilla telomeerit koostuvat useimmiten kahdeksan nukleotidin (TTTAGGG) toistoista. Tavanomainen DNA-polymeraasientsyymi ei pysty tuottamaan

telomeereja, vaan niitä syntetisoi erityinen telomeraasi-entsyymi. Ilman telomeraasi-aktiivisuutta telomeerit lyhenisivät jokaisen solunjakautumisen yhteydessä. Telomeerien pituus on lajikohtaista. Telomeerien lyhenemisen on havaittu liittyvän eliöiden ikääntymiseen. Telomeerien lyhentyessä kriittiseen pituuteen solut menettävät kykynsä jakautua ja lopulta kuolevat. Pitkäikäisillä männyillä (*Pinus sylvestris*) on todettu, että telomeerien pituudet voivat vaihdella yksilön sisällä (Aronen ja Ryyänen 2012). Koivun (*Betula pendula* Roth) telomeerien on todettu lyhenevän solukko viljelyssä (Aronen ja Ryyänen 2013).

Kryopreservaation vaikutusta telomeereihin on toistaiseksi tutkittu vasta vähän. Honda ym. (2001) totesivat, että kryopreservatio lyhensi silmän epiteelisolujen telomeereja. Perez-Cerezales ym. (2011) totesivat saman ilmiön taimenen spermalla. Toisaalta Carton-Garcia ym. (2013) totesivat ettei kryopreservatio vaikuttanut lyhentävästi keltaotsa-ahvenen (*Sparus aurata*) sperman telomeereihin. Kryopreservaation vaikutuksesta puiden telomeereihin ei ole tähän päivään mennessä julkaistu tutkimustuloksia.

### **3 TAVOITTEET**

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli testata erilaisia kuusen kryopreservaatiomenetelmiä. Tarkoituksena oli löytää menetelmä, joka soveltuu parhaiten Metsäntutkimuslaitoksen kryopreservatiotutkimukseen ja kuusen solukko viljelmien säilyttämiseen. Lisäksi tutkittiin, onko abskissihapon (ABA) lisäämisellä esikasvatusalustaan positiivista vaikutusta kryopreservaation onnistumiseen. Kolmanneksi tutkittiin onko kryopreservatiolla vaikutusta kuusen perimään tarkastelemalla sekä mikrosatelliittimarkkereita että viljelmien telomeerejä.

## 4 MATERIAALI JA MENETELMÄT

### 4.1 Kokeessa käytetty materiaali

Kokeeseen valittiin 27 kuusen alkiontuottokykyistä solukkoviljelylinjaa, jotka tulivat yhdeksästä eri perheestä (taulukko 1). Linjojen kasvatus oli aloitettu vuonna 2012 tehdyistä kontrolloiduista risteytyksistä peräisin olevista siemenalkioista. Risteytykset tehtiin Iitin ja Tammelan siemenviljelyksillä (60°55'N, 26°13'E, 80 m, 60°41'N, 24°02'E, 130 m). Kolmen linjan solukkoviljely oli aloitettu kypsistä siemenistä ja näiden alkiontuottokykyä ei oltu testattu ennen kokeiden aloittamista. Muut linjat valittiin kokeeseen niiden aikaisempien hyvien alkiontuotto-ominaisuuksien perusteella. Solukot kasvoivat LM-kasvualustalla (Litvay ym. 1985), jonka mikro- ja makroravinnemäärät oli puolitetty. Lisäksi alustalle oli lisätty sakkaroosia (0.03 M) ja 10 µM 2,4-D sekä 4 µM BA. Solukkoa ylläpitosiirrettiin uudelle maljalle noin kahden viikon välein, jolloin solukosta siirrettiin vaaleaa ja läpikuultavaa uutta solukkoa tuoreelle maljalle. Solukkomaljat säilytettiin pimeässä kasvatushuoneessa (+20 °C).

Taulukko 1. Kokeeseen valitut 27 linjaa yhdeksästä perheestä ja niiden risteytyspaikkakunnat.  
Linjat 9145, 9130 ja 9110 aloitettu kypsistä siemenistä

Linjanumero	Perhe	Risteytyspaikkakunta
3006	E2515xK805	Iitti
3011	E2515xK805	Iitti
3017	E2515xK805	Iitti
3128	E2853xE231	Iitti
3129	E2853xE231	Iitti
4216	E2853xE231	Iitti
3208	E2853xE330	Iitti
4310	E2853xE330	Iitti
5442	E2853xE330	Iitti
4915	E318xE231	Tammela
4932	E318xE231	Tammela
4934	E318xE231	Tammela
6147	E318xK805	Tammela
6333	E318xK805	Tammela
6375	E318xK805	Tammela
3301	E329xE2089	Iitti
9145	E329xE2089	Iitti
3309	E329xE2089	Iitti
4510	E329xK805	Iitti
9130	E329xK805	Iitti
5602	E329xK805	Iitti
9110	K264xE231	Tammela
4611	K264xE231	Tammela
4659	K264xE231	Tammela
3604	K264xE330	Tammela
5852	K264xE330	Tammela
5859	K264xE330	Tammela

## 4.2 Kryopreservaatiokäsittelyt

Kryopreservaation testaus koostui neljästä eri käsittelystä, jotka kaikki edustivat klassista, hitaaseen jäädytykseen perustuvaa kryopreservaatiota (taulukko 2). Kokeessa testattiin kahta eri esikäsittelymenetelmää ja kahta eri hitaan jäädytyksen menetelmää. Esikäsittelymenetelmät olivat maljamenetelmä ja liemiviljely. Jäädytysmenetelmät olivat Planer- ja Mr. Frosty-pakastus. Jokaista solukkolinjaa testattiin jokaisella menetelmällä ja jokaisesta näytteestä tehtiin kolme toistoa.

Taulukko 2. Kokeessa käytetyt neljä menetelmää ja niistä käytetyt lyhenteet.

Käsittelyt	Lyhenne
1 Maljamenetelmä + Planer- pakastus	MP
2 Maljamenetelmä + Mr. Frosty	MF
3 Liemimenetelmä + Planer- pakastus	LP
4 Liemimenetelmä + Mr. Frosty	LF

Maljamenetelmässä uutta, valkeaa solukkoa siirrettiin kaksi päivää ennen kryopreservaatiota kasvamaan LM-kasvualustalle, jonka sakkaroosipitoisuus oli 0.1 M, joka on korkeampi kuin normaalin kasvualustan sakkaroosipitoisuus (0.03 M). Solukko kasvoi tällä maljalla 24 tuntia, jonka jälkeen se siirrettiin jälleen kasvamaan vuorokaudeksi uudelle LM-kasvualustalle, jonka sakkaroosipitoisuus oli 0.2 M. Näiden kahden päivän esikasvatuksen jälkeen solukko siirrettiin kryopreservaatioputkeen, jonne lisättiin 400 µl LM-perusliuosta ilman hormoneja ja jossa oli 0.4 M sakkaroosia. Tämän jälkeen putkeen pipetoitiin PGD-suojaliuosta (10 % PEG 6000, 10 % glukoosi, 10 % DMSO vesiliuoksessa) suoja-aineeksi. Liuosta pipetoitiin 4 x 100 µl puolen tunnin ajan. Putkia pidettiin suoja-aineen lisäyksen ajan jäällä.

Liemiviljely aloitettiin yhtä vuorokautta ennen pakastusta. Noin 0.8 g alkiontuottokykyistä solukkoa siirrettiin kasvamaan steriiliin erlenmeyer-pulloon, jonne lisättiin 7 ml cryo 1 -liuosta (taulukko 3). Erlenmeyer-pullot siirrettiin kasvamaan 24 tunniksi tasoravistelijaan (100 rpm). Vuorokauden jälkeen pulloihin lisättiin 3 ml

cryo1:cryo2:DMSO(10 %) -liuosta. Tämän jälkeen noin 1.2 ml solukkosuspensiota pipetoitiin kryopreservaatioputkiin, joita pidettiin jäällä.

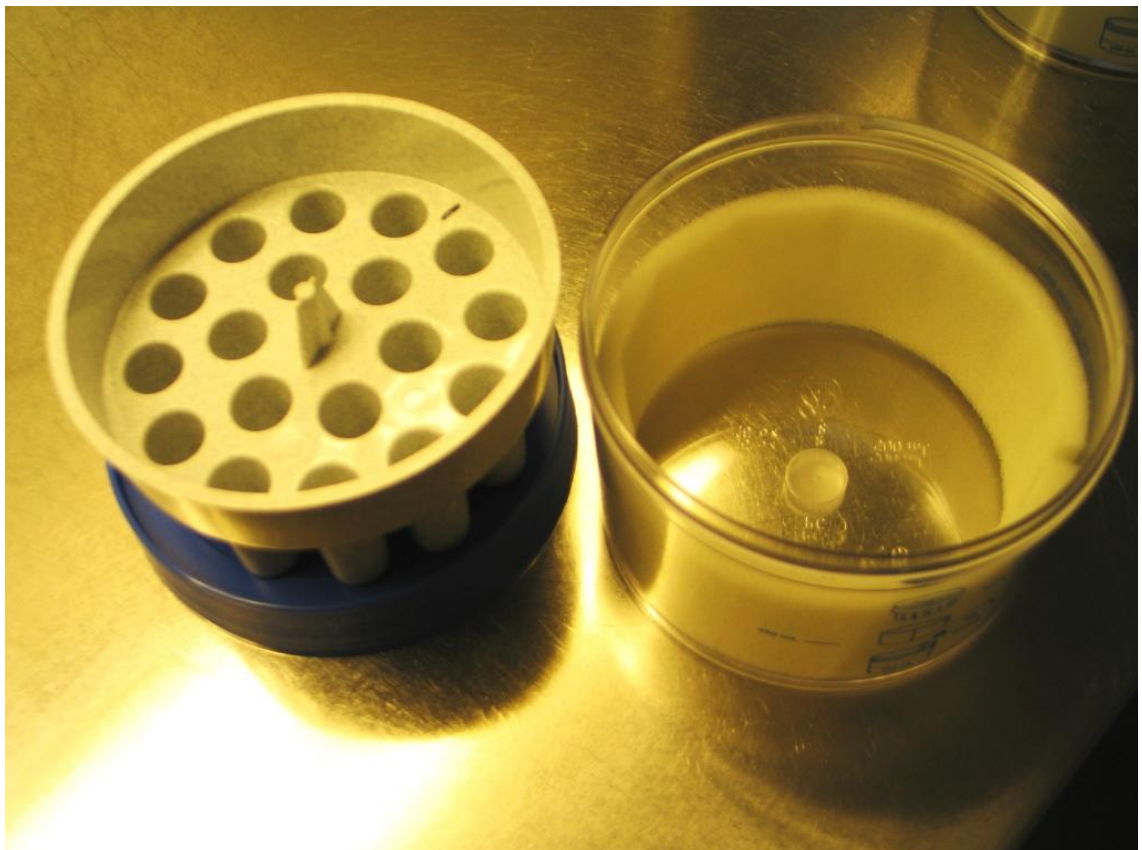
Taulukko 3. Liemiviljelyn cryo-liuoksien ohje. Liuosten perusosa perustuu LM-kasvualustan ohjeeseen.

Liuoksen raaka-aineet	Cryo 1	Cryo 2
10x LM perusliuos (ml/l) (Litvay ym. 1985)	100	200
Kaseiini (g/l)	1.00	2.00
Sakkarooosi (g/l)	20	20
Sorbitoli (g/l)	72.88	145.76
2,4-D (ml/l)	2.00	-
BA (ml/l)	2.00	-
pH	5.7	5.7
Glutamiini (ml/l)	20	20

Hitaan jäähdetyksen menetelmien vertailuun käytettiin ohjelmoitavaa Planer-nestetyyppipakastinlaitetta (Planer, Kryo 10 series III) ja Mr. Frosty- pakastusastiaa (Thermo scientific) (kuvat 3 ja 4). Planer-pakastuslaite tarvitsee pakastukseen nestetyypeä. Hidas jäähditys kestää Planer-laitteella noin neljä tuntia, jonka aikana lämpötila laskee -40 °C:een (10 °C/h). Pakastuksen aikana laite seuraa lämpötilaa kontrollinäytteestä ja pakastuksen jälkeen laite tulostaa seurantainfon pakastumisen onnistumisesta. Mr. Frosty -pakastusastia taas ei käytä jäähditykseen nestetyypeä ja on pienikokoinen. Näytteet asetettiin Mr. Frostyssä astiaan, joka täytettiin isopropanolilla ja siirrettiin kahdeksi tunniksi -80 °C pakkaseen. Valmistajan lupaama jäähditysnopeus on 1 °C/min. Näytteiden lämpötilaa ei seurattu jäähdityksen aikana.



Kuva 3. Planer-pakastin



Kuva 4. Mr. Frosty- pakastusastia

Hitaan jäähtymisen jälkeen kaikki näytteet siirrettiin nestetyypitankkiin. Näytteet olivat nestetyypessä 4-16 päivää. Näytteet sulatettiin siirtämällä ne suoraan nestetyypistä kahdeksi minuutiksi etanolihauteseen, jonka lämpötila oli 38 °C. Tämän jälkeen näytteet seisoivat huoneenlämmössä viisi minuuttia. Näytteet siirrettiin kasvualustalle imupaperin (Whatmann nro 2) kautta. Näytteitä huuhdeltiin imussa büchner-suppilossa. Maljamenetelmällä käsitellyt näytteet huuhdeltiin hormonittomalla LM-liemellä, jonka sakkaroosipitoisuus oli 0.4 M ja liemimenetelmällä käsitellyt näytteet Cryo 1- liemellä. Maljamenetelmän näytteet siirrettiin sulatuksen jälkeen kasvamaan LM-kasvualustalle, jonka sakkaroosipitoisuus oli 0.2 M. Vuorokauden jälkeen imupaperi siirrettiin uudelle LM-kasvualustalle, jonka sakkaroosipitoisuus 0.1 M. Näytteet siirrettiin jälleen vuorokauden jälkeen uudelle LM-kasvualustalle, jonka sokeripitoisuus oli normaali eli 0.03 M. Liemimenetelmällä käsitellyt näytteet siirrettiin heti sulatuksen jälkeen LM-kasvualustalle (0.03 M sakkaroosia), jolla ne kasvoivat 24 tuntia, jonka jälkeen ne siirrettiin jälleen uudelle LM-kasvualustalle.

Kaikki näytteet punnittiin sulatuksen jälkeisenä päivänä maljojen vaihdon yhteydessä. Näytteet kasvoivat maljoilla pimeässä kasvatushuoneessa (+20 °C) kaksi viikkoa. Tämän jälkeen niistä arvioitiin olivatko ne lähteneet kasvuun ja siirrettiin kasvamaan uudelle maljalle. Neljän viikon kasvun jälkeen näytteet punnittiin uudelleen. Kasvua arvioitiin käyttämällä kasvunopeuteen kaavaa:

$$kasvunopeus = \frac{\text{tuorepaino toisella punnituksella}}{\text{tuorepaino ensimmäisellä punnituksella}}$$

### 4.3 Maturaatiotesti

Maturaatio, eli esialkioiden kypsytyks, tehtiin jokaiselle linjalle ennen kryopreservaatiota. Lisäksi maturaatiotesti tehtiin niille linjoille, jotka lähtivät kasvuun kryopreservaatiokäsittelyn jälkeen. Maturaatiossa noin 0.2 g solukkoa otettiin LM-kasvualustalta, jossa se oli saanut kasvaa seitsemän vuorokautta. Solukko suspensoitiin LM-kasvualustaperusteiseen liuokseen ja siirrettiin imupaperille (Whatmann nro 2) Büchner-imun kautta. Imupaperi siirrettiin LM-maturaatioalustalle, joka sisälsi 60 µM



ABA:a. Alkioiden annettiin kehittyä pimeässä kasvatushuoneessa (+20 °C) kaksi kuukautta. Kahden kuukauden jälkeen elinkykyisten alkioiden määrä laskettiin.

#### **4.4 ABA-koe**

Yhdeksälle linjalle (3006, 3128, 4310, 4934, 6375, 3301, 9130, 4611 ja 5852) tehtiin myös koe, jossa esikasvatusalustalle lisättiin 10 µM ABA-hormonia. Näytteistä tehtiin kolme toistoa. Lisäksi kaikista näytteistä tehtiin kontrollit, joiden esikasvatusmaljalle ei lisätty ABA:a. Kontrolleista tehtiin myös kolme toistoa. Näytteiden kryopreservatio tehtiin samalla tavalla kuin esikäsittely maljamenetelmällä. Kaikki näytteet pakastettiin Planer-pakastimella ja sulatettiin viiden päivän kuluttua samalla tavalla kuin edellä kuvatut. Myös kasvua arvioitiin samoin ja maturaatiotesti tehtiin viiden viikon päästä sulatuksesta.

#### **4.5 FDA-värjäys**

FDA-värjäystä (fluoreseiinidiasetaatti) käytettiin solukon elinvoimaisuuden tutkimiseen. FDA tuottaa elävissä soluissa fluoresenssia (Widholm 1972). FDA-värjäys tehtiin linjoille 5602, 9110, 4611, 4659, 3604, 5852 ja 5859. Näytteet otettiin juuri sulatetuista näytteistä, niin että jokaisesta menetelmästä oli yksi näyte FDA-värjäykseen.

FDA-liuoksesta tehtiin asetooniin 0,5 % laimennos, jota laimennettiin jälleen veteen 1:25. Testattavaa solukkoa asetettiin mikroskooppilasille steriilin veden päälle ja tämän jälkeen FDA-laimennosta lisättiin solukon päälle noin kaksi tippaa. Väriä annettiin kehittyä noin 15 minuuttia. Tämän jälkeen näytteitä tarkasteltiin mikroskoopilla käyttäen UV-valoa.

#### 4.6 DNA-eristys

DNA:n eristykseen käytettiin kahta metodia perustuen näytekokoon. DNA:ta eristettiin näytteistä, joita ei ollut pakastettu, jolloin solumateriaalia oli riittävästi isompaan eristykseen. Kryopreservoiduista näytteistä eristettiin DNA:ta ns. 500 mg:n menetelmällä, jos näytettä oli tarpeeksi. Jos solukko ei ollut kasvanut tarpeeksi, käytettiin eristykseen ns. 150 mg:n menetelmää.

500 mg:n menetelmä perustuu Lodhi ym:n (1994) kehittämään tekniikkaan, johon on tehty seuraavia muutoksia: eristyksessä punnittiin noin 200-500 mg alkiontuottokykyistä solukkoa. Solukko jauhettiin käyttämällä avuksi nestetyypeä ja mortellia. Näyte lisättiin 10 ml lämmitettyyn eristyspuskuriin (2 x CTAB, 1 % PVP ja 0.2 % merkaptoetanolii). Näytteitä pidettiin 60 °C vesihauteella 1-2 tuntia. Tämän jälkeen näytteet uutettiin samalla tilavuudella kloroformi- ja isoamyylialkoholiseoksella (24:1). Näytteitä sentrifugoitiin 10000 rpm 15 min. Yläfaasi otettiin talteen ja se lisättiin eristyspuskuriin ja annettiin seistä puoli tuntia vesihauteella (60 °C). Tämän jälkeen tehtiin uutto uudestaan samalla ohjeella. Uuden uuton jälkeen DNA saostettiin kaksinkertaisella tilavuudella kylmää etanolia. Saostunut DNA sentrifugoitiin pohjaan +4 °C 10000 rpm ja 15 min. Tämän jälkeen sakka kaadettiin 2 ml Eppendorf-putkeen, jonne lisättiin etanolia (70 %). Putkia sentrifugoitiin 10000 rpm 2 min. Tämän jälkeen sakat kuivattiin vakuumisentrifugissa. Sakat jätettiin liukenemaan 2xCTAB-puskuriin (2xCTAB) yön yli +37 °C lämpökaappiin. Seuraavana päivänä Eppendorf-putkia pidettiin puoli tuntia +60 °C lämpöhauteessa. Tämän jälkeen näytteet uutettiin kloroformi:isoamyylialkoholiin ja sentrifugoitiin 12 000 rpm 10 min. Yläfaasi lisättiin 2xCTAB-puskuriin (2xCTAB) ja sen annettiin seistä vesihauteessa (+60 °C) puoli tuntia. Uutto toistettiin kerran, jonka jälkeen yläfaasista saostettiin DNA uudessa putkessa käyttäen kylmää etanolia. Eppendorf-putket sentrifugoitiin 5 min 12000 rpm +4 °C. DNA-sakka pestiin vielä etanolilla (70 %) ja kuivattiin vakuumisentrifugissa. DNA liuotettiin TE-puskuriin, joka sisälsi RNAasia (1 µl/ml TE).

Pienemmällä solukkomäärällä toimiva menetelmä on kuvattu aiemmin Doylen (1991) puolesta ja menetelmää on muokattu seuraavasti: eristettävää solukkoa punnitaan noin 50-150 mg. Näyte jauhettiin kuten 500 mg eristyksessä. Jauhettuihin näytteisiin lisättiin 700 µl CTAB-puskuria (2XCTAB, 1 % PVP ja 0.2 % merkaptoetanolii) Uuttamiseen

käytettiin kloroformi:isoamyylialkoholia (25:1). Uuttaminen suoritettiin kolme kertaa, joiden välissä näytettä sentrifugoitiin 5 min 10000 rpm. DNA saostettiin kylmällä isopropanolilla ja DNA sentrifugoitiin pohjaan 15 min 12000 rpm. Pelletti pestiin etanolilla (70 %) ja kuivattiin vakuumisentrifugissa. DNA liuotettiin yön yli TE-puskuriin (pH 8.0), johon oli lisätty proteiinikinaasi-K:ta (50 µg/ml TE) ja RNAasia (10 µg/ml TE). Seuraavana päivänä DNA saostettiin 1 M NaCl, jonka jälkeen näytteisiin lisättiin 125 µl kylmää isopropanolia. Näytteiden annettiin seisoa puoli tuntia, jonka jälkeen DNA sentrifugoitiin pohjaan 15 min 12000 rpm. Pelletit pestiin ja kuivattiin kuten edellä on kuvattu. Lopuksi DNA liuotettiin TE-puskuriin.

Kaikkien näytteiden DNA-pitoisuus mitattiin GeneQuant 2 RNA/DNA Calculator-laitteella (Pharmacia Biotech).

#### **4.7 Mikrosatelliitit**

Kaikista linjoista tehtiin mikrosatelliitti-analyysi. Analyysi tehtiin pakastamattomista näytteistä, joita verrattiin näytteisiin, jotka oli pakastettu käyttämällä maljakasvatusta esikasvatuksessa ja Planer-pakastinta jäähdtyksessä.

Mikrosatelliittianalyysi tehtiin Korkama ym:n (2006) kuvaamalla tavalla. Eristetty DNA monistettiin PCR-laitteella (PTC-100, MJ Research™, Canada). Käytetyt mikrosatelliitit olivat SpAGD1 (SD1) ja SpAGG3 (SG3). PCR:llä monistetut DNA:t ajettiin geelille käyttäen Li-cor-sekvensoijaa (Li-cor, DNA Sequencer Long reader 4200, USA). Geeli valettiin valmistajan ohjeen mukaan 25 cm lasien väliin 0,25 mm paksuisena. Tulokset analysoitiin SAGA-ohjelmistolla (v. 2.1, Li-Cor, USA). Kontrollina käytettiin näytettä, jonka tiedettiin sisältävän etsityt mikrosatelliitit.

#### **4.8 Telomeerit**

Telomeerit analysoitiin viideltä eri linjalta: 4934, 6375, 5852, 4611 ja 3128. Jokaisesta linjasta otettiin kolme näytettä; ennen pakastusta, maljalla esikasvatus ja planer-pakastus sekä yksi kolmesta muusta kryopreservaatiomenetelmästä. Linjalla 5852 kolmas näyte oli liemiviljely esikäsittelynä ja Planer-pakastus jäähdtyksessä, muilla

linjoilla kolmas menetelmä oli maljaesikäsitteily ja Mr. Frosty-jäähdytys. DNA-näyte kerättiin kryopreservoiduista näytteistä toisella punnituskerralla, eli neljä viikkoa sulatuksen jälkeen.

Telomeereja analysoitiin käyttämällä Kilian ym. (1995) kuvaamaa Southern-blot-menetelmää. Menetelmään tehtyjä muutoksia kuvasivat Aronen ja Ryyänen (2012). DNA:ta käytettiin analyysiin 5 µg. DNA digestoitiiin yön yli käyttämällä Mbo1-entsyymiä. Seuraavana päivänä näytteet ajatettiin 0.8 % agarosigeeliin (5 h ja 70V). Geeli depurinoitiin, denaturoitiin ja neutralisoitiin. Tämän jälkeen geelistä siirrettiin DNA märkäblottauksella yön yli nylonkalvolle (Roche). DNA kiinnitettiin kalvolle UV-crosslinkerilla (Bio-link BLX).

Kalvoa esihybridisoitiin ja hybridisoitiin telomeerisekvenssille spesifisen DIG-leimatun koettimen kanssa DIG Eysy-hyb- liuoksella (Roche). Koetin oli valmistettu Arosen ja Ryyänen (2012) kuvaamalla tavalla. Yön yli jatkuneen hybridisoinnin jälkeen kalvo pestiin kahdesti low stringency-puskurilla 2xSSC (3 M NaCl, 0.3 M natriumsitraatti), johon lisättiin 0.1 % SDS (natriumlauryylisulfaatti) ja tämän jälkeen pesu toistettiin vielä kahdesti high stringency- puskurilla (0.5xSSC, 0.1 % SDS, 66 °C). Kalvolta detektoitiin DIG-leimatut koettimet valmistajan ohjeen mukaan (Roche Molecular Biochemicals, DIG application manual for filter hybridisation, 2000). Kalvolla valotettiin röntgenfilmiä, jolta tulos skannattiin ja telomeerit mitattiin käyttäen AlphaImager Imaging system -laitetta (Alpha Innotech Co.).

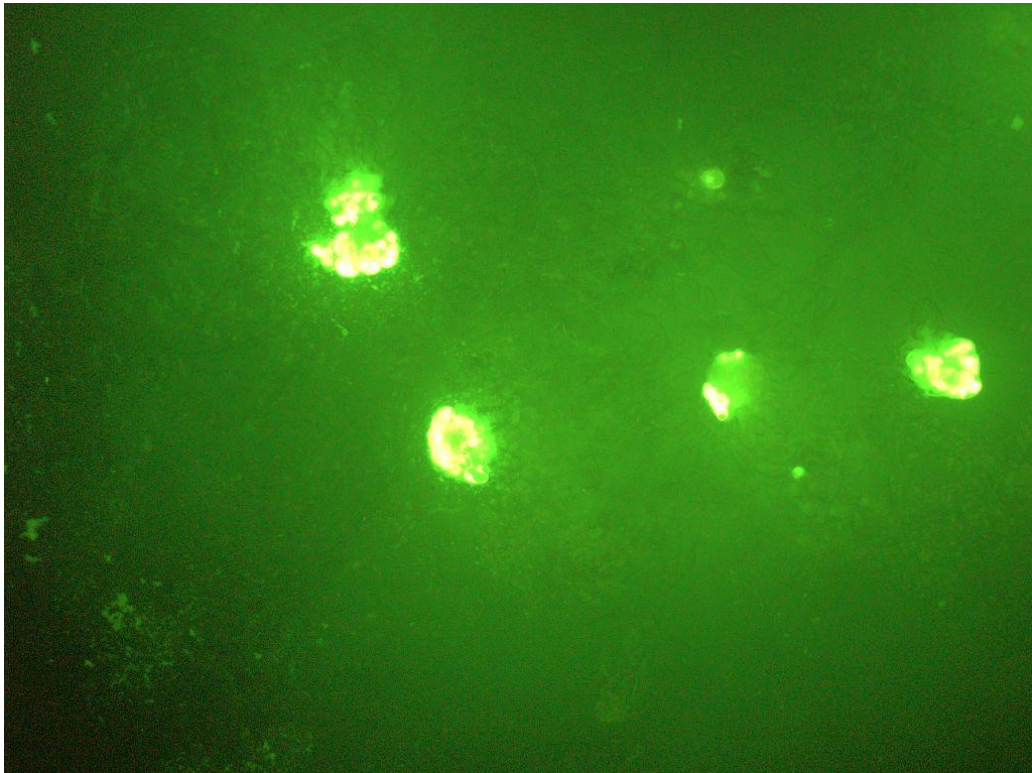
#### **4.9 Tilastollinen analyysi**

Maturaatiotuloksien normaalijakautuneisuutta testattiin Shapiro-Wilkin testillä. Alkiontuotanto ei ollut normaalijakautunut, joten kryopreservaatiomenetelmän vaikutusta maturaatiotuloksiin testattiin Mann-Whitneyn U-testillä. Kaikki tilastolliset analyysit suoritettiin SPSS statistics 22- ohjelmalla (IBM).

## 5 TULOKSET

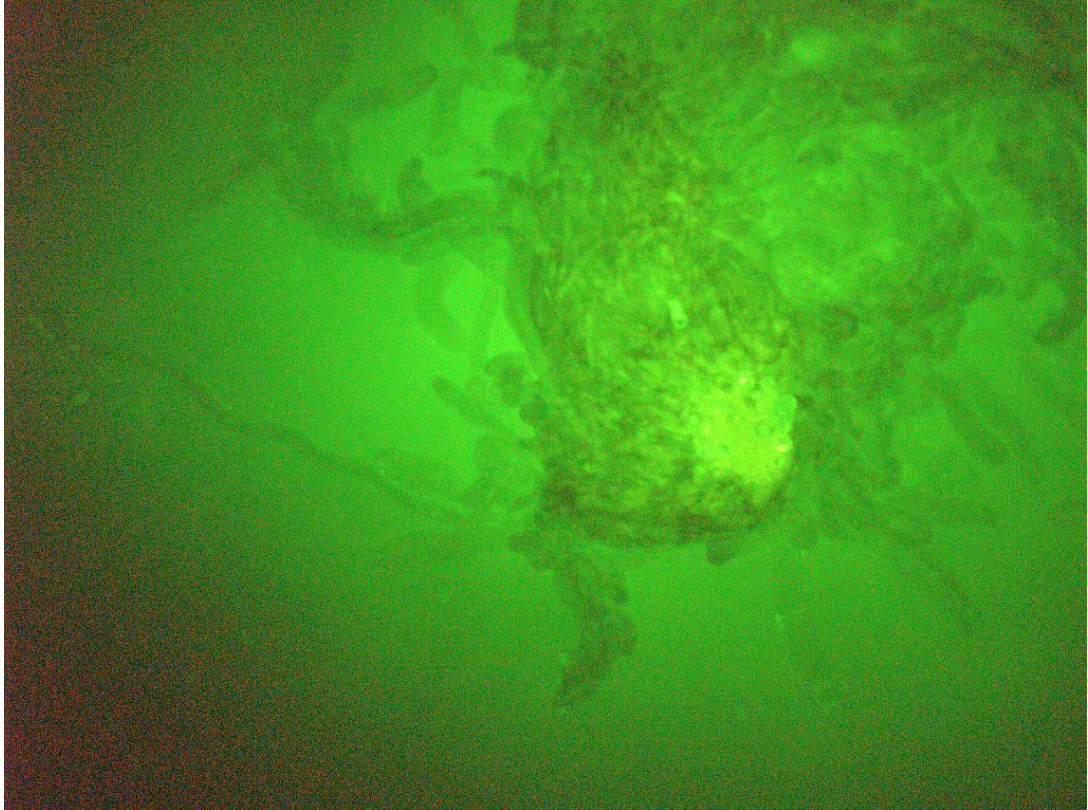
### 5.6 FDA-värjäys

Kaikki paitsi yksi näytteistä, jotka oli käsitelty maljamenetelmällä ja Planer-pakastimella antoivat positiivisen tuloksen. Vain linja 5859 antoi negatiivisen tuloksen. Tämän linjan kolmesta toistosta yksi ei lähtenyt myöhemmin kasvuun, joten on mahdollista että kahden kasvuun lähteneen toiston FDA-näyte oli sattumalta kuollutta solukkoa. Linja 4659 antoi myös positiivisen tuloksen, vaikka linja ei myöhemmin lähtenyt kasvamaan.



Kuva 5. Linjan 5602 FDA-värjäys MP-käsittelylle. Kirkkaat kohdat ovat eläviä soluja, jotka fluoresoivat.

Muista käsittelyistä linja 5602 antoi positiivisen tuloksen, kun käsittely oli maljamenetelmä ja Frosty- pakastus. Lisäksi linjoilla 5852 ja 5859 oli LP-menetelmällä pakastetuilla näytteillä muutamia eläviä soluja. Muuten näytteet eivät antaneet positiivisia tuloksia, eli solut olivat kuolleita.

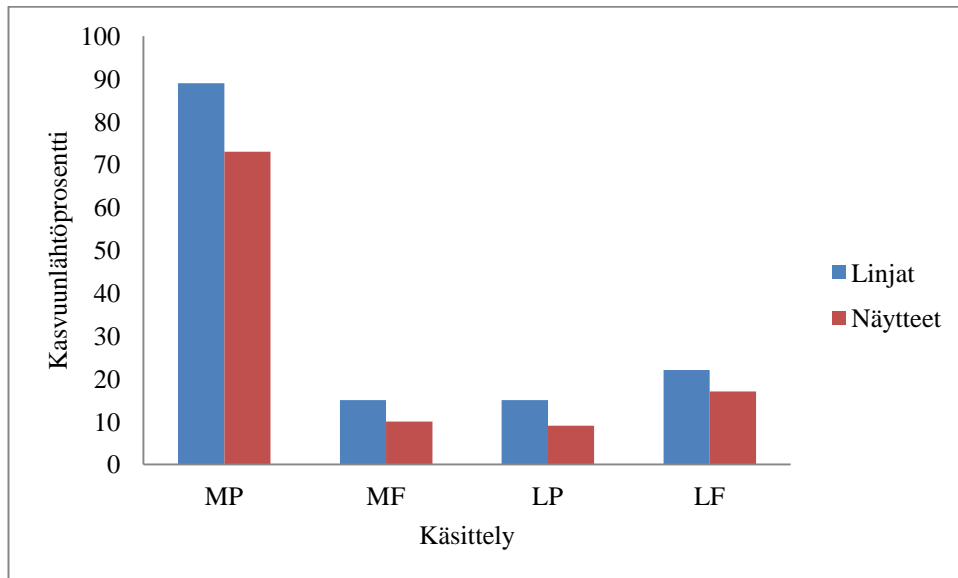


Kuva 6. Linja 5602 LP-menettely. Kuvassa näkyy solukkoa, mutta ei samanlaista kirkasta fluoresenssia kuin kuvassa 5.

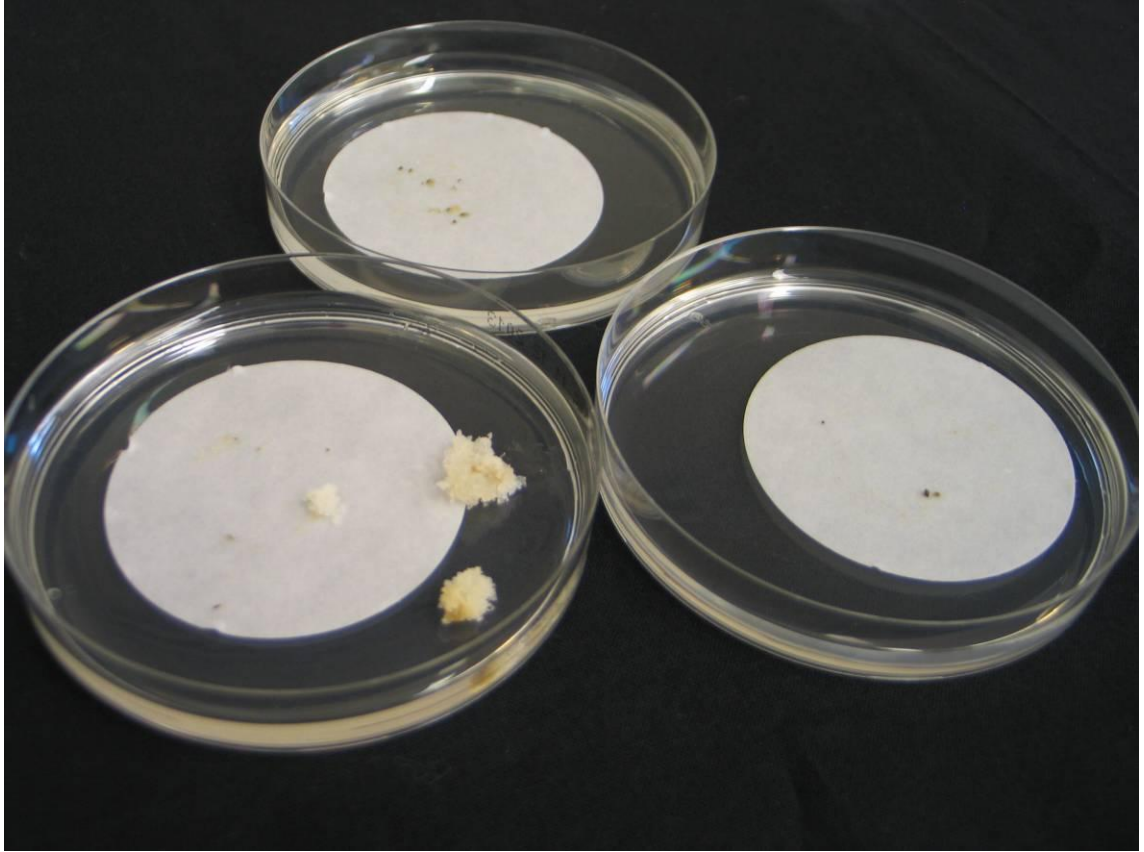
## 5.2 Kryopreservatio

Paras tulos saatiin menetelmällä, jossa esikasvatus tapahtui maljoilla ja pakastus Planer-laitteella (kuva 7). Tässä menetelmässä yhteensä 24 linjaa lähti kasvamaan ainakin yhdestä toistosta sulatuksen jälkeen, eli kasvuunlähtöprosentti oli 89 %. Toiseksi parhain menetelmä oli liemiviljely yhdistettynä Mr. Frosty pakastukseen, jolloin kasvuunlähtöprosentti oli vain 22 %. Kahdella huonoimmaksi osoittautuneista menetelmistä kasvuunlähtöprosentti oli molemmissa 15 %. Verrattaessa kuinka moni kaikista näytteistä lähti kasvamaan sulatuksen jälkeen noudattavat tulokset samaa kaavaa kuin edellä (kuva 7). MP-menetelmässä saatiin 73 % kaikista näytteistä

kasvamaan. Muiden menetelmien kasvuunlähtöprosentti oli kaikissa alle 20 %. Myös linjojen välillä oli nähtävissä eroja (taulukko 4). Linjat 4310, 9145, 3309 ja 9130 menestyvät kaikissa käsittelyissä. Kahden linjan, 4915 ja 4659, näytteistä ei yksikään lähtenyt kasvamaan millään menetelmällä.



Kuva 7. Kasvuunlähtöprosentti jokaisen käsittelyn kohdalla. Linjojen kasvuunlähtöprosentti kuvaa kuinka monesta linjasta edes yksi toistoista lähti kasvamaan sulatuksen jälkeen. Näytteiden kasvuunlähtöprosentti taas kuvastaa sitä kuinka moni kaikista käsittelyn näytteistä lähti kasvamaan sulatuksen jälkeen.



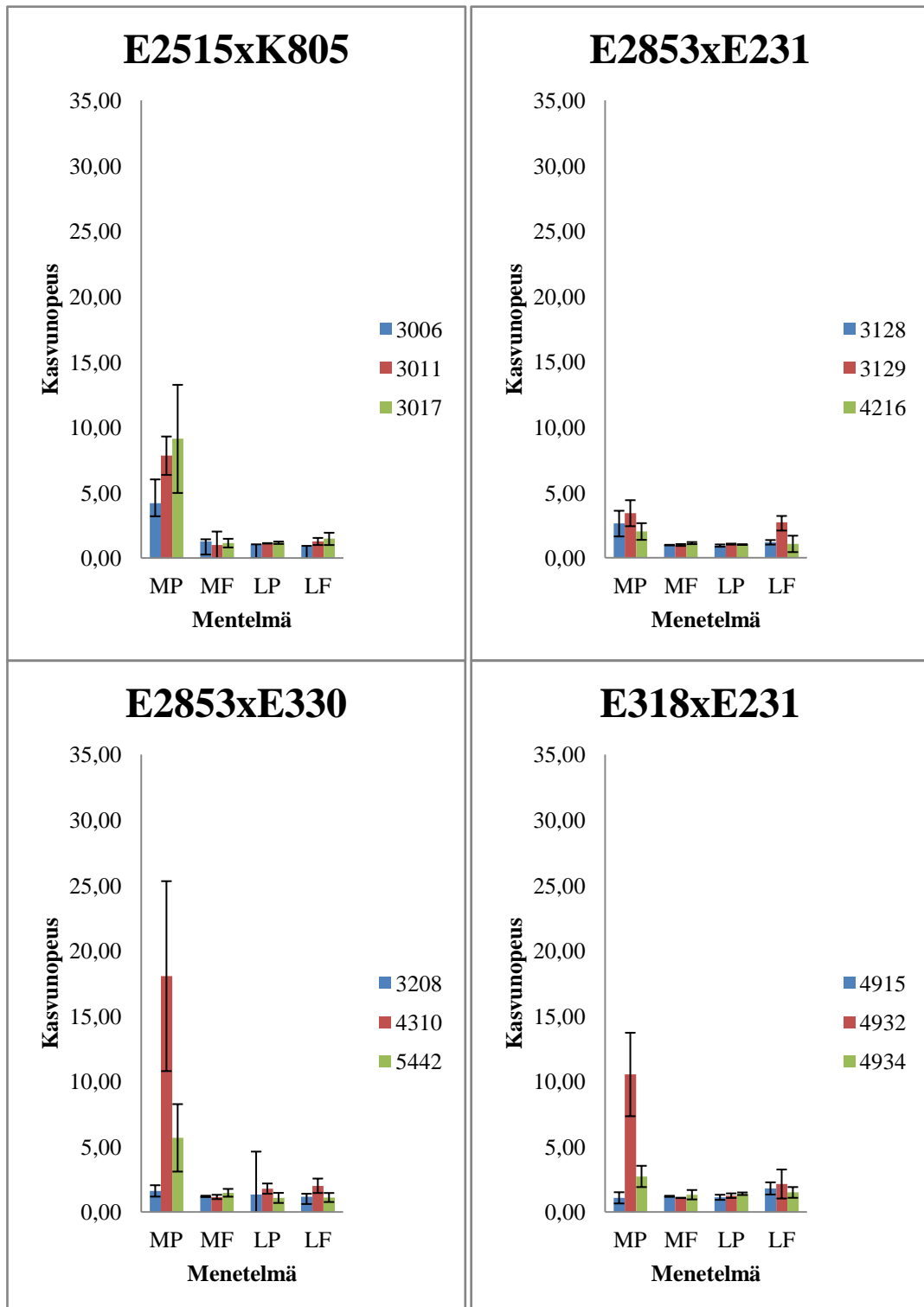
Kuva 8. Linjan 3604 kolme kasvatusmaljaa kryopreservaatiosta sulattamisen jälkeen. Vasemmanpuolimmainen malja on pakastettu käyttäen maljakasvatusta esikättelynä ja Planer-jäähdytystä. Ylimpänä oleva malja on pakastettu käyttäen maljaesikasvatusta ja Mr. Frosty -jäähdytystä. Oikeanpuolimmainen on pakastettu liemiviljelyllä ja Mr. Frosty-jäähdytyksellä. Vain vasemmanpuolimmaisella maljalla näkyy uutta kasvua. Muilla maljoilla on nähtävissä kuollutta solukkoa, joka ei lähtenyt kryopreservoinnin jälkeen kasvamaan.

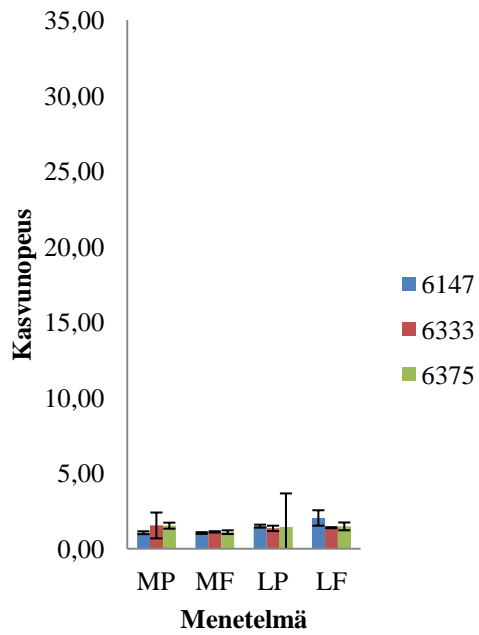
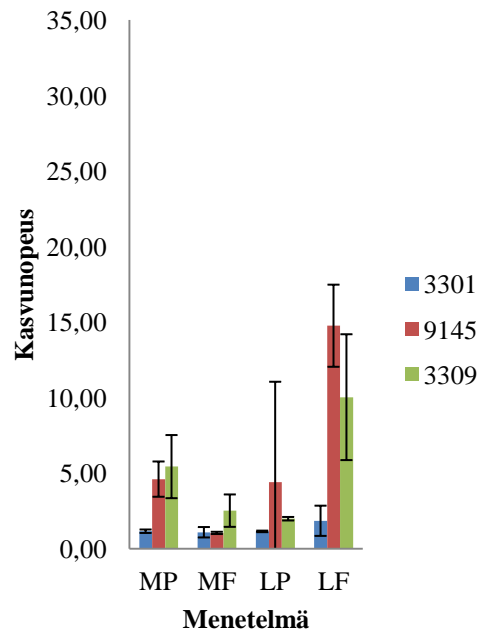
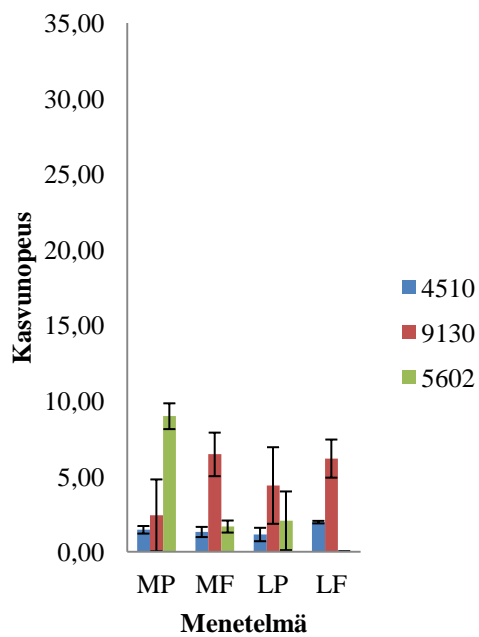
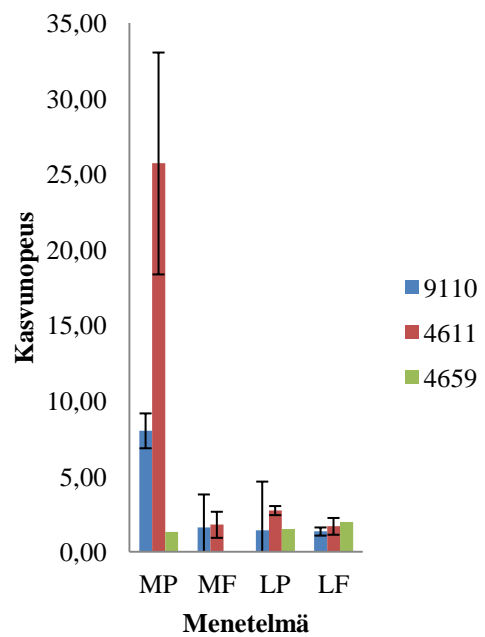


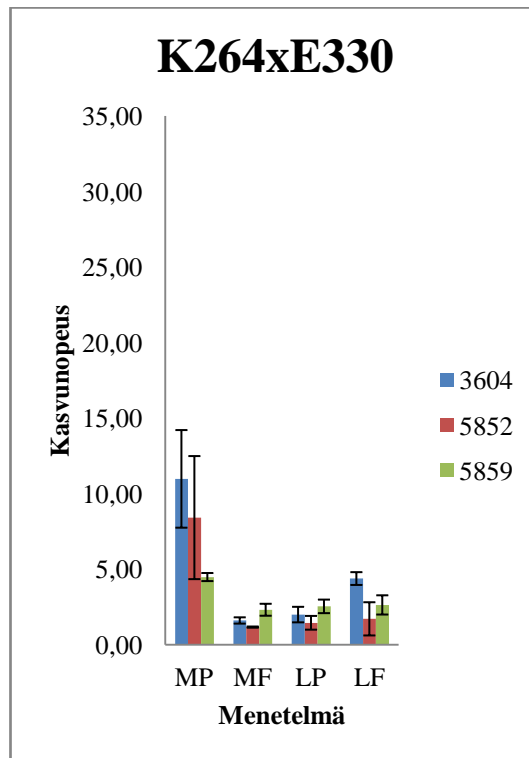
Taulukko 4. Eri linjojen kasvuunlähtö eri menetelmien kohdalla. Numero kertoo kuinka moni kolmesta toistosta lähti kasvamaan kahden viikon jälkeen sulatuksesta. Käsittelyt: MP=maljamenetelmä ja Planer-pakastus, MF=maljamenetelmä ja Frosty-pakastus, LP=liemimenetelmä ja Planer-pakastus, LF=liemimenetelmä ja Frosty-pakastus.

Linja	Perhe	Käsittely			
		MP	MF	LP	LF
3006	E2515xK805	3	0	0	0
3011	E2515xK805	3	0	0	0
3017	E2515xK805	3	0	0	0
3128	E2853xE231	1	0	0	0
3129	E2853xE231	3	0	0	0
4216	E2853xE231	2	0	0	0
3208	E2853xE330	1	0	0	0
4310	E2853xE330	3	0	1	3
5442	E2853xE330	3	1	0	0
4915	E318xE231	0	0	0	0
4932	E318xE231	3	0	0	0
4934	E318xE231	3	0	0	0
6147	E318xK805	1	0	0	0
6333	E318xK805	3	0	0	1
6375	E318xK805	1	0	0	0
3301	E329xE2089	1	0	0	0
9145	E329xE2089	3	0	2	3
3309	E329xE2089	3	3	2	3
4510	E329xK805	0	0	0	1
9130	E329xK805	2	3	2	3
5602	E329xK805	3	1	0	0
9110	K264xE231	3	0	0	0
4611	K264xE231	3	0	0	0
4659	K264xE231	0	0	0	0
3604	K264xE330	3	0	0	0
5852	K264xE330	3	0	0	0
5859	K264xE330	2	0	0	0
Yhteensä		59	8	7	14

## 5.3 Kasvunopeus



**E318xK805****E329xE2089****E329xK805****K264xE231**



Kuva 9. Linjojen kasvunopeudet eri käsittelyissä perheittäin. Lisäksi esitettyä keskivirhe. Kasvunopeus on saatu jakamalla toisen punnituskerran tulos ensimmäisen punnituskerran tuloksella.

Linjojen kasvunopeuksissa oli paljon eroja (kuva 9). MP-käsittelyssä on useimmiten suurimmat kasvunopeudet. Perheen vaikutus näkyy kahdessa linjassa (E2853xE231 ja E318xK805), joiden kaikki linjat kasvoivat huonosti jokaisessa käsittelyssä.

#### 5.4 Maturaatiotesti

Maturaatioon saatiin riittävästi materiaalia MP-menetelmällä pakastetuista näytteistä. Vain muutamasta muusta näytteestä saatiin muilla menetelmillä tarpeeksi materiaalia, joten näitä ei käytetty maturaatiotestissä. Maturaatiotulokset vaihtelivat hieman pakastamattomien ja parhaan menetelmän välillä (taulukko 5). Erot eivät kuitenkaan olleet merkitseviä ( $p < 0,05$ ).

Taulukko 5. Linjojen maturaatiotulokset ennen pakastusta (EP) otetuista näytteistä ja maljaesikäsitellyistä ja Planer-pakastetuista näytteistä (MP). Luvut ovat muodostuneita alkioita per gramma maturaotua solukkoa kolmen toiston keskiarvona. Lisäksi on esitettyä keskivirhe.

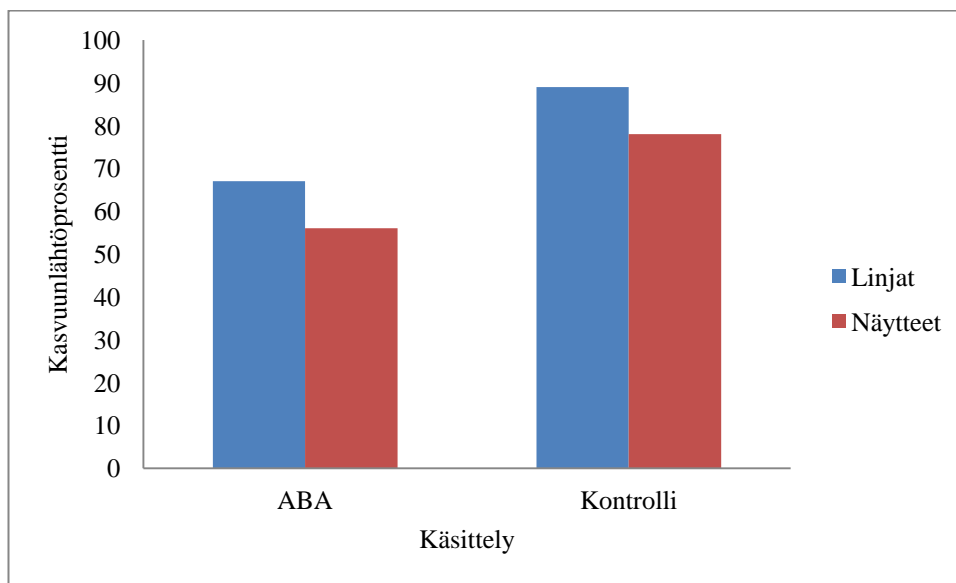
Linja	EP		MP	
	Keskiarvo	± Keskivirhe	Keskiarvo	± Keskivirhe
3006	205,7	± 103,0	185,7	± 53,5
3011	36,3	± 19,2	38,7	± 17,1
3017	87,8	± 46,1	78,3	± 14,7
3128	78,3	± 52,9	99,0	± 29,2
3129	112,7	± 30,5	100,0	± 18,7
4216	34,0	± 26,4	85,0	± 27,2
3208	99,5	± 15,3	-	± -
4310	327,0	± 68,2	206,7	± 41,7
5442	92,3	± 89,4	229,7	± 19,7
4915	0,0	± 0,0	-	± -
4932	62,3	± 14,1	97,3	± 38,4
4934	3,7	± 3,7	26,7	± 15,9
6147	98,0	± 31,2	-	± -
6333	39,0	± 36,0	-	± -
6375	12,0	± 12,0	-	± -
3301	60,0	± 33,3	-	± -
9145	181,0	± 72,8	157,7	± 49,7
3309	686,3	± 103,4	313,0	± 18,0
4510	0,0	± 0,0	-	± -
9130	61,3	± 45,0	194,7	± 71,5
5602	62,3	± 30,1	11,0	± 3,5
9110	0,0	± 0,0	8,0	± 2,0
4611	39,3	± 36,9	0,0	± 0,0
4659	0,0	± 0,0	-	± -
3604	12,7	± 9,8	0,0	± 0,0
5852	0,0	± 0,0	0,0	± 0,0
5859	201,3	± 39,1	33,5	± 6,9
Yhteensä	96,0	± 26,7	98,1	± 20,1

0 Maturaatiossa ei muodostunut alkioita

- Ei tarpeeksi solukkomateriaalia maturaatiota varten

## 5.5 ABA-koe

ABA:n lisäys esikasvatusalustalle ei lisännyt kasvuunlähtöä (taulukko 6). Yhdeksästä linjasta kuusi lähti kasvamaan vähintään yhdestä toistosta, kun ABA:a oli lisätty kasvualustalle, jolloin kasvuunlähtöprosentti oli 67 % (kuva 10). Kontrollilinjoista kahdeksan lähti kasvamaan. Tällöin kasvuunlähtöprosentiksi tuli linjojen osalta 89 %, joka oli sama kuin kryopreservaatiokokeessa samalla menetelmällä saatu tulos. Kun otetaan huomioon näytteiden kokonaislukumäärä oli ABA-käsittelyn kasvuunlähtöprosentti 56 % ja kontrollin 78 %.



Kuva 10. ABA-käsittelyn ja kontrollinäytteiden kasvuunlähtöprosentit. Vasemmanpuoleinen pylväs edustaa linjoja, joista edes yksi näyte lähti kasvamaan. Oikeanpuolimmainen taas näytteitä, jotka lähtivät kasvamaan kun linjojen kaikki kolme toistoa otettiin huomioon.

Taulukko 6. ABA-kokeessa kasvuun lähteneet maljat linjoittain.

Linja	Kasvamaan lähteneitä maljoja	
	ABA	Kontrolli
4934	2	2
5852	2	3
4310	2	3
3006	0	2
3128	0	2
6375	3	3
4611	3	3
9130	3	3
3301	0	0
Yhteensä	15	21

Viidestä linjasta saatiin solukkoa maturaatiotestiin (taulukko 7). ABA-käsitellyistä linjoista saatiin maturoitua jokaisesta näytteestä alkioita. Kontrollikäsitellyistä kuitenkin vain kolme linjaa tuotti alkioita. ABA siis näyttää lisäävän maturaatioiden onnistumista, mutta toisaalta muodostuneiden alkioiden määrä oli vähäisempi kuin kontrollikäsitellyillä. Kontrollinäytteiden keskimääräinen alkiontuotto oli kolmelta näytteeltä suurempi kuin ABA-käsittelyn vastaava luku viideltä linjalta. Linjat 4611 ja 5852 eivät tuottaneet alkioita ABA-kokeen kontrollinäytteistä, eivätkä kryopreservaatiokokeen vastaavassa maturaatiotestissä. ABA-käsittelyssä nämä linjat tuottivat kuitenkin muutamia alkioita.

Taulukko 7. Alkiontuotto kuvattuna yhtä grammaa solukkoa kohden ABA:lla käsitellyissä näytteissä ja kontrollinäytteissä.

Linja	ABA		Kontrolli	
	Keskiarvo $\pm$ keskivirhe		Keskiarvo $\pm$ keskivirhe	
6375	12,8 $\pm$	4,9	27,5 $\pm$	1,7
9130	98,5 $\pm$	8,3	115,5 $\pm$	36,5
4310	151,8 $\pm$	8,9	165,8 $\pm$	15,5
4611	18,3 $\pm$	10,9	0,0 $\pm$	0,0
5852	1,9 $\pm$	1,9	0,0 $\pm$	0,0
Keskiarvo	56,7 $\pm$	26,2	61,8 $\pm$	30,0

Näytteiden kasvunopeuksista huomaa, että samat linjat ovat lähteneet kasvamaan muita paremmin molemmissa käsittelyissä (taulukko 8). Kontrollikäsittelyssä keskiarvo kaikkien linjojen kasvunopeudesta on suurempi. Koska kontrollikäsittelyssä kasvuun lähteneiden maljojen määrä oli suurempi, selittyy suurempi kasvunopeuksien keskiarvo tällä. Suurimman kasvunopeuden saanut linja 4310 kasvoi myös kryopreservaatiokokeen vastaavassa MP-menetelmässä hyvin.

Taulukko 8. ABA-kokeen näytteiden kasvunopeuksien keskiarvot ja keskivirheet.

Linja	Kasvunopeus	
	ABA	Kontrolli
4934	1,15 $\pm$ 0,64	0,59 $\pm$ 0,10
5852	7,31 $\pm$ 5,97	9,78 $\pm$ 2,18
4310	10,79 $\pm$ 5,53	47,88 $\pm$ 29,90
3006	0,43 $\pm$ 0,14	1,97 $\pm$ 0,69
3128	1,25 $\pm$ 0,09	1,70 $\pm$ 0,88
6375	12,20 $\pm$ 9,74	4,25 $\pm$ 2,45
4611	8,76 $\pm$ 3,11	16,75 $\pm$ 5,98
9130	10,72 $\pm$ 3,21	6,27 $\pm$ 1,59
3301	0,46 $\pm$ 0,23	0,50 $\pm$ 0,19
Keskiarvo	5,90 $\pm$ 1,12	9,97 $\pm$ 5,06

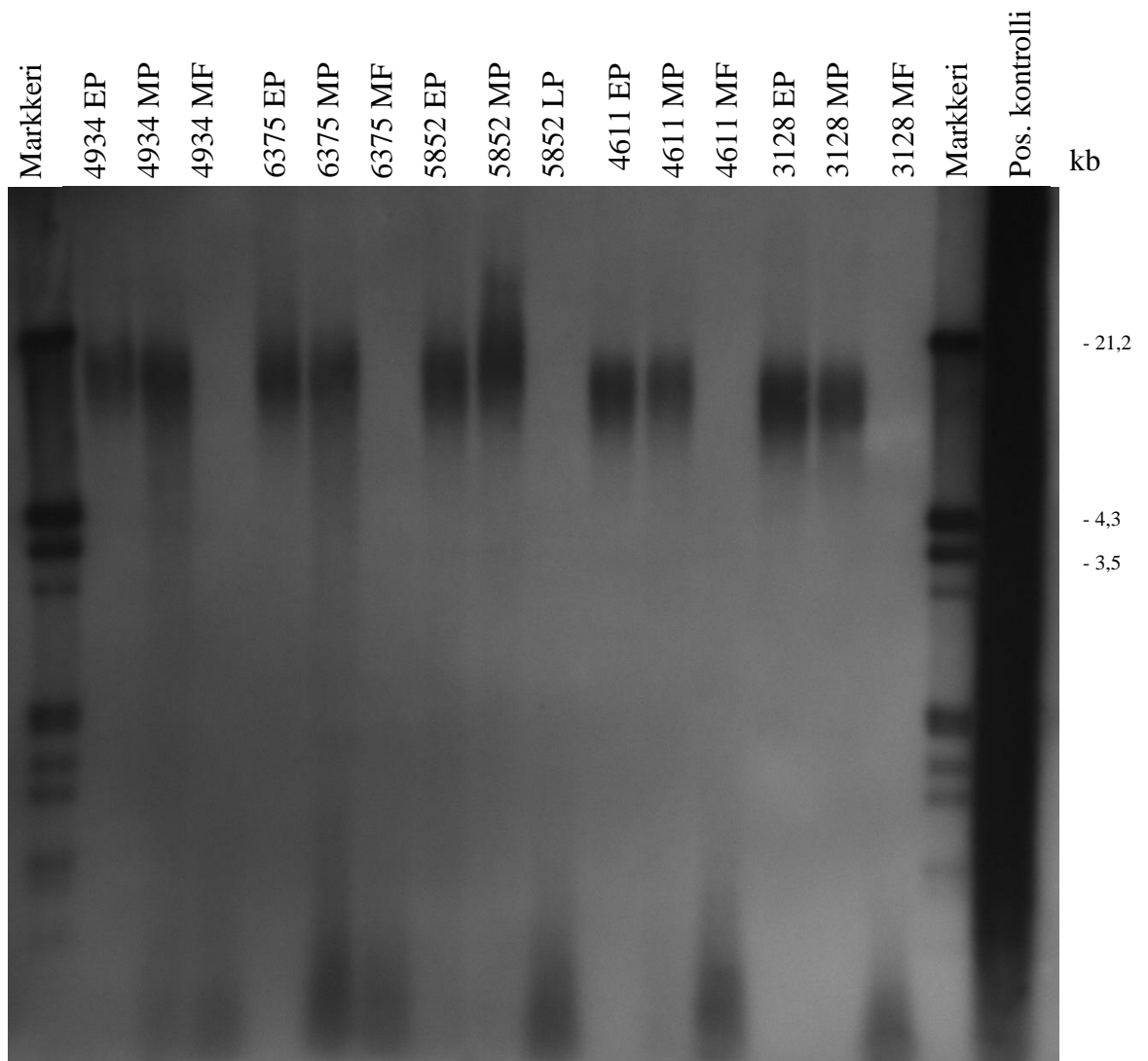


## 5.6 Telomeerit

Näytteiden telomeerien koot vaihtelivat välillä 18,6-14,2 kb (taulukko 9). Epäonnistunutta kryopreservaatiomenetelmää edustaneet näytteet eivät antaneet tulosta, koska näytteiden DNA oli luultavasti niin hajonnutta ettei se näkynyt geelikuvassa (kuva 11). Kolmen linjan telomeerien koossa ei näkynyt merkittävää vaihtelua verrattaessa kryopreservoimatonta ja kryopreservoitua näytettä (taulukko 9). Linja 5852 antoi tulokseksi suuremman telomeerialueen kryopreservoidussa näytteessä. Vain linja 4611 näytti merkkejä lyhentyneestä telomeerialueesta.

Taulukko 9. Telomeerien koot (kb) pakastamattomissa näytteissä (EP) ja maljalla esikasvatetuista ja Planer-pakastetuista näytteistä (MP).

Linja	Käsittely	
	EP	MP
4934	17,3	17,2
6375	17,4	17,4
5852	16,9	18,6
4611	16,3	15,5
3128	14,2	14,2
Keskiarvo	16,4	16,6



Kuva 11. Näytteiden telomeerit, joiden koko vaihtelee 18,6 ja 14,2 kb:n välillä. Epäonnistuneita kryomenetelmiä (MF tai LP) edustavien näytteiden DNA on hajonnuttu ja se näkyy aivan kuvan alareunassa. Kuvassa EP=ennen pakastusta, MP=maljaesikasvatus ja Planer-pakastus, MF=maljaesikasvatus ja Frosty-pakastus, LP=liemiesikasvatus ja Planer-pakastus.

## 5.7 Mikrosatelliitit

Mikrosatelliittianalyysissä ei huomattu eroavaisuuksia kryopreservoitujen ja käsittelemättömien näytteiden välillä (taulukko 10).

Taulukko 10. Linjojen mikrosatelliittianalyysin tulokset kahden lokuksen (SD1 ja SG3) kohdalta. EP=ennen pakastusta, MP=maljaesikasvatus ja Planer-jäähdytys.

Linja	Perhe	SD 1		SG3	
		EP	MP	EP	MP
3006	E2515xK805	*			
3011	E2515xK805	-	131/131	136/145	136/145
3017	E2515xK805	126/126	126/126	131/136	131/136
3128	E2853xE231	131/134	131/134	136/136	136/136
3129	E2853xE231	131/134	131/134	129/137	129/137
4216	E2853xE231	131/134	131/134	130/135	-
3208	E2853xE330	131/134	131/134	134/135	134/135
4310	E2853xE330	144/144	144/144	135/138	135/138
5442	E2853xE330	131/134	131/134	135/137	135/137
4915	E318xE231	134/144	134/144	135/137	135/137
4932	E318xE231	134/146	134/146	137/137	137/137
4934	E318xE231	*			
6147	E318xK805	146/146	146/146	131/137	131/137
6333	E318xK805	-	-	131/137	131/137
6375	E318xK805	134/134	134/134	137/145	137/145
3301	E329xE2089	142/148	142/148	125/125	125/125
9145	E329xE2089	142/148	142/148	120/133	120/133
3309	E329xE2089	148/165	148/165	120/133	120/133
4510	E329xK805	165/165	165/165	133/144	133/144
9130	E329xK805	165/165	165/165	131/133	131/133
5602	E329xK805	165/165	-	125/145	125/145
9110	K264xE231	133/133	133/133	136/143	136/143
4611	K264xE231	-	-	135/135	135/135
4659	K264xE231	-	-	135/135	135/135
3604	K264xE330	295/295	294/296	133/143	133/143
5852	K264xE330	146/146	146/146	133/143	133/143
5859	K264xE330	*			

- Mikrosatelliittianalyysi ei onnistunut

\* Näytteiden DNA-eristys epäonnistunut

## 6 TULOSTEN TARKASTELU

### 6.1 Kryopreservaation onnistuminen

Kokeessa käytetyistä menetelmistä löytyi selvästi paras menetelmä kuusen kryopreservaatioon. MP-käsitellyistä (maljaesikasvatus ja Planer-pakastus) näytteistä 89 % linjoista lähti kasvamaan kaksi viikkoa sulatuksen jälkeen, kun kolmen muun menetelmän vastaava luku jäi kaikissa alle 22 %. Kun otetaan huomioon kaikki kolme toistoa linjasta MP-menetelmän kasvuunlähtöprosentti oli 73 %. Onkin oleellista, että kryopreservaatioissa pakastetaan useampia näytteitä, jotta kasvuunlähdon onnistuminen on varmempaa. Myös FDA-värjäys näyttää, että näytteet selvisivät MP-menetelmässä elossa, kun muilla menetelmillä pakastettujen näytteiden solut olivat kuolleita.

Neljän viikon jälkeen sulatuksesta 70 % MP-linjoista oli kasvanut kaksinkerroin solumassaa verrattuna ensimmäiseen punnitukseen. Muita tutkimustuloksia kuusen kryopreservaation onnistumisesta on julkaistu varsin vähän. Norgaard ym. (1993) raportoivat 61 % linjoista oli selvinnyt jokaisesta kryopreservaatiokerrasta. Krekanpihdalla (*Abies cephalonica*) tehdyillä kokeilla kasvuunlähtö oli 71 % (Aronen ym. 1999). Krajnakova ym. (2011) raportoivat samaten krekanpihdalla jopa 100 % kasvuunlähdestä. Haggman ym. (1998) saivat männyn (*Pinus sylvestris*) kryopreservaatiosta tulokseksi 78 % kasvuunlähdon. Näissä kolmessa edellä mainitussa kokeessa kryopreservaatioprotokolla oli yhtenevä tässä kokeessa käytettyyn MP-menetelmään.

Kuusella on raportoitu kryopreservaation jälkeisestä lag-vaiheesta, jolloin kasvu ei ole lähtenyt kunnolla vauhtiin (Norgaard ym. 1993). Norgaardin ym. (1993) kokeessa kasvu oli hidasta kaksi ensimmäistä viikkoa ja lähti kunnolla nousuun vasta neljän viikon jälkeen sulatuksesta. Haggman ym. (1998) raportoivat samanlaisesta ilmiöstä myös männyllä. Tässä kokeessa linjojen kasvun seuranta loppui neljän viikon jälkeen näytteiden sulattamisesta. On mahdollista, että jotkut linjat olisivat lähteneet kunnolla kasvamaan vielä muutaman lisäviikon jälkeen. Metsänjalostusyhtiä ajatellen on tarpeen, että kasvuunlähtöprosentti on mahdollisimman suuri. MP-menetelmä toimi selvästi hyvin, mutta siitä on muokattava varmempi. On toki myös otettava huomioon,

että linjojen genotyypillä on vaikutusta kryopreservaation onnistumiseen (Norgaard ym. 1993).

Kokeen kolme muuta menetelmää antoivat selvästi huonomman tuloksen. Kuitenkin samankaltaisia menetelmiä on käytetty muualla onnistuneesti. *Pinus caribealla* on tehty kryopreservaatiota onnistuneesti liemiviljelyllä (Laine ym. 1992). Valkokoussella (*Picea glauca*) liemiviljelyllä saatiin 94 % selviämisprosentti (Kantha ym. 1988). Myös Metlan aikaisempi kryopreservaatiomenetelmä perustui liemiviljelyyn, mutta tulokset olivat silloin huonot.

Nalgenen Mr. Frostyn tapaista pakastusastiaa on myös käytetty hyvillä tuloksilla useissa eri kokeissa (Ford ym. 2000, Fenning ja Park 2002). Fenning ja Parkin (2002) kuvaamassa menetelmässä oli myös käytössä liemiviljely esikäsitteilynä ja näin saatiin 70 % selviämismäärä. Mr. Frostyn pieni koko ja helppo toimintatapa olisi kustannustehokkaampi vaihtoehto Planer-pakastimelle. Nestetyypen käyttö jäädytyksessä nostaa kryopreservaation hintaa ja siten koko toimintaketjun kustannuksia. Etenkin mahdollisissa kaupallisissa sovelluksissa tämä muodostuisi ongelmaksi, jos lopputuotteen hintaa ei saada alennettua.

Kokeessa oli myös nähtävillä selvästi genotyypin vaikutus selviytymiseen. Kaksi linjaa, 3309 ja 9013, lähtivät kasvuun kaikissa neljässä käsittelyssä. Linjat 4310 ja 9145 taas kasvoivat hyvin kolmessa käsittelyssä. Muutama linja ei kasvanut yhdessäkään käsittelyssä ja osa saattoi lähteä kasvuun vain yhdestä kolmesta toistosta. Muun muassa (Norgaard ym. 1993) ovat todenneet genotyypin vaikuttavan kryopreservaatiosta selviytymiseen.

## **6.2 Maturaatiotulokset**

Maturaatiotulokset parhaassa MP-menetelmässä olivat vaihtelevia. Kokeen 27:stä linjasta yhdeksästä ei saatu tarpeeksi solukkoa maturaatioon. Kolme maturoiduista linjoista ei tuottanut yhtään alkioita. Vain 11 linjaa tuotti yli 50 alkioita per yksi grammaa maturoitavaa solukkoa. Tämä on erittäin huolestuttavaa, koska maturaation onnistuminen ja varmuus on tärkeä tekijä metsänjalostuksen syklissä, jotta geneettistä

materiaalia saadaan säilöttyä koko jalostussyklin tarvitsemaksi ajaksi. Kryopreservaation onnistumisen lisäksi on oltava varmuus siitä, että pakastetusta solukosta saadaan tuotettua säilytyksen jälkeen uusia taimia. Ongelma on myös se, että kokeeseen valittiin linjat hyvien alkiontuotto-ominaisuuksien perusteella. Silti myös pakastamattomien näytteiden maturaatiotulokset olivat osittain huonot. Viisi linjaa pakastamattomista näytteistä ei tuottanut yhtäkään alkiota, ja vain viisitoista linjaa tuotti yli 50 alkiota/g solukkoa. Maturaatiotuloksien keskivirheet olivat osalla linjoista hyvin suuret. Maturaatiotestissä jokaisesta näytteestä tehtiin kolme toistoa, joiden keskiarvot alkiontuotosta antoivat maturaatiotuloksen. Suuri keskivirhe kertoo kuinka vaihtelevia kolmen toiston tulokset saattoivat olla. Pahimmillaan kolmesta toistosta yksi tuotti vain muutamia alkioita per gramma kun toinen taas tuotti useita satoja alkioita grammaa kohden. Riittävien toistojen määrä on kriittinen maturaatiokokeissa, jotta linjojen todellista alkiontuottokykyä voidaan arvioida.

Vaihtelevia maturaatiotuloksia on todettu myös esimerkiksi kreikanpihdalla (Krajnakova ym. 2011) ja männyllä (Latutrie ja Aronen 2013). Yksi syy kokeen huonoihin maturaatiotuloksiin voi olla käytetyn solukon vanha ikä. Vaikka linjojen alkiontuottokyky oli testattu, niin testauksen ja tämän kokeen välissä oli aikaa kulunut jo yli vuosi. Solukko menettää ajan myötä vähitellen alkiontuottokykyään. Siksi onkin tärkeää saada metsänjalostuksen kenttätestattavaa materiaalia mahdollisimman nopeasti kryopreservoitavaksi, jotta sen alkiontuottokyky pysyy hyvänä.

Merkittävää on myös se, ettei hyvä kasvunopeus taannut hyvää maturaatiotulosta. Linjat 4611, 3604 ja 5852 eivät tuottaneet maturaatiossa yhtäkään alkiota, mutta niiden kasvunopeus oli hyvä. Linjan 4611 kasvunopeus oli jopa suurin kaikista linjoista. Hyvä kasvunopeus ei takaa hyvää maturaatiotulosta, mutta toisaalta todella huono kasvunopeus (kasvunopeus alle kaksi) johtaa siihen ettei maturaatioon saada tarpeeksi solukkoa.

### **6.3 ABA:n vaikutus kryopreservaatioon**

ABA:n lisäys suoja-aineisiin kryopreservaatiossa ei tuonut parempia tuloksia kasvuunlähdeissä. Näytteet eivät lähteneet kasvuun paremmin, eikä niillä ollut

suurempia kasvunopeuksia. Hazubska-Przybyl ym. (2013) kokeessa ABA:n lisäys lisäsi näytteiden selviämistä kryopreservaatiosta. Samaisessa kokeessa esikäsittelymenetelmä oli kuitenkin hyvin erilainen verrattuna tämän kokeen menetelmään. Esikäsittely ABA:aa sisältävällä maljalla kesti yhteensä viikon, kun tässä kokeessa solukko oli ABA:a sisältävällä maljalla kaksi päivää. Lisäksi kokeeseen liittyi vielä solukon ilmakeivatus viikon esikasvatuksen jälkeen ennen pakastamista. On mahdollista, että pitkäaikaisempi vaikutusaika ABA:lle sekä ilmakeivatuksen käyttö on voinut lisätä kryopreservaation onnistumista.

ABA:n lisäyksen vaikutus näkyi kuitenkin selvemmin maturaatiotuloksissa. Kaikki maturoidut ABA-kokeen linjat lähtivät tuottamaan alkioita. Alkioita muodostui kuitenkin vähemmän kuin kontrollinäytteillä. ABA-käsittelyllä saatiin jopa tuotettua alkioita linjalla 5852, joka ei ollut tuottanut alkioita edes pakastamattomasta näytteestä. ABA:n lisäys kaikkiin kryopreservaatioalustoihin ei ole perusteltua, mutta sitä voitaisiin hyödyntää joissakin tapauksissa. Erittäin geneettisesti arvokkaiksi arvioitujen linjojen kryopreservoinnin onnistumisen takuiksi olisi mahdollista tehdä myös ABA:lla esikäsiteltyjä näytteitä. Tämä voisi olla eräänlainen varmuuskopio todella tärkeistä näytteistä, joiden alkiontuottokyky on jo voinut laskea.

### **6.3 Geneettinen stabiilisuus**

Mikrosatelliittianalyysin mukaan parhaaksi valittu kryopreservaatiomenetelmä ei aiheuttanut solukossa muutoksia. Hazubska-Przybyl ym:n (2013) tutkimus päättyi myös samaan tulokseen kuusella käyttäen viittä eri mikrosatelliittilokusta. Kryopreservaation ei ole todettu vaikuttavan kryopreservoitavan materiaalin geneettiseen pysyvyyteen (Harding 2004).

## 6.4 Telomeerit

Kuusen telomeerien pituuksissa oli hieman vaihtelua kryopreservaation jälkeen. Kolmella näytteellä telomeerialue oli samankokoinen kryopreservaatiokäsittelyn jälkeen. Linjan 5852 telomeerialue oli kasvanut, mutta tämä saattaa johtua myös virheestä analyysivaiheessa. Linjan 4611 telomeerialue oli kuitenkin pienentynyt. Keskiarvoisesti kryopreservoitujen näytteiden telomeerialue oli suurempi kryopresevoiduissa näytteissä, mutta tähän vaikutti suuresti linjan 5852 tulos. Kun linjaa 5852 ei oteta huomioon, kääntyy keskimääräinen tulos toisinpäin. Tuolloin pakastamattomien näytteiden telomeerien keskimääräinen pituus on 16,3 kb ja kryopreservoitujen 16,1 kb. Näin pienellä otoskoolla on kuitenkin mahdotonta antaa täysin luotettavaa tulosta. Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu lyhentyneitä telomeerialueita (Honda ym. 2001, Perez-Cerezales ym. 2011, Jenkins ym. 2012). Carton-Garcia ym. (2013) toisaalta eivät myöskään löytäneet kryopreservaatiosta telomeereja lyhentävää vaikutusta.

Vähäisten ja eroavien tutkimustulosten vuoksi on selvää, että asiaa on tutkittava edelleen. Eräs ongelma on analyysiin tarvittavan solukkomassan kasvattaminen. Tähän kokeeseen DNA-näyte kerättiin vasta neljän viikon jälkeen sulatuksesta. Telomeraasi-entsyymin aktiivisuuden on todettu lisääntyvän monilla kasveilla solukkoviljelyssä (Fitzgerald ym. 1996). Toisaalta koivulla on todettu pitkäaikaisen solukkoviljelyn lyhentävän telomeereja (Aronen ja Ryyänen 2013). Jatkossa olisi tarpeellista päästä käsiksi telomeeritutkimukseen mahdollisimman pian sulatuksen jälkeen, jotta muut vaikuttavat tekijät saataisiin eliminoitua. On kuitenkin vaikeaa eristää ehjää DNA:ta näytteistä, jotka eivät ole vielä kasvaneet uutta solukkoa tarpeeksi. Tässä kokeessa epäonnistuneita menetelmiä edustavien näytteiden DNA oli niin hajonnutta, ettei telomeereja voinut tarkastella ja täten ei ollut mahdollista saada tietoa telomeerien yhteydestä epäonnituneeseen kryopreservatioon.



## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Kokeessa löytyi selvästi paras menetelmä, ja tulos oli huomattavasti parempi kuin entinen käytössä ollut. Mikrosatelliittianalyysi vahvisti myös ettei linjoissa ollut tapahtunut somaklonaalisia muutoksia kryopreservaation takia, mikä tukee myös yleistä olettamusta. Tutkimuksessa todettiin myös, etteivät kuusen telomeerit lyhentyneet merkittävästi kryopreservaation aikana. Tämä oli toistaiseksi ensimmäinen tutkimustulos liittyen kuusen telomeereihin kryopreservaation jälkeen. Telomeerien lyhentymisen arvioiminen vaatii kuitenkin lisää tutkimusta, jotta voidaan varmistua ettei kryopreservaatio todella vaikuta haitallisesti telomeereihin.

Tulevaisuudessa on tarpeen kehittää vielä kolmea aspektia. Vaikka maljaesikäsittely ja Planer-pakastus antoivat hyvän selviytymisprosentin, on tässäkin vielä parannettavaa. Kryopreservaatiomenetelmän luotettavuus on erittäin tärkeää. Vaikeampi kehityskohde on solukon maturoimisen onnistumisen takaaminen. Kryopreservaation onnistuminen on hyödytöntä, jos solukosta ei saada luotettavasti tuotettua uusia alkioita ja sitä kautta taimia. Kryopreservoitavan solukon tulisi siksi olla mahdollisimman nuorta, jotta alkiontuottokyky ei ole ehtinyt laskea. Kokeessa testatusta ABA-menetelmästä voi olla hyötyä joissakin tapauksissa, kun säilötään arvokasta materiaalia, jonka alkiontuottokyky on oletettavasti huonontunut. Tässä tutkimuksessa ei käsitelty alkuiden kasvamista taimiksi, mutta niiden kasvatus on myös oleellinen osa SE-ketjua. Maturaatioiden ja taimikasvatuksen onnistumisen turvaaminen on yksi suurimmista haasteista SE-solukon viljelyssä. Alkuiden itäminen ja taimien kasvatus on huomioitu ongelmaksi myös esimerkiksi Ison-Britannian SE-tutkimuksessa (Fenning ja Park 2002).

Kolmas ongelma liittyy kustannustehokkuuteen. Kryopreservaation ja SE-tuotannon takana on myös ajatus hyvälaatuisten taimien tuottamisesta kaupallisiin tarkoituksiin. Tällä hetkellä yhden taimen hinta on niin korkea, ettei se ole kilpailukykyinen. Kustannuksien alentaminen vaatisi monia toimia. Valitettavasti tässä kokeessa testatut menetelmät, jotka olisivat voineet vähentää kustannuksia, eivät toimineet. Etenkin helppokäyttöisen Mr. Frostyn huonot tulokset vaikeuttavat kustannuksien vähenemistä. ABA:n lisäys ei tuonut parempia tuloksia, mutta toisaalta kalliin kasvihormonin lisäys kaikkiin kryopreservaatiokäsittelyihin olisi ollut hyvin kallista.

Vaikka SE-sykliin liittyy ongelmia, on tulevaisuudessa mahdollista saada sen täysi potentiaali käyttöön. Tämä vaatii kuitenkin lisää tutkimista ja kehittämistä. Tutkielmassa todettu kryopreservaatiomenetelmän onnistuminen vie tätä tavoitetta muutamalla askeleella eteenpäin.

## **KIITOKSET**

Kiitän Metsäntutkimuslaitosta mahdollisuudesta tehdä tämä gradutyö. Eritoten kiitän ohjaajiani tohtori Tuija Arosta ja tohtori Saila Varista heidän asiantuntemuksestaan ja hyvästä ohjauksesta. Lisäksi kiitän Metlan Punkaharjun toimipisteen biotekniikan osaston koko henkilökuntaa avusta ja tuesta. Etenkin kiitän Aila Viinasta hänen avustaan telomeerien määrittämisessä. Kiitän myös Metlan Vantaan toimipisteen Annukka Korpijaakkoa hänen suuresta avusta mikrosatelliittianalyysissä. Helsingin yliopistolta kiitän professori Helena Korpelaista hänen avustaan ja kommentistaan.

Viimeisenä kiitän koko perhettäni ja läheisiäni jatkuvasta tuesta. Etenkin kiitän avopuolisoani Jaakkoa hänen kärsivällisyydestään ja teknisestä tuesta, jota ilman työn tekeminen olisi vaikeutunut huomattavasti.

## LÄHTEET

- Aronen, T. S., Krajnakova, J., Haggman, H. M. & Ryyänen, L. A. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Science (Limerick)* 142: 163-172.
- Aronen, T. & Ryyänen, L. 2012. Variation in telomeric repeats of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genetics and Genomes* 8: 267-275.
- Aronen, T. & Ryyänen, L. 2013. Silver birch telomeres shorten in tissue culture. *Tree Genetics and Genomes* 10: 67-74.
- Aronen, T. S. 2011. Kasvullisen lisäyksen mahdollisuudet havupuiden taimituotannossa. *Metsätieteen aikakauskirja* 1: 53-59.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O. & Van Staden, J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147-173.
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M. & Critser, J. K. 2012. The cryobiology of spermatozoa. (Special collection of papers in honor of Dr. John K. Critser.). *Theriogenology* 78: 1682-1699.
- Benson, E. E. 2008. Cryopreservation theory. Teoksessa: B. M. Reed (toim.). *Plant cryopreservation. A practical guide*. 1 painos. Springer. s. 15-30.
- Bravo, L. A., Zuniga, G. E., Alberdi, M. & Corcuera, L. J. 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. *Physiologia Plantarum* 103: 17-23.

- Buitink, J. & Leprince, O. 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* 48: 215-228.
- Burritt, D. J. 2008. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation-dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 209-215.
- Carton-Garcia, F., Riesco, M. F., Cabrita, E., Paz Herraiez, M. & Robles, V. 2013. Quantification of lesions in nuclear and mitochondrial genes of *Sparus aurata* cryopreserved sperm. *Aquaculture* 402: 106-112.
- Charest, P. J. & Klimaszewska, K. 1995. Cryopreservation of germplasm of larix and picea species. Teoksessa: Y. P. S. Bajaj (toim.). *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. 1 painos. Berlin: Springer. s. 191-203.
- Doyle, J.J. 1991. DNA protocols for plants. Teoksessa: G. Hewitt, A. Johnston & J. P. Young (toim.). *Molecular techniques in taxonomy*. Berlin: Springer. s. 283-293
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40: 427-433.
- Fenning, T. & Park, Y.S. 2002. The prospects for using somatic embryogenesis to propagate Sitka spruce in the UK. Teoksessa: Y.S. Park & J.M. Bonga (toim.). *Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management*. Brno: s. 129-138.

- Find, J. I., Kristensen, M. M. H., Norgaard, J. V. & Krogstrup, P. 1998. Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway spruce and Sitka spruce. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 27-33.
- Fitzgerald, M. S., McKnight, T. D. & Shippen, D. E. 1996. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 14422-14427.
- Ford, C. S., Jones, N. B. & Staden, J. 2000. Optimization of a working cryopreservation protocol for *Pinus patula* embryogenic tissue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 366-369.
- Fourré, J. L., Berger, P., Niquet, L. & André, P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 159-169.
- Haapanen, M. & Mikola, J. 2008. Metsänjalostus 2050 - Pitkän aikavälin jalostusohjelma. Metlan työraportteja 71.
- Haggman, H. M., Ryytänen, L. A., Aronen, T. S. & Krajnakova, J. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 45-53.
- Harding, K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *Cryoletters* 25: 3-22.

- Hazubska-Przybyl, T., Chmielarz, P., Michalak, M., Dering, M. & Bojarczuk, K. 2013. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113: 303-313.
- Heiska, S., Jaakola, L., Varis, S. & Aronen, T. 2012. Towards mass-propagation of Norway spruce in Finland. *Teoksessa: : Y.S. Park & J.M. Bonga (toim.). Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management. Brno: s. 148-150.*
- Hirsch, A. 1987. Vitrification in Plants as a Natural Form of Cryoprotection. *Cryobiology* 24: 214-228.
- Honda, S., Weigel, A., Hjelmeland, L. M. & Handa, J. T. 2001. Induction of Telomere Shortening and Replicative Senescence by Cryopreservation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282: 493-498.
- Jain, M. S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
- Jenkins, E. C., Ye, L. & Silverman, W. P. 2012. Does the cryogenic freezing process cause shorter telomeres? *Cryobiology* 65: 72-73.
- Kaczmarczyk, A., Rokka, V. M. & Keller, E. R. J. 2011. Potato shoot tip cryopreservation. A review. *Potato Research* 54: 45-79.
- Kartha, K. K., Fowke, L. C., Leung, N. L., Caswell, K. L. & Hakman, I. 1988. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *Journal of Plant Physiology* 132: 529-539.

- Kilian, A., Stiff, C. & Kleinhofs, A. 1995. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9555-9559.
- Klimaszewska, K., Ward, C. & Cheliak, W. 1992. Cryopreservation and Plant-Regeneration from Embryogenic Cultures of Larch (*Larix X Eurolepis*) and Black Spruce (*Picea Mariana*). *Journal of Experimental Botany* 43: 73-79.
- Korkama, T., Pakkanen, A. & Pennanen, T. 2006. Ectomycorrhizal community structure varies among Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytologist* 171: 815-824.
- Krajnakova, J., Sutela, S., Aronen, T., Gomory, D., Vianello, A. & Haggman, H. 2011. Long-term cryopreservation of Greek fir embryogenic cell lines: recovery, maturation and genetic fidelity. *Cryobiology* 63: 17-25.
- Laine, E., Bade, P. & David, A. 1992. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Reports* 11: 295-298.
- Lambardi, M., Ozudogru, E. A. & Benelli, C. 2008. Cryopreservation of embryogenic cultures. *Teoksessa: B. M. Reed (toim.). Plant cryopreservation. A practical guide.* 1 painos. Springer. s. 177-194.
- Larkin, P. J. & Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Latutrie, M. & Aronen, T. S. 2013. Long-term cryopreservation of embryogenic *Pinus sylvestris* cultures. *Scandinavian Journal of Forest Research* 28: 103-109.

- Litvay, J. D., Verma, D. C. & Johnson, M. A. 1985. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep.* 4: 325-328.
- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. & Reisch, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 6-13.
- Marum, L., Rocheta, M., Maroco, J., Oliveira, M. & Miguel, C. 2009. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Plant Cell Rep.* 28: 673-682.
- McKnight, T., Riha, K. & Shippen, D. 2002. Telomeres, telomerase, and stability of the plant genome. *Plant Molecular Biology* 48: 331-337.
- MetINFO 2014. Metsätietopalvelut. <http://tilastot.metla.fi>. Metsäntutkimuslaitos. Viitattu 20.9.2014.
- Muldrew, K., Acker, J. P., Elliot, J. A. W. & McGann, L. E. 2004. The Water to ice transition: Implications for living cells. Teoksessa: B. Fuller, N. Lane & E. E. Benson (toim.). *Life in the Frozen State*. 1 painos. CRC Press. s. 67-108.
- Nikkanen, T., Heiska, S. & Aronen, T. 2012. New ornamental conifers for harsh northern conditions through cutting propagation of special forms of Norway spruce. Teoksessa: : Y.S. Park & J.M. Bonga (toim.). *Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management*. Brno: s. 98-115.



- Norgaard, J. V., Duran, V., Johnsen, O., Krogstrup, P., Baldursson, S. & von Arnold, S. 1993. Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological, and physiological factors. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 2560-2567.
- Pakkanen, A., Nikkanen, T. & Pulkkinen, P. 2000. Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15: 399-404.
- Perez-Cerezales, S., GutierrezAdan, A., MartinezParamo, S., Beirao, J. & Herraiez, M. P. 2011. Altered gene transcription and telomere length in trout embryo and larvae obtained with DNA cryodamaged sperm. *Theriogenology* 76: 1234-1245.
- Pritchard, H. W. & Nadarajan, J. 2008. Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds. *Teoksessa: B. M. Reed (toim.). Plant cryopreservation. A practical guide. 1 painos. Springer. s. 485-501.*
- Rai, M. K., Shekhawat, N. S., Harish, Gupta, A. K., Phulwaria, M., Ram, K. & Jaiswal, U. 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 179-190.
- Reed, B. M. 2008. Cryopreservation - Practical considerations. *Teoksessa: B. M. Reed (toim.). Plant cryopreservation. A practical guide. 1 painos. Springer. s. 3-11.*
- Reed, B. M. & Uchendu, E. 2008. Controlled rate cooling. *Teoksessa: B. M. Reed (toim.). Plant cryopreservation. A practical guide. 1 painos. Springer. s. 77-92.*

- Sakai, A. 2004. Plant cryopreservation. Teoksessa: B. Fuller, N. Lane & E. E. Benson (toim.). Life in the frozen state. 1 painos. CRC press. s. 329-345.
- Sakai, A., Hirai, D. & Niino, T. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. Teoksessa: B. M. Reed (toim.). Plant cryopreservation. A Practical guide. 1 painos. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH. s. 33-58.
- Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9: 30-33.
- Saksa, T. & Nerg, J. 2008. Kuusen istutus, luontainen uudistaminen ja näiden yhdistelmät kuusen uudistamisessa. Metsätieteen aikakausikirja 4: 255-267.
- Suzuki, M., Ishikawa, M., Okuda, H., Noda, K., Kishimoto, T., Nakamura, T., Ogiwara, I., Shimura, I. & Akihama, T. 2006. Physiological changes in gentian axillary buds during two-step preculturing with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservation. Annals of Botany 97: 1073-1081.
- von Arnold, S., Bozhkov, P., Clapham, D., Dyachok, J., Filonova, L., Hogberg, K. A., Ingouff, M. & Wiweger, M. 2005. Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 323-329.
- Widholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol 47: 189.

Ylitalo, E. & Ihalainen, A. 2013. Metsätilastollinen vuosikirja. Teoksessa: E. Ylitalo (toim.). Metsätilastollinen vuosikirja. Sastamala: Metsäntutkimuslaitos. s. 35-76.