

MAATALOUDEN TUTKIMUSKESKUS

KASVITAUTIEN TUTKIMUSLAITOKSEN

TIEDOTE N:o 31

KATRI BREMER ja PIIRKKO KORHONEN:

KASVUSOLUKKOJEN KÄYTTÖ YDINKASVIEN TUOTOSSA

Vantaa 1978

KASVUSOLUKKOJEN KÄYTTÖ YDINKASVIEN TUOTOSSA

	Sivu
I Teoreettinen osa	1
1. Johdanto	1
2. Kasvusolukot kasveissa	2
3. Lämpökäsittely	5
a. Vaikutus kasviin ja virukseen	5
b. Suoritus käytännössä	6
4. Kasvusolukkojen ravinnevaatimukset	9
a. Perusravinteet	9
b. Vitamiinit	10
c. Hormonit	10
5. Monimeristeemilisäys	14
II Kasvusolukkeviljelytyön käytännön suoritus	19
1. Työpaikat ja -välineet	19
2. Ravintoalustojen valmistusohjeet	23
a. Murashige-Skoog - alusta	23
b. Murashige-Skoog - alustan perunalle käytetty muunnos ja sen valmistus	25
c. Mansikalle käytetyt alustat	27
d. Herukoille ja karviaiselle käytetyt alustat	29
e. Vadelmalle käytetyt alustat	30
f. Omenapuulle käytetyt alustat	31
g. Kookosmaitouute	32
3. Kasvusolukon irroitus kasvista ja siirto ravintoalus- talle	33
4. Kasvusolukkojen kasvuolosuhteet	35
5. Kasvusolukoista saatujen taimien kasvatus	36
6. Virustestaukset	37
a. Peruna	37
b. Mansikka	40
c. Herukat ja karviainen	42
d. Vadelma ja mesivadelma	43
e. Omena	43

I Teoreettinen osa

1 Johdanto

Virus-, mykoplasma- ja eräiden bakteeritautien torjunta kasveista on erittäin vaikeata, eräiden jopa mahdotontakin. Kasvullisesti lisättävissä kasveissa nämä taudit voivat helposti levitä lisäysaineiston mukana ja joskus koko lajike voi olla saastunut. Lisäysaineiston mukana leviäviä tauteja voidaan torjua vain hävittämällä vanhat saastuneet kasvustot ja istuttamalla uudet kasvustot tervettä lisäysaineistoa käytämällä.

Terveen lisäysaineiston saamiseksi tarvitaan taudeista täysin puhtaita ydinkasveja lähtöaineistoksi. Ydinkasveja saadaan joko valikoimalla terveitä kasveja testausten avulla tai puhdistamalla kasvi viruksista ja muista taudinaiheuttajista.

Virukset ovat yleensä levinneet kasvissa sen kaikkiin osiin, mutta kasvusolukot versojen kärjissä ovat usein viruksettomia. Lämpökäsittelyn avulla voidaan virusten lisääntymistä heikentää niin paljon, että versojen kärkiosat tai ainakin niissä olevat kasvusolukot ovat viruksettomia. Ydinkasveja saadaan juurruttamalla lämpökäsiteltyjen kasvien versojen päitä tai irroitettamalla versojen kärkikasvusolukot ja kasvattamalla ne ravintoalustalla taimiksi. Kasvusolukkojen kasvatus antaa varimmman tuloksen, koska silloin päästään useimmiten eroon kaikista, myös vähemmän tunnetuista viruksista.

Sekä verson päitä juurruttamalla että kasvusolukkojen avulla saadut kasvit on vielä testattava, jotta voitaisiin olla täysin varmoja ydinkasvien puhtaudesta.

Maatalouden tutkimuskeskuksen kasvitautien tutkimuslaitoksen tehtäviin kuuluu tuottaa ydinkasveja marjakasveista ja perunasta. Terveiksi testatut ydinkasvit luovutetaan Tervetaimiasemalle ja Siemenperunakeskukselle lisättäväksi.

Seuraavassa selostetaan tämän työn teoreettista taustaa ja kasvitautien tutkimuslaitoksella tässä työssä käytettyjä menetelmiä.

2 Kasvusolukot kasveissa

Kasvusolukkoviljelyksiä tehtiin aluksi teoreettisia tutkimuksia varten, ja jo ennen niitä kasvatettiin kasvien haava- eli kallussolukkoja erilaisilla ravintoalustoilla. Kallussolukkotutkimus oli välttämätön edellytys kasvusolukkoviljelyksille. Kallussolukoille kehitettyjä ravintoalustoja on hyvällä menestyksellä käytetty kasvusolukkojen kasvatukseen. Kasvien hormoneja ja vitamiineja koskevat, kallussolukoilla tehdyt tutkimukset ovat ratkaisevasti edistäneet kasvusolukkoviljelysten onnistumista.

Kasvin kehityksen siemenestä kasviksi voidaan katsoa jakautuvan kasvuun ja erilaistumiseen. Kasvun tuloksena on solujen lukumäärän lisääntyminen, erilaistumisen seurauksena solujen laadun muuttuminen.

Siemenkasvien kasvu onkin rajoittunut tiettyihin alkiosolukoihin, joita nimitetään kasvu- eli meristeemisolukoiksi.

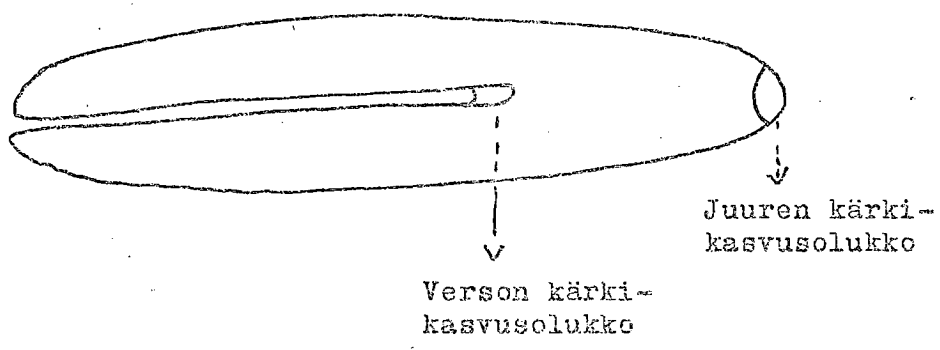
Kasveissa on useita erilaisia kasvusolukoita. Kasvusolukot versojen ja juurten kärjissä aiheuttavat pituuskasvun. Nämä kärkimeristeemit pysyvät kauan kasvukykyisinä, eräissä puissa jopa satoja vuosia. Lehdissä, kukissa ja hedelmissä olevat kasvusolukot ovat erilaisia kuin kärkikasvusolukot. Ne ovat yleensä lyhytikäisiä. Niissä olevat solut jakautuvat aluksi nopeasti ja solut kasvavat vasta myöhemmin lopulliseen kokoonsa. Paksuuskasvun aikaansaavat kasvusolukot sijaitsevat nilan ja puuosan välissä jännejältenä. Kasvusolukot syntyvät alkion kehittyessä ja samalla ne myös sijoittuvat paikoilleen alkiovarren ja juuren kärkeen ja sirkkalehtiaiheisiin.

Kärkikasvusolukkoa ympäröi 1-2 solukerroksen paksuinen tunikakerros, jonka alla sijaitsee emosoluja, joista jakautumalla syntyy varsinainen kasvusolukko. Kasvusolukon solut ovat pienikokoisia, ohutseinäisiä ja jakautuvia.

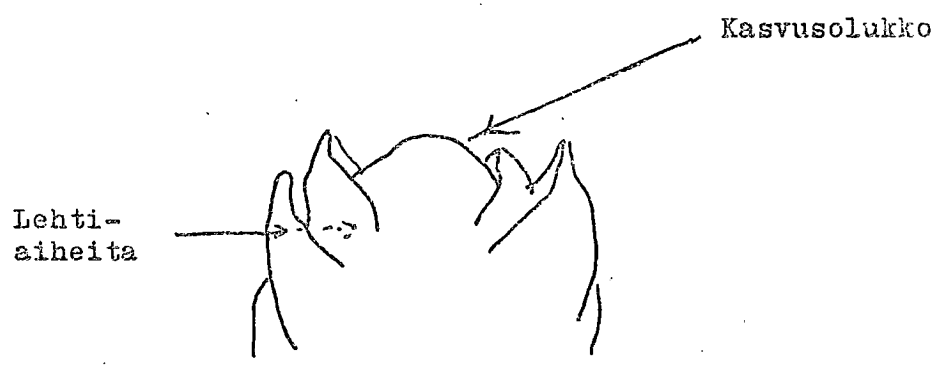
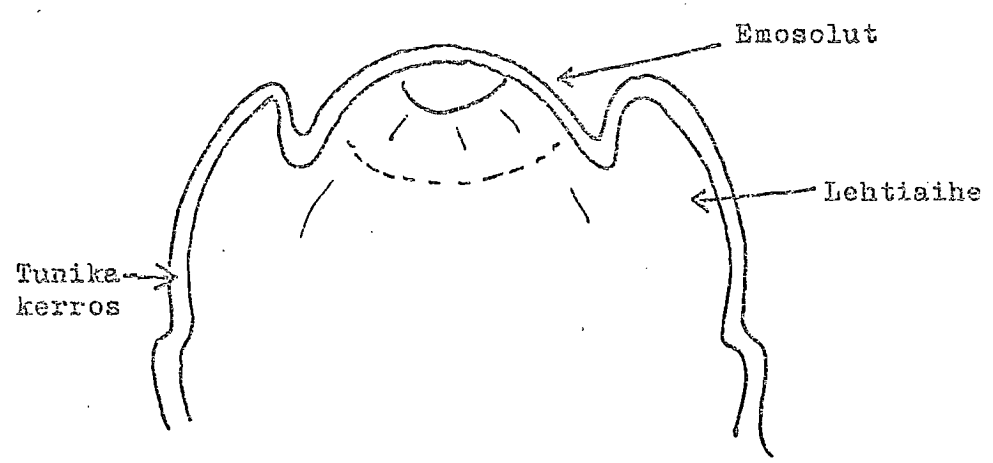
Kasvien versojen kärkikasvusolukot saavat aikaan haarojen, oksien ja lehtien muodostumisen. Lehden aihe syntyy meristeemin reunasoluista ja näkyy pienenä kohoutumana kasvusolukon vieressä (Kuva 1). Sivusilmujen aiheet ilmaantuvat myöhemmin kuin lehtiaiheet, mutta pian ne saavuttavat samantapaisen rakenteen kuin kärkikasvusolukkokin. Kärkikasvusolukko on jatkuvassa kasvussa, sen tuottamat lehdenaiheet jäävät vähitellen alemmaksi missä ne saavuttavat varsinaisen kokonsa.

KUVA 1.

a) Kasvusolukot siemenessä



b) Kaavakuva kasvusolukosta



Kärkikasvusolukko on suuressa määrin itsemääräävä solukko. Se kasvaa ja erilaistuu itsenäisesti kasvusta irroitettunakin kokonaiseksi kasviksi. On kuitenkin todettu, että lehtiaiheilla on meristeemin kasvua edistävä vaikutus. Siksi kasvusolukkoviljelyksiin on tavallisesti otettu varsinaisen kasvusolukon lisäksi myös 1-4 lehtiaihetta.

Kirjallisuutta:

ESAU, K. 1958. Plant anatomy. New York 735 s.

SINNOTT, E.W. 1960. Plant morphogenesis. New York 320 s.

3 Lämpökäsittely

a. Vaikutus kasviin ja virukseen

Lämpökäsittelyä kasvitautien torjumiseksi alettiin käyttää jo 1880-luvulla, jolloin tanskalainen Jensen kokeili lämminilma-käsittelyä perunaruton ja kuumavesikäsitteilyä lentonoen poistamiseksi. Saman vuosikymmenen aikana todettiin Jaavalla lämpökäsittelyn vaikuttavan virus-tautiin tutkija Koben havaitessa, että Sereh-taudin vaivaamista soke-
riruo'oista saatiin tervettä lisäysaineistoa, kun pistokkaat upotettiin $+50 - 60^{\circ}\text{C}$:een veteen joksikin aikaa. Tämä menettely tuli pian rutiininomaiseksi käytännöksi sokeriruokoviljelyksiä perustettaessa.

Erityisen tunnetuksi ja laajalti käytäntöön otetuksi tuli lämpökäsittely virustautien torjunnassa sen jälkeen, kun Kassanis Englannissa 1950-luvulla puhdisti perunoita kierreviroosista $+37,5^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa 25 vrk kestäneellä lämpökäsittelyllä. Alkuaikoina oli käytetty kuumaa vettä tai kuumaa höyryä lämpökäsittelyssä. Tällöin oli vaikeuksia pitää lämpötila ja käsittelyaika sopivina, jotta virus saataisiin inakti-
voiduksi kasvin kärsimättä. Kuumailmakäsittelyn todettiin lopuksi olevan edullisin kasveille.

Lämpökäsittely tuottaa tuloksen vain silloin, kun kasvit kestävät sen tuhoutumatta. Lämmönkestävyys riippuu monesta seikasta. Tärkein niistä on lämpökäsittelyn kesto aika. Yleensä käsittelyaika on sitä lyhyempi mitä korkeampi lämpötila käsittelyssä on. Lämpimään tottuneet subtropi-
pillisten ja troopillisten seutujen kasvit ovat yleensä kestäneet paremmin lämpökäsittelyä kuin kylmän ilmanalan kasvit.

Lähellä $+60^{\circ}\text{C}$ alkavat valkuaisaineet koaguloitua. Siten korkein lämpötila mitä kasvit ovat kestäneet on esim. persikkapuun pistokkaiden läm-
minvesikäsitteilyssä käytetty $+56^{\circ}\text{C}$, eikä käsittely ole saanut kestää tällöin kuin 15 sekuntia. Mansikka-kasvit ovat kestäneet 3 vrk $+48^{\circ}\text{C}$ lämpötilaa.

Vuodenaika vaikuttaa eräiden kasvien lämmönkestävyyteen, perustana on kasvin fysiologinen tila. Esimerkiksi krysanteemit eivät yleensä kestä lämpökäsittelyä talvella, neilikka on kestänyt lämpökäsittelyt yhtäläi-
sesti sekä kesällä että talvella. Hedelmäpuiden lämpökäsittely on eräiden tutkijoiden kokeissa onnistunut hyvin syksyllä kasvun pysähdyttyä, toiset tutkijat taas pitävät kevättä parhaana aikana.

Kasvien lämmönkestävyys on jossain määrin riippuvainen niiden auksiinipitoisuudesta. Jos se on hyvin korkea tai alhainen, aiheuttaa se lepotilan kasvissa. Lämpökäsittely alentaa auksiinipitoisuutta ja tämän seurauksena kasvi voi joutua jopa sen täydelliseen kuihtumiseen johtavaan lepotilaan.

Korkeassa lämpötilassa on kasvien hengitys vilkasta ja johtaa hiilihydraattivarastojen nopeaan kulumiseen. Sen vuoksi kasvit, joiden hiilihydraattipitoisuus on korkea, kestävät parhaiten lämpökäsittelyä. Hiilidioksidin lisäämisellä lämpökäsittelyn aikana on myös suotuisa vaikutus.

Virusten lämmönsietorajalla ja lämpökäsittelyn lämpötilalla tai sen pituudella ei ole mitään suoranaista suhdetta. Jopa saman viruksen eri rodut inaktivoituvat eri tavoin lämpökäsittelyssä. On todettu että ns. keltaisuustautien aiheuttajat, jotka ovat mykoplasmojen kaltaisia organismeja, ovat helposti poistettavissa kasveista. Niille on yleensä riittänyt 7-14 vrk kestävä lämpökäsittely $+36 - 40^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa, joillekin jopa 10-20 min. $+50^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa. Mehulevintäiset, isometriset viruskappaleet omaavat virukset ovat myös verraten helposti poistettavissa lämpökäsittelyllä.

Jäykkinä sauvamaisina kappaleina esiintyvät virukset, kuten esim. TMV, perunan X ja S virukset ovat hyvin lämpökäsittelyn kestäviä. Kirvaleyvintäisistä, pitkiä lankamaisia viruskappaleita omaavista viruksista osa on vaikeasti poistettavissa kasveista lämpökäsittelyn avulla, osa taas melko helposti.

Eräät virukset ovat poistettavissa vain useita viikkoja, jopa kuukausia kestävä lämpökäsittelyn avulla ja eräitä viruksia ei ole vielä onnistuttu poistamaan ollenkaan. Lämpökäsittely tuottaa tuloksen silloin, kun viruksen inaktivoituminen kasvissa on nopeampaa kuin viruksen lisääntyminen.

b. Suoritus käytännössä

Erittäin hyvin sopii lämpökäsittelyyn lampuin ja termostaatein varustettu lämpökaappi, jossa on hyvä olla myös ilman kosteuden säätömahdollisuus. Valaistus voi olla jatkuva tai 16 t kestävä, 5000-6000 luksia

voimakkuudeltaan. Kasveille on edullista, jos lämpötilaa voidaan vaihdella jaksottain ja pitää yölämpö päivälämpöä noin 5°C alhaisempana. Lämpökäsittelyyn sopiva tila voidaan järjestää myös johonkin kasvihuoneosastoon, jos lämpötila voidaan pysyttää siinä vakiona ainakin tietyissä rajoissa. Lämpötila saa jonkun verran vaihdella, mutta se ei saisi nousta yli +40°C, sillä useimmat kasvit vioittuvat silloin. Kasvihuoneessa pitää saada auringon valon lisäksi talvisin keinovaloa.

Virusten heikentäjinä ovat +35 - 40°C väliset lämpötilat tehokkaimmat. Korkeille lämpötiloille arat kasvit kestävät lämpökäsittelyn parhaiten, jos ne saavat vähitellen tottua (1-2 viikon ajan) asteittain korkeammaksi nostettuun lämpötilaan. Eräät kasvit viihtyvät paremmin, jos ilman kosteus ei ole kovin suuri. Liika kastelu ei ole hyväksi lämpökäsittelyssä oleville kasveille. Saviruuikut ovat ilmavina ja viilleämpinä muoviruuikkuja paremmat lämpökäsiteltäville kasveille. Kasvien juuret saisivat olla noin 5°C alhaisemmassa lämmössä kuin kasvien latvaosat.

Lämpökäsittelyyn tulevien kasvien tulisi olla hyvin juurtuneita, ei aivan nuoria taimia, mutta ei myöskään liian vanhoja. On hyvä, jos kasveilla on riittävät hiilihydraattivarastot. Monet kasvilajit ovat kestäneet lämpökäsittelyn parhaiten jonkin aikaa lepokauden jälkeen - keväällä - aloitettuna. Mansikan ja perunan lämpökäsittelyt ovat onnistuneet hyvin loppukesäisinkin.

Useimmat virukset inaktivoituvat 3-4 viikkoa kestävästä lämpökäsittelyn aikana niin paljon, että useimmat kasvusolukot ovat viruksettomia. Jotkut virukset eivät heikenny ollenkaan lämpökäsittelyssä, mutta jotkut kasvusolukot saattavat silti olla viruksettomia ja näin ollen kasvusolukkoviljely on usein ainoa keino saada aikaan viruksettomia kasveja.

Tärkeimmät ohjeet lämpökäsittelystä ovat:

- Lämpökäsittelyyn valitaan hyvin juurtuneita, hyvässä kasvussa olevia kasveja.
- Lämpötila voi vaihdella +35 ja +40 asteen välillä, usein on +37 astetta sopiva lämpötila.
- Valon tulee olla riittävä lämpökäsittelykaapissa, jotta kasvien kasvu pysyisi voimakkaana ja normaalina.
- Kasvit kastellaan kohtuullisesti vedellä, jonka on annettu lämmetä lämpökäsittelykaapissa.

- Kasvien ravinnon tarpeesta huolehditaan lämpökäsittelyn aikana. Ravinnekastelu annetaan kerran viikossa.
- Lämpökäsittelyaika vaihtelee viruksen ja isäntäkasvin mukaan. Usein on 3-4 viikkoa riittävä.
- Koko kasvi ei puhdistu lämpökäsittelyssä. Kasvista otetaan joko pienet versojen päät juurrutettaviksi tai kasvusolukot ravintoalustalla kasvatettaviksi.
- Lämpökäsittelystä kasvista peräisin olevat kasvit on testattava huolellisesti useampaan kertaan riittävän pitkän ajan kuluessa.

Kirjallisuutta:

- BAKER, K.F. 1962. Thermotherapy of planting material. *Phytopath.* 52, 1244-1255.
- KASSANIS, B. 1954. Heat-therapy of virus-infected plants. *Ann. Appl. Biol.* 41, 470-474.
- 1957. Effect of changing temperature on plant virus diseases. *Adv. Virus Research* 4, 221-241.
- KRISTENSEN, H. RØNDE & THOMSEN, A. 1970. Varmebehandlingsers indflydelse på planter og plantevira. *Tidsskr. Pl.avl* 74, 264-280.
- NYLUND, G. & COHEEN, A.C. 1969. Heat therapy of virus diseases of perennial plants. *Ann. Rev. Phytopath.* 7, 331-354.

4 Kasvusolukkojen ravinnevaatimukset

a. Perusravinteet

Kasvusolukko on erikoistumatonta solukkoa, jonka solut tarvitsevat miltei kaikki ravinteensa ympäristöstään. Siten versosta irroitettun meristeemin tulee saada kasvaakseen varsin monipuolinen kasvualusta.

Kasvista irroitettun solukon ravinnevaatimukset ovat luultavasti erilaiset kuin sen ollessa kasvin muiden osien yhteydessä. Vain kokeilemalla voidaan sopiva ravintoalusta saada selville.

Kasvusolukkoviljelykset voivat tulla jonkun aikaa toimeen ilman hiilihydraattia ravintoalustassaan, mutta ei pitkää aikaa. Eri tutkijat ovat käyttäneet ravintoalustoissa hiilihydraatin lähteenä dekstroosia tai sakkaroosia, glukoosia, mallassokeria, laktoosia, alkoholeja, orgaanisia happoja, pektiiniä, tai tärkkelystä. Parhaimmiksi ja yleisimmin käytetyiksi ovat osoittautuneet sokerit, lähinnä sakkaroosi ja dekstroosi. Mansikalle ja muille marjakasveille on käytetty hyvällä menestyksellä glukoosia. Sokerin määrä alustassa on ollut tärkeä, optimikasvun ovat antaneet 0,5 - 2 % väliset väkevyydet, 2 % on yleisimmin käytetty. Marjakasveille on glukoosia annettu jopa 4 % asti.

Typen määrä ja laatu ravintoalustassa on hyvin merkityksellinen solukon kasvulle. Monia epäorgaanisia ja orgaanisia typpiyhdisteitä on kokeiltu. Nitraattityppi on useimmiten ollut paras. On paljon vertailtu tulisiko typpi antaa natrium- vai kalsiumnitraattina, ammoniumnitraattina vai ammoniumsuoloina. Huomattavia eroja ei ole löydetty, mutta yleisimmin käytetyssä ravintoalustassa, Murashige-Skoogin alustassa typpi on annettu ammonium-, kalsium- ja kaliumnitraattina sekä lisäksi on annettu orgaanista tyyppiä maitoalbumiinivalmisteena (Edamin).

Fosfori on annettu kalium- tai natriumfosfaattina (K_2HPO_4) tai $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$.

Hivenaineita, jotka ovat välttämättömiä solukkokasvatuksille ovat mm. Murashige-Skoog alustassa käytetyt: magnesium ($MgSO_4$), rauta (4Fe), boori (H_3BO_3), sinkki ($ZnSO_4$), jodi (KI), mangaani ($MnSO_4$), kupari ($CuSO_4$) ja koboltti (CoCl). Rikkiä tulee riittävästi eräiden edellisten aineiden sulfaattiyhdisteistä.

Kasvusolukkojen kasvualustan happamuudella on tietenkin merkitystä solukon kasvulle. Useimmat kasvusolukot ovat kasvaneet hyvin, jos alustan pH on ollut 5,6 - 6,0, mutta jotkut kasvusolukot ovat kasvaneet hyvin myös pH 7,0.

b. Vitamiinit

Kasvusolukot syntetisoivat vitamiineja, mutta ne kasvavat paremmin, jos ravintoalustaan lisätään vitamiineja. Ainakin seuraavat B-ryhmän vitamiinit ovat tarpeen:

nikotiinihappo

aneuriini eli tiamiini (B₁-vitamiini)

adermiini eli pyridoksiini (B₆-vitamiini)

myo-inositoli = meso-inositoli.

Myo-inositolilla on ollut selvä kasvua lisäävä vaikutus.

Vitamiinien lisäksi alettiin 1950-luvulla käyttää solukkoviljelysten kasvualustoissa eräitä luonnosta saatuja aineita, joiden vaikuttavina aineina todettiin myöhemmin olevan vitamiinit ja kasvuhormonit. Näistä on kookosmaitouute ollut yleisimmin ja menestyksellisimmin käytössä. Myös on käytetty hiiva- tai mallasuutetta, tomaattimehua, maissin, hevostakanjan tai saksanpähkinän siementen siemenvalkuaisesta tehtyä uutetta.

c. Hormonit

Kasvusolukon kasvu ja erilaistuminen kasvin eri osiksi tapahtuu geenien ja kasvihormonien vaikutuksesta, ja kasvin kehitystä voidaan ohjeilla kasvualustaan lisättyjen hormonien avulla. Kasvuhormoneja valmistuu kasveissa, jopa kasvusolukossakin, mutta kasvista irroitettujen kasvusolukoiden tuottamat hormonimäärät eivät ole riittäviä. Kasvuhormoneja voidaan valmistaa synteettisesti ja lisätä ravintoalustoihin muiden ravinteiden tapaan.

Kasveissa vaikuttavat kasvuhormonit voidaan jakaa kolmeen päätyyppiin. Seuraavassa on esitetty kunkin päätyypin hormoneista ne, joita on käytetty kasvusolukkojen ravintoalustoissa.

- 1) Auksiinit, IAA = indolyylietikkahappo
 NAA = naftyylietikkahappo
 IBA = indolyylivoihappo
- 2) Gibberelliinit, GA₃ = gibberelliinihappo
- 3) Sytokiniinit, adeniinisulfaatti
 BAP = 6- bentsyyliaminopuriini
 IPA = Zeatiinin tapainen aminopuriini
 kinetiini = 6- furfuryaminopuriini
 zeatiini = 6-(4-hydroxy-3-methyl but-2-enyl) amino-
 puriini

Auksiinit

Tunnetuimpia auksiineja on IAA, indolyylietikkahappo. Sitä muodostuu versojen kärkikasvusolukoissa, lehdissä ja hedelmissä, joista se kulkeutuu nopeasti kasvin kaikkiin osiin.

IAA tuhoutuu helposti sekä kasvissa että vesiliuoksessa valon vaikutuksesta. Sen vuoksi IAA:n asemasta käytetään usein paremmin säilyvää NAA, naftyylietikkahappoa. Auksiineilla on kasveissa lukuisia erilaisia vaikutuksia. Auksiinit edistävät kasvua lisäämällä solujen pituus- ja laajuuskasvua. Erittäin huomattava on auksiinien juurten kasvua edistävä vaikutus. Sen vuoksi niitä käytetäänkin paljon apuna pistokkaita juurrutettaessa.

Auksiinit osallistuvat myös silmujen muodostumiseen, hedelmien kasvuun, lehtien ja hedelmien varisemiseen.

Monet auksiinien vaikutuksista tapahtuvat yhdessä joko gibberelliinien tai sytokiniinien kanssa.

Vallitseva piirre auksiinien vaikutustavalle on vaikutuksen riippuvuus auksiinin väkevyydestä. Liian suurina annoksina auksiinit toimivat pikemminkin kasvun ehkäisijöinä kuin edistäjinä. Tähän perustuu auksiinien käyttö rikkakasvien torjunnassa.

Gibberelliinit

Gibberelliinejä tunnetaan yli 20, mutta kasvusolukkoviljelyksissä on käytetty pääasiallisesti gibberelliinihappoa, GA₃.

Gibberelliinejä muodostuu versojen kärkisilmuissa, kasvavissa lehdissä, hedelmissä ja juurissa ja ne kulkeutuvat siiviläputkissa kasvin kaikkiin osiin.

Gibberelliinit edistävät kasvisolukkojen pituuskasvua. Tämä ilmenee lehtien ja varsien lisääntyneenä pituutena. Varren nivelvälit pitenevät haarojen ja lehtien lukumäärän lisääntymättä.

Gibberelliinien vaikutus on ollut suurin kääpiökasvuisissa mutanttilajikkeissa, joista gibberelliinien vaikutuksesta on kasvanut normaalkokoisia kasveja. Kääpiökasvuisuus ei kuitenkaan johdu liian vähäisestä gibberelliiniväkevyydestä.

Gibberelliinit eivät kuitenkaan pysty yksikseen saamaan aikaan versojen pidentymistä vaan ainoastaan yhdessä auksiinien kanssa. Gibberelliinit lisäävät auksiinien vaikutusta myös siemenettömien (partenokarpusten) hedelmien tuotossa.

Gibberelliineillä on kyllä sellaisiakin vaikutustapoja, joita auksiineilla ei ole. Esim. siementen, sipulien ja mukuloiden lepoajan keskeyttäminen. Joissakin tapauksissa gibberelliinien vaikutustapa on aivan päinvastainen kuin auksiinien, esim. auksiinit edistävät, gibberelliinit ehkäisevät juurten muodostumista pistokkaisiin. Gibberelliinien ei ole todettu suurinakaan annoksina annettuna vioittaneen kasveja kuten auksiinit tekevät.

Sytokiniinit.

Sytokiniinit opittiin tuntemaan ja eristämään vasta 1950-60-luvulla. Nykyisin monia sytokiniinejä valmistetaan synteettisesti ja käytetään solukkoviljelysten ravintoalustoissa. Sytokiniinit edistävät erityisesti solujen jakautumista ja yhdessä auksiinien kanssa ne vaikuttavat solujen erilaistumiseen. Sytokiniinien avulla on saatu paitsi kasvusolukkoja, myös aivan erilaistumatonta kallussolukkoa, jopa yksittäisiä soluja kasvamaan ja erilaistumaan kokonaisiksi kasveiksi. Erittäin merkityksellistä erilaistumistapahtumalle on sytokiniinien ja auksiinien keskeinen suhde ravintoalustassa. Se on useimmiten kokeiltava joka kasvilajille, jopa lajikkeellekin.

6-bentsyyliaminopuriini, BAP on erittäin tehokasvaikutteinen, synteettinen sytokiniini. Se edistää sivusilmujen solujen jakautumista ja heikentää pääversion hallitsevaa vaikutusta, joka muutoin estäisi sivuversojen muodostumisen. Tätä BAP:in vaikutusta käytetään hyväksi monimeristeemiviljelyksissä, joita selostetaan myöhemmin.

Sytokiniineillä on siis suuri vaikutus erilaistumiseen, joskin muutkin kasvihormonit vaikuttavat siihen. Kasvihormonien vaikutustavan perustana on niiden osallistuminen geenitoimintaan.

Kunkin kasvilajin kehitys on tietyn ohjelman mukainen ja tämä ohjelma on koodattu kunkin lajin geeneihin. Kasvin solut eivät sisällä eriarvoisia, eri toimintoja ohjaavia geenejä, vaan eri geenit tulevat eri aikoina aktiivisiksi. Eri geenit siis alkavat ja lopettavat toimintansa eri aikoina. Siirtyminen kehitysstadiolta toiselle tapahtuu siten sarjana eri geeniryhmien aiheuttamia toimintoja. Jos soluryhmä on alkanut tietyn erilaistumisprosessin, ei solukko voi enää palautua ennalleen ja alkaa toisenlaista kehityssuuntaa.

Kun kasvin kehitysvaiheet ovat näin säännölliset, täytyy kasvissa olla joku mekanismi, joka kytkee tietyt geenit toimimaan tietyssä vaiheessa ja toisessa vaiheessa taas päältä pois kuin sähkövirran katkaisijasta.

Kasvuhormonit voivat toimia ainakin osana tällaista mekanismia, koska ne pystyvät virittämään geenit toimintaan. Geenit sitten määräävät millainen on tämän toiminnan tulos, joskin eräissä tapauksissa hormonit voivat vaikuttaa myös kehityksen laatuun.

Jotkut kasvuhormonit, eräät gibberelliinit voivat myös estää tiettyjen geeniryhmien toiminnan.

Vaikka kasvuhormonien vaikutusmekanismia ei vielä tunneta yksityiskohdittain, on varmaa, että niillä on syvälle käypä vaikutus joko suoraan tai epäsuorasti geenitoimintaan. Tulevaisuudessa kasvihormonien merkitys on suuri välineenä, jolla kasvien kasvua ja kehitystä voidaan ohjata haluttuun suuntaan.

5. Monimeristeemilisäys

Lämpökäsittelyjen ja kasvusolukkoviljelysten avulla saadaan usein vain yksi tai muutamia harvoja terveitä kasveja, joista koko lajin tai lajikkeen lisäys on aloitettava. Tämän lisäystyön nopeuttamiseksi on pyritty kehittämään monenlaisia menetelmiä, joilla lisäystä voitaisiin nopeuttaa. Monia vanhoja menetelmiä onkin voitu parantaa ja käyttää myös kasveille, joilla sitä ei käytännön viljelyksillä ole käytetty.

Jotta ydinkasveja voitaisiin lisätä nopeasti, olisi niiden tuotettava runsaasti uusia versoja tai muita lisäykseen sopivia kasvinosia. Ydinkasvin olisi oltava muodoltaan runsashaarainen, pensasmaisen kasvi. Kasveissa on kuitenkin olemassa ilmiö, kärkisilmun vallitsevuus eli apikaali dominanssi, joka estää kasvien runsasta versojen tuottoa.

Kasvusolukkokasvatuksissa kärkikasvusolukon vallitsevuus on voitu estää sytokiniinien avulla. Tällöin on käytetty ravintoalustaan annettuna kinetiiniä tai bentsyyliaminopuriinia, ja se on saanut aikaan runsaan versoaiteiden muodostumisen joko kasvusolukko- tai joissakin tapauksissa myös kallussolukkoviljelyksissä.

Tällaista lisäysmenetelmää on nimitetty monimeristeemi- tai mikrolisäykseksi. Toisaalta kaikkea koeputkessa tapahtuvaa kasvien kasvatusta on nimitetty mikrolisäykseksi, joten monimeristeemilisäys lienee sopivampi nimitys.

Monimeristeemilisäyksessä sytokiniinejä avuksi käyttäen kiihkeitetään meristeemi tuottamaan yhä uusia ja uusia kärkikasvusolukkoja ja siten uusia versojen aiheita. Irroitamalla versojen aiheet toisistaan ja kasvattamalla niitä edelleen voidaan saada lukuisia uusia kasveja lyhyessä ajassa.

Menetelmää on käytetty menestyksellisesti mansikan lisäyksessä. Englantilainen tutkija Adams julkaisi v. 1972 ohjeen uudistetusta mansikan kasvusolukkojen viljelyyn sopivasta ravintoalustasta. Meristeemit kasvoivat melko hyvin tällä alustalla ja ne tuottivat sivuversoja niin, että neljästä kasvualustalle siirretystä meristeemistä saatiin 17 juurutettua kasvia ensimmäisessä kokeessa.

Myös eräät japanilaiset tutkijat totesivat v. 1973, että bentsyyliamiinopuriinin avulla voitiin tuottaa runsaasti mansikan uusia versoja yhdestä ainoasta kasvusolukosta ja ovat käyttäneet tätä hyödykseen käytännössä. Belgialainen Boxus perusti varsinaisen mansikan lisäyslaboratorion ja hänen jälkeensä ovat eräät kasvinjalostajat ja taimien tuottajat käyttäneet monimeristeemimenetelmää hyödykseen taimien suurtuotannossa.

Käytännössä mansikan monimeristeemilisäys tapahtuu seuraavasti:

Mansikan rönsyn päästä irroitettu kasvusolukko siirretään kasvamaan perusalustalle, joka on muunnos Murashige-Skoog-alustasta, kasvuaineena indolyylivoihappo (IBA). Kun kasvusolukko on kasvanut jonkun verran ja muodostanut lehtiä, se siirretään lisäysalustalle, joka on muutoin sama kuin perusalusta, mutta johon on IBA:n lisäksi annettu gibberelliinihappoa (GA_3) ja bentsyyliamiinopuriinia (BAP). Molempia esim 1 mg/l.

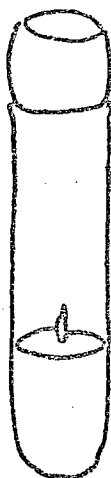
Lisäysalustalla kasvusolukosta kehittyy noin 4-6 viikon aikana monien versojen muodostama pensasmainen rykelmä. Tämä pensas voidaan jakaa veitsellä steriilisti yhden verson osiin, jotka voidaan siirtää joko lisäysalustalle uudelleen jakautumaan tai sitten takaisin perusalustalle, jossa versot eivät enää jakaudu, vaan saavat juuret (Kuva 2). Juurelliset pienet taimet voidaan ottaa pois agarilta ja siirtää kasvamaan multaan ruukkuihin.

Tämä lisäysmenetelmä on sangen nopea, jos alusta on sopiva mansikkalajikkeelle. Yksi kasvusolukko tuottaa 4-6 viikon aikana noin parikymmentä uutta versoa. Eräs saksalainen kasvinjalostaja on tällä menetelmällä saanut vuoden aikana yhdestä kasvusolukosta lisätyksi noin miljoona mansikan tainta.

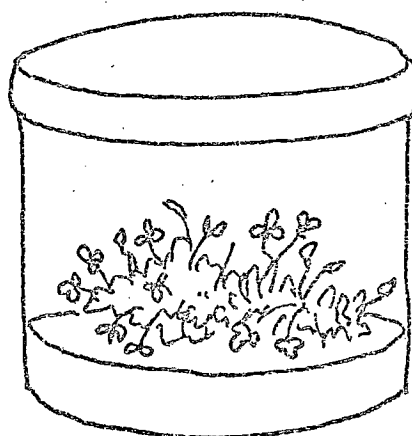
Monimeristeemilisäys on onnistunut hyvin mansikalla. Sitä on kokeiltu ja jossain määrin käytettykin myös muille kasvilajeille.

Kaikille kasvilajeille, joista kasvusolukkoviljelyksiä tehdään, monimeristeemilisäystä ei ole kokeiltu. Eikä se onnistunekaan kaikille, sillä eräiden kasvilajien kasvusolukoissa esiintyy mm. kromosomiluvun vaihte-luita eri soluissa ja kasvatuksissa saattaa tulla haploidisia tai polyploidisia kasveja halutun esim. diploidisen kasvin sijasta.

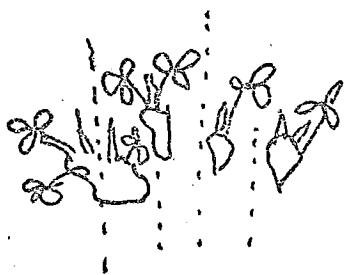
KUVA 2. Monimeristeemilisyys



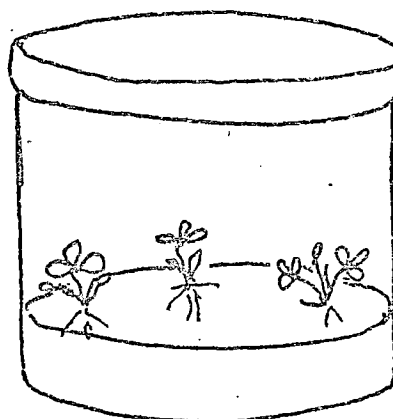
Jonkin verran kasvanut kasvusolukko siirretään sytokiniinipitoiselle kasvualustalle



jossa alkaa runsas versojen muodostus.



Juureton versopensas voidaan jakaa



ja irroitettut versot juurruttaa juurrutus-
alustalla

Kasvitautilien tutkimuslaitoksella suoritetuissa kokeissa menetelmä on onnistunut mansikalla Red Gauntlet, Senga Sengana ja Ostara -lajikkeilla. Ostara-lajike on kokeiltavana sen vuoksi, koska sen rönsyn muodostuskyky on heikko ja silloin tarvitaan toisenlainen lisäysmenetelmä.

Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on kokeiltu vähäisessä määrin monimeristeemisäystä mansikan ohella myös perunalla, viinimarjoilla ja omenapuun perusrungolla, mutta kokeet ovat olleet vielä riittämättömiä lisäysmenetelmän käytäntöön soveltamista varten.

Monimeristeemimenetelmän merkityksestä mainittakoon seuraavaa:

Kasvien lisäys tapahtuu ilman tauti- ja tuholaisvaaraa vuodenaajoista riippumatta ja lisäysnopeus on suuri.

Taimituotanto voidaan ajoittaa hyvin, sillä koepulloissa olevia verso-kasvatuksia voidaan pitää elinkelpoisina noin $+5-7^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa heikossa valossa jopa puolen vuoden ajan ja ottaa tämän jälkeen taas uudelleen kasvamaan lämpimään.

Kansainvälinen taimikauppa sujuu koeputkitaimien avulla helposti ilman tauti- ja tuholaisvaaraa.

Kirjallisuutta:

- ADAMS, A.N. 1972. An improved medium for strawberry meristem culture. *J. hort. Sci.* 47, 263-264.
- HOLLINGS, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopath.* 3, 367-396.
- KASSANIS, B. 1967. Plant tissue culture. s. 537-566. *Methods in Virology*, Vol. I Edit. K. Maramorosch & H. Koprowski. New York 640 s.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.
- & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- NISHI, S. & OHSAWA, K. 1973. Mass production of virus-free strawberry plants through meristem callus. *Japan Agr. Res. Quart.* 7, 189-194.
- STEWART, F.C., MAPES, M.O. & AMMIRATO, P.V. 1969. Growth and morphogenesis in tissue and free cell cultures. s. 329-376 *Plant Phys.* Vol. V B. s. New York.
- STREET, H.E. 1969. Growth in organized and unorganized systems. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants. *Plant Phys.* Vol. V B. s. 3-224. New York.

- WARING, P.F. & PHILLIPS, I.D.J. 1971. The control of growth and differentiation in plants. Oxford 303 s.
- WESTPHALEN, H.J. & BILLEN, W. 1976. Erzeugung von Erdbeerpflanzen in grossen Mengen durch Sprossspitzenkultur. Erwerbsobstbau 18, 49-50.

II Kasvusolukkoviljelytyön käytännön suoritus

1. Työpaikat ja välineet sekä niiden puhdistus

Kasvusolukkokasvatuksia varten tarvitaan siistiä, pölytöntä laboratoriotilaa, jossa kaikki pinnat ovat helposti puhdistettavissa. On hyvä jos saatavilla on huone valmistelevia töitä varten ja välittömästi sen yhteydessä puhdastyöhuone, jossa on koneellinen ilmanpuhdistus tai johon voidaan sijoittaa esim laminaarivirtauskaappi, joka on kaikkein siistein työtila koska ilma puhdistuu siinä itiöistä koneellisten suodattimien avulla.

Laminaarivirtauskaappeja halvempia ovat elektroniset ilmanpuhdistajat, jotka myös poistavat ilmasta pölyhiukkasia ja itiöitä.

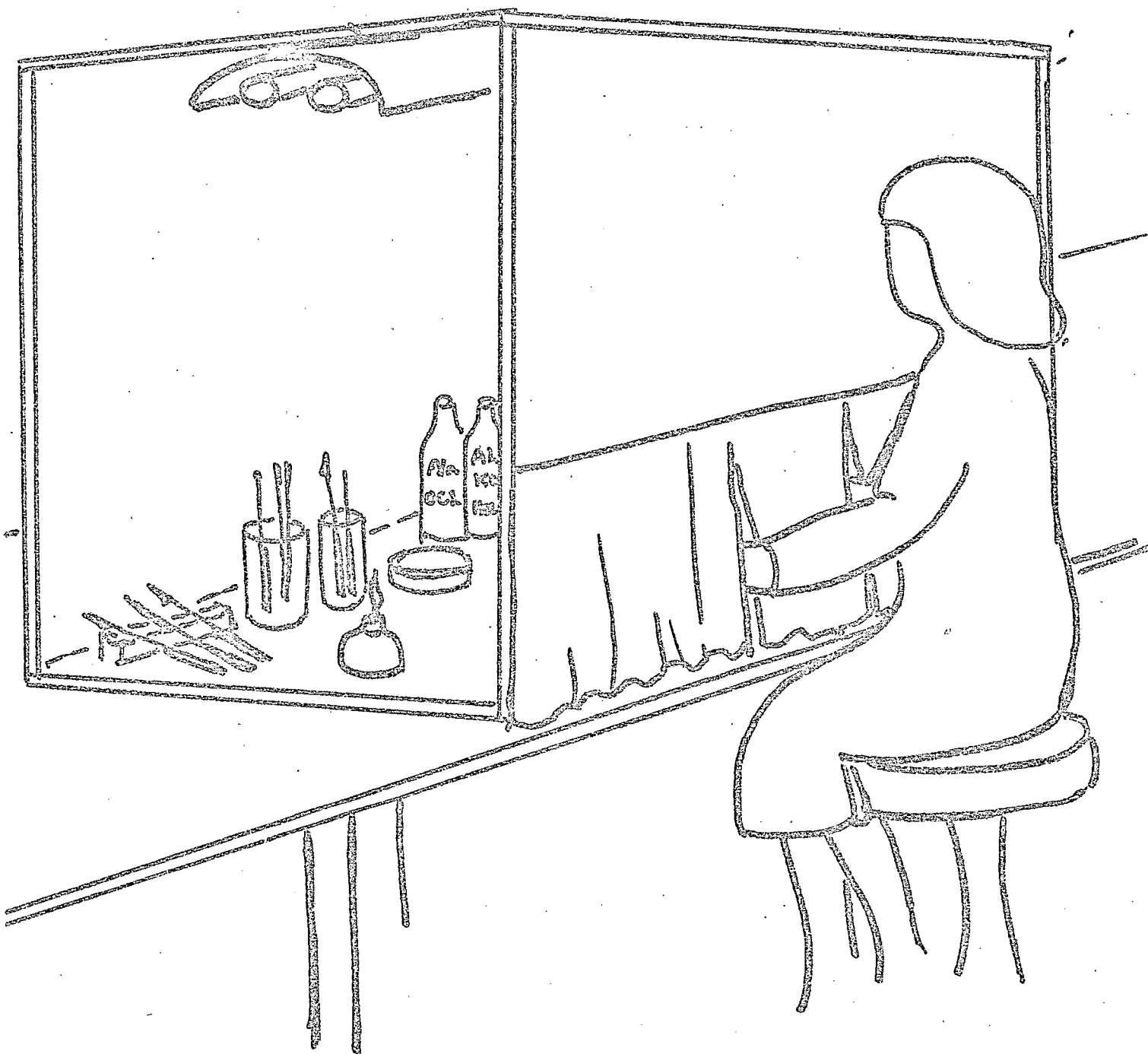
Kaikkein halvin siisti tila saadaan siirrostuskaapista, joka on vain sen verran suuri, että työntekijän kädet, työvälineet ja siirrettävät kasvatukset mahtuvat siihen. Siirrostuskaappi voidaan pitää puhtaana kattoon sijoitetun ultraviolettilampun avulla, ja desinfiointiaineilla puhdistamalla (Kuva 3).

Edellisten lisäksi tarvitaan tilat autoklaavia, desinfioimislämpökaappia ja kasvatusastioiden pesua varten. Vaakaa varten tarvitaan myös tila ja varastotilaa kemikaaleita ja lasitavaraa varten.

Steriilin huoneen pöytien yläpuolelle sijoitetaan ultraviolettilamput, myös tässä huoneessa käytettävät välineet esim. työtakit ja mikroskooppi on hyvä säilyttää käytön välillä ultraviolettilamppujen alla, joiden pitäisi olla toiminnassa ennen työn alkua vähintään kahden tunnin ajan. Työn aikana niitä ei saa pitää päällä ja on varottava katsomasta ultraviolettilamppuihin, koska niistä lähtevä valo on erittäin vaarallista silmille. Myös on pidettävä mielessä, että ultraviolettivalo ei tehoa lasin läpi.

Steriilin huoneen pöydät ja lattiat puhdistetaan joka päivä työn jälkeen esim. 5 % kalsium- tai natriumhypokloriitilla, tolulla tai muilla aineilla. Myös alkoholilla voidaan puhdistaa pöytiä, mutta on pidettävä mielessä, että alkoholi on herkästi palavaa.

Kuva 3. Ultraviolettilampulla varustettu eristyskaappi.



Ennen työn aloittamista tarkistetaan, että työhuone on siisti, desinfioidut työvälineet ovat valmiina paikalla, kaasuliekki tai bunsenlamppu tai muut desinfioimisvälineet ovat paikalla käyttövalmiina.

Seuraavia välineitä tarvitaan kasvusolukkoviljelyksiä tehtäessä:

Autoklaavi, jonka suuruus riippuu tarvittavien kasvualustojen määrästä. Ravintoalustat ja välineet voidaan desinfioida 120°C lämpötilassa ilmakehän paineessa 20-30 minuutin ajan.

Lämpökaappia voidaan käyttää kasvatusastioiden, työvälineiden ym. desinfioimiseen. Riittävä desinfiointi-aika on 3-4 tuntia 170°C lämpötilassa. Veitset, pinsetit ja pienet välineet on hyvä kääriä alumiinipaperiin desinfioinnin ajaksi, jotta niitä on myöhemmin helpompi käsitellä ja ne kuitenkin säilyvät steriileinä.

Vaa'an tulee olla niin tarkka, että esim. vitamiineista ja kasvuhormoneista tarvittavat pienet määrät voidaan punnita riittävän tarkasti, vaikka käytettäisiinkin väkevoitetyjä perusliuoksia. Vaaka, jolla päästään 0,1 mg tarkkuuteen on sopiva. Vaa'alla tulee olla tukeva alusta ja pölytön sijaintipaikka.

Spriilamppuja tarvitaan avattujen koeputkien suiden, veitsien ym. desinfiointiin. Kaasulamppua voidaan myös käyttää, mutta siirrostuskaapeissa on spriiilamppu kätevämpi.

Desinfiointiaineet. Pöytien, lattioiden ja muiden pintojen desinfiointia varten tarvitaan desinfiointiaineita. Tähän tarkoitukseen sopivat esim. etyylialkoholi 70-90 %, jota voidaan käyttää myös kasvin osien, käsien, käsineiden, veitsien ja muiden välineiden desinfiointiin.

Natrium- tai kalsiumhypokloriittia voidaan käyttää myös pöytien ja lattioiden puhdistukseen. Se on vaaratonta kasvisolukoille ja voidaan siksi käyttää niiden desinfiointiin alkoholin ohella tai asemasta. Tolua voidaan myös käyttää.

Steriiliä vettä tarvitaan kasvin osien puhdistukseen. Steriiliä vettä saadaan parhaiten autoklavisoimalla vettä keittopullossa ja isoissa putkissa samalla tavoin kuin ravintoalustoja.

Pienet työvälineet. Kasvusolukoiden irrottamista ja siirtämistä varten tarvitaan veitsiä, preparointineuloja, pinsettejä ym. Erittäin hyviä

ovat laboratorioveitset, joissa on irroitettavat, ei liian suuret terät. Kaikki nämä välineet on voitava desinfioida. Veitsiä on oltava riittävästi, jotta eri työvaiheita varten on olemassa riittävästi desinfioituja välineitä. Työvälineiden desinfiointi suoritetaan lämpökaapissa tai spriihin kastaen, ei koskaan liekissä kuumentaen.

Kasvusolukkojen kasvatusastioina voidaan käyttää koeputkia, leveäsuuisia lasipulloja ja lasipurkkeja kasvatettavien kasvien koon mukaan. Putkien ja pullojen sulkemiseen voidaan käyttää metallikorkkeja, pumpulituppoja, joiden ympärille kiedotaan alumiinipaperia tai parafiinikalvoa haihtumisen ehkäisemiseksi.

Merkinnät kasvatusastioihin tehdään joko erityisellä merkintäkynällä tai niihin liimataan laput merkintöineen.

Ravintoalustoja valmistettaessa tarvitaan mittapulloja ja muita lasipulloja sekä pipettejä. Valmiiden perusliuosten säilytystä varten tarvitaan jääkaappi ja muu valolta suojattu, siisti kaappi. Joitakin ravinteita, kuten esim. kookosmaitoa ja hormoni- ja vitamiiniliuoksia on paras säilyttää syväjäädetyttynä, joten syväjäädetytsarkku on tarpeen. Ravintoalustojen pH-mittausta varten tarvitaan pH-mittari.

2. Ravintoalustojen valmistusohjeet

a. Murashige-Skoog ravintoalusta (MS)

Kaikkien tässä esitettyjen kasvatusalustojen perustana on Murashigen ja Skoogin (1962) tupakan kallussolukkoviljelyksiä varten kehittämä alusta, joka pienin muutoksin on sopinut hyvin monien kasvien kasvusolukkojen kasvatukseen. Taulukossa 1 on esitetty Murashige-Skoog (MS) alustan alkuperäinen koostumus, vaikka sellaisenaan emme olekaan sitä käyttäneet ja sen vuoksi ravintoalustojen valmistus esitetään vasta tämän alustan sovellutusten yhteydessä.

Murashige-Skoog -alustassa on esim. rauta annettu FeSO_4 ja Na_2EDTA yhdisteenä, mutta rauta on nykyisin annettu helpoimmin annettavassa muodossa $\text{Na}_2\text{-Fe-EDTA}$ -yhdisteenä. Kasvuhormoneja on annettu muitakin kuin kinetiiniä ja indolyylitikkahappoa (IAA).

Murashige-Skoog -alustan väkevyys on hyvin suuri, suurempi kuin minkään muun kallas- tai kasvusolukkojen kasvatukseen käytetyn alustan. Sen vuoksi joillekin kasvusolukoille, ainakin niistä kehittyneiden kasvien juurten muodostumisen edistämiseksi on kasvun myöhäisemmissä vaiheissa käytetty $3/4$ tai $1/2$ väkevyyttä alkuperäisestä Murashige-Skoog -alustasta.

Taulukko 1. Murashige-Skoog - ravintoalusta alkuperäisessä koostumuksessaan (Murashige & Skoog 1962)

Pääravinteet:	mg/l	Hivenaineet:	mg/l
NH_4NO_3	1650	H_3BO_3	6,2
KNO_3	1900	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	8,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370	KJ	0,83
KH_2PO_4	170	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
Na_2EDTA	37,3	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
Orgaaniset aineet:	g/l		mg/l
sakkaroosi	30	nikotiinihappo	0,5
Edamin	1	pyridoksiini	0,5
agar	10	tiamiini	0,5
		myo-inositoli (meso-inositoli)	100
		glysiini (Glykokoll)	2,0
		IAA	1-30,0
		kinetiini	0,04-10,0

pH 5,7 - 5,8

b. Murashige-Skoog - alustan perunalle käytetty muunnos ja sen valmistus

Kasvitautilien tutkimuslaitoksella aloitettiin 1970-luvun alussa viruksettomien perunoiden tuotto lämpökäsiteltyjen perunoiden kasvuseläkkeitä kasvattamalla. Lämpökäsittely on ollut 2-3 viikkoa 37°C lämpötilassa jatkuvassa valossa.

Ravintoalusta on valmistettu seuraavasti:

Ensiksi tehdään perusliuokset taulukon 2 kohtien I-VII mukaan. Taulukko on laskettu valmiiksi 1 l perusliuoksiin tarvittavat määrät. Jos ravintoliuoksia tehdään usein ja suuria määriä, kannattaa tehdä esim. 5 l annokset perusliuoksista. Kasvuaineista ja vitamiineista ei kuitenkaan kannata tehdä kovin suuria määriä perusliuoksia, koska ne pilaantuvat helposti ja niitä tarvitaan vain pieniä määriä kerrallaan.

Mitataan perusliuokseen tarvittava määrä tislattua vettä, esim. 1 l. Tästä vesimäärästä otetaan aina kutakin perusliuoksen ainetta varten dekantterilasiin pieni vesimäärä, johon ko. aine liuotetaan. Täysin liunneet aineet yhdistetään ja vesimäärä täydennetään 1 litraksi. Tämän jälkeen perusliuos autoklavisoidaan pullossa, johon nestepinnan korkeus on merkitty. Jos liuoksesta on autoklavisoitaessa vähentynyt nestettä, lisätään puuttuva määrä autoklavisoitua tislattua vettä.

Perusliuos I tehtäessä otetaan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:ta varten runsaasti vettä, n. 200-250 ml, johon se liuotetaan. Loppu vedestä (750-800 ml) käytetään muiden perusliuos I aineiden liuottamiseen. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -liuos lisätään viimeiseksi koko ajan sekoittaen. Muutkin aineet yhdistetään vasta, kun ne ovat täysin liunneet veteen. Perusliuos I säilyy kauan, jos se on suojattu valolta. Samalla tavoin valmistetaan perusliuokset III ja IV. Perusliuosta II (rauta) on ravistettava ennen kuin sitä otetaan ravintoliuokseen. II rauta voidaan antaa myös rautasitraattina, perusliuos 450 mg/250 ml vettä, josta 1 ml riittää 1 litraan ravinnealustaa. Perusliuos IV, vitamiinit, ei säily montakaan viikkoa, joten sitä ei kannata tehdä suurta määrää kerralla. Se voidaan kuitenkin pakastaa sopivina annoksina muoviputkissa, jolloin se säilyy hyvin.

IAA, kinetiini, gibberelliini, IBA ja NAA liuotetaan autoklavisoimalla 1 atm paineessa 15 minuuttia.

Taulukko 2. Murashige-Skoog (1962) alustan perunan meristeemien kasvatukseen sopiva muunnos.

Perusliuos			1 litraan ra- vintoalustaa
I Pääravinteet	NH_4NO_3	16,5 g/l	} 100 ml
	KNO_3	19,0	
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,4	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7	
	KH_2PO_4	1,7	
II Rauta	EDTA - Fe - Na_2 (Na_2 -Fe-EDTA)	390 mg/l	100 ml
III Hivenaineet	H_3BO_3	620 mg/l	} 10 ml
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230,0	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	860,0	
	KJ (Kaliumjodidi)	83,0	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,0	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5	
IV Vitamiinit	Glysiini (glycogoll)	200 mg/l	} 10 ml
	Nikotiinihappo	50 "	
	Pyridoksiinihappo (B6)	50 "	
	Tiamiini (B1)	10 "	
V IAA (indolylyietikkahappo)		20 mg/500 ml	50 ml
VI Kinetiini (6-furfuryaminopuriini)		10 mg/500 ml	50 ml
VII Gibberelliinihappo (GA_3)		10 mg/500 ml	50 ml

Seuraavat aineet punnitaan joka kerta erikseen:

Myo-inositoli (meso-inositoli)	100 mg
Kaseiini (casein hydroxylate)	3 g
Adeniinisulfaatti	80 mg
Sakkarooosi	20 g
(Agar, haluttaessa)	2-5 g/l)

Jos IAA:n asemasta käytetään NAA (naftyylietikkahappoa) liuotetaan NAA ensin muutamaa pisaraan 95 % alkoholia, jonka jälkeen lisätään tarvittava vesimäärä ja seos autoklavisoidaan, kuten IAA ja muut (myös IAA voidaan liuottaa alkoholin avulla).

IAA- ja NAA-liuokset eivät säily kauan ja etenkin IAA-liuos tuhoutuu nopeasti valossa. Säilytetään sen vuoksi tummassa tai alumiinipaperiin käärityssä pullossa ja pidetään pimeässä.

IAA:n, NAA:n ja kinetiinin sekä muiden kasvuhormonien ja sytokiniinien määrät vaihtelevat eri ravintoalustoissa ja sopivista määristä mainitaan kunkin kasvilajin ravintoalustan kohdalla.

Lopuksi punnitaan orgaaniset aineet, sokeri, myo-inositoli, kaseiini ja agar joka kerta erikseen ja lisätään veteen liuotettuina. Aineet liuotetaan kiehauttamalla pienessä vesimäärässä.

Kaseiini sakkautuu, jos sen vesiliuos sekoitetaan kylmiin liuoksiin. Siksi kaseiiniliuos lisätään viimeksi huoneenlämpöiseen ravintoaineliuokseen.

Ravintoalustan pH mitataan ja korjataan pH 5,7-5,8:an joko HCl tai NaOH:lla. Tavallisesti on emäslisäys, siis NaOH tarpeen. Tähän tarkoitukseen sopiva 0,5 M NaOH-liuos saadaan sekoittamalla 20 g NaOH/l vettä.

Tämän jälkeen ravintoalusta autoklavisoidaan. Määrä tarkistetaan autoklavisoinnin jälkeen ja kaadetaan kuumana desinfiointiuhiin (3 t, +140°C lämpökaapissa) kasvatusastioihin. Ravintoalusta voidaan myös kaataa ensin kasvatusastioihin ja sitten autoklavisoida 1 atm 20 min.

Joskus on syytä tarkistaa pH myös autoklavisoinnin jälkeen.

c. Mansikalle käytetyt alustat

Mansikan kasvusolukot otetaan parhaiten rönkyjen päistä, joko lämpökäsitteltyjen tai käsittelemättömien kasvien rönkyistä. Sopiva lämpökäsittely mansikoille on 3-4 viikkoa +35-37°C lämpötilassa.

Mansikan kasvusolukoiden alkukasvatukseen sopii hyvin myös herukoiden alusta H (s. 29).

Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on käytetty seuraavaa alustaa:

Mansikan perusalusta M 1

Perunalle käytetyn MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	1 l alustaa
I pääravinteet	100 ml
II rauta	100 ml
III hivenaineet	10 ml
IV vitamiinit	10 ml
myo-inositoli (meso-inositoli)	100 mg
IBA (indolyylivoihappo) (perusliuoksesta 50 mg/500 ml)	10 ml
glukoosi	40 g

Alusta käytetään nestemäisenä ja kasvusolukko sijoitetaan alustaan tai-
vutetulle ja sillä kyllästetylle imupaperille. Alustaan voidaan lisätä
haluttaessa 100 ml kookosmaitouutetta alkukasvun edistämiseksi.
Kookosmaitouutteen valmistusohje s. 32.

Mansikan kasvusolukot kasvattavat myös juuret tällä alustalla, mutta
kasvusolukot on siirrettävä 4 viikon väliajoin uudelle alustalle, kun-
nes ovat riittävän suuria siirrettäväksi multaan kasvamaan.

Mansikan monimeristeemialusta M 2

Kasvusolukot siirretään aluksi kasvamaan mansikan perusalustalle M 1.
Kun ne ovat kasvaneet jonkun verran (2-4 viikkoa), ne siirretään jakau-
tumisalustalle M 2, jossa ne tuottavat versoja.

Alusta M 2:n koostumus:

Perunalle käytetyn MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	1 litraan ra- vintcalustaa
I pääravinteet	100 ml
II rauta	100 ml
III hivenaineet	10 ml
IV vitamiinit	10 ml
sekä seuraavat aineet	
IBA (indolyylivoihappo) (perusliuos 50 mg/500 ml)	10 ml
BAP (bentsylaminopuriini) (50 mg/500 ml)	10 ml
gibberelliinihappo (20 mg/500 ml)	25 ml
glukoosi	40 g
agar	5-6 g

M 2 alustalla mansikat muodostavat runsaasti versoja niin että alkupe-
räisen pienen verson ympärille kehittyy pensasmainen versoryhmä. Nämä
versoryhmät voidaan jakaa veitsellä steriilisti ja siirtää edelleen ja-
kautumaan M2 -alustalle, jolla mansikat eivät muodosta juuria.

Silloin kun halutaan juurellisia kasveja, on toisistaan irroitettut ver-
sot siirrettävä kasvamaan M1 -alustalle, jossa niistä kehittyvät valmiit
kasvit, jotka voidaan siirtää multaan kasvamaan.

Mansikan lisäys meristeemeistä voidaan siten toteuttaa näitä kahta M1
ja M2 -alustaa käyttämällä.

IBA ja BAP -liuosten väkyyksiä on syytä vaihdella eri lajikkeille.

d. Herukoille ja karviaiselle käytetyt alustat

Herukoiden haitallisin virus, suonenkatovirus saadaan poistetuksi heru-
koista antamalla kasveille 3 viikkoa kestävä lämpökäsittely $+35^{\circ}\text{C}$ läm-
pötilassa. Tällöin myös muut herukan ja karviaisen virukset heikentyvät
niin paljon, että suurin osa kasvusolukoista on viruksettomia. Kasvuso-
lukuja otetaan sekä pää- että sivuversojen kärjistä.

Herukoille on käytetty Jones & Vine'n (1968) karviaiselle käyttämiä
muunnoksia Murashige-Skoog -alustasta hieman muutettuina.

Kasvusolukot siirretään ensin kasvamaan alusta H 1:lle ja kun kasvuso-
lukko on kasvanut pieneksi versoksi, se siirretään alusta H 2:lle.

Alusta H 1

Perunalle käytetyn MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	yhteen litraan ravintoalustaa
I pääravinteet	100 ml
II rauta	100 ml
III hivenaineet	10 ml
IV vitamiinit	10 ml

sekä seuraavat aineet:

meso-inositoli	100 mg
glukoosi	20 g
NAA (perusliuos 25 mg/500 ml)	20 ml
kookosmaitouutetta	100 ml

Alusta H 2

Perunalle käytetyn MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	yhteen litraan ravintoalustaa
I pääravinteet	100 ml
II rauta	100 ml
III hivenaineet	10 ml
IV vitamiinit	10 ml

sekä seuraavat aineet:

IBA (indolyylivoihappo) (perusliuos 50 mg/500 ml)	10 ml
BAP (bentsylaminopuriini) (-"- 50 mg/500 ml)	2 ml
gibberelliinihappo (-"- 20 mg/500 ml)	25 ml
glukoosi	40 g

Alusta H2 :lla kasvusolukoita siirretään noin 4 viikon väliajoin uudelle H2 alustalle, kunnes kasvit ovat kehittyneet multaan siirrettäväksi sopivaan kokoon.

e. Vadelmalle käytetyt alustat

Vadelmille annetaan ensiksi 2-4 viikkoa kestävä lämpökäsittely +37°C lämpötilassa, jonka jälkeen kasvusolukot irroitetaan pää- ja sivuversoista.

Kavusolukot siirretään aluksi kasvamaan herukka-alustalle H1, jolta ne voidaan siirtää joko herukka-alustalle H2 tai vadelma-alustalle V, jonka väkevyys on alhaisempi kuin Murashige-Skoog-alustan.

Alusta V

Perunalle käytetyn MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	Yhteen litraan ravintoalustaa
I pääravinteet	75 ml
II rauta	75 ml
III hivenaineet	7,5 ml
IV vitamiinit	7,5 ml

sekä seuraavat aineet:

IBA (perusliuos 50 mg/500 ml)	10 ml
BAP	2 ml
gibberelliinihappo (perusliuos 20 mg/500 ml)	5 ml
glukoosi	30 g
meso-inositoli	3 g
(agar	3 g)

Vadelmilla on juurten muodostuminen heikkoa, ja jos niitä ei muodostu ollenkaan, voidaan versot juurruttaa sumutuksessa turve-hiekkaseokseen ruukuissa tai versot ympätään terveisiin vadelmiin esim. siementaimiin.

f. Omenapuulle käytetyt alustat

Tämä työ on vasta alussa ja täysin sopivaa ravintoalustaa omenapuun kasvusolukoille ei ole vielä kehitelty. Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on kokeiltu Jonesin (1967 ja 1973) sekä Jones & Hatfieldin (1976) käyttämää ravintoalustaa. Omenapuulle on annettu 6-8 viikon lämpökäsittely +35 - 36°C lämpötilassa.

Omenapuun kasvusolukkojen ravintoalusta O1:

Perunalle käytetyn MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	yhteen litraan ravintoalustaa
I pääravinteet	100 ml
II rauta	100 ml
III hivenaineet	10 ml
IV vitamiinit	10 ml

ja lisäksi seuraavat aineet:

meso-inositoli	100 mg
sakkaroosi	30 g
kaseiini	1 g
adeniinisulfaatti	80 mg
ploroglusiini (phloroglucin)	162 mg

Omenapuun kasvusolukot kasvoivat hyvin tällä alustalla, mutta eivät muodostaneet useimmiten ollenkaan juuria.

Tällainen juureton, mutta muutoin hyvin kehittynyt pieni verso voidaan ympätä omenan siemenkasviin, ja näin siitä saadaan kasvatetuksi ydin-kasvi. Omenapuun siemenkasvit ovat viruksettomia, jos niitä ei päästetä kasvun aikana saastumaan.

g. Kookosmaitouute

Kookosmaitouute valmistetaan seuraavasti:

Kookosmaito otetaan vielä raaoista, vihreistä kookospähkinöistä ja siivilöidään tiheän kankaan läpi. Sentrifugoimalla maidosta voidaan haluttaessa poistaa epäpuhtauksia. Kookosmaito säilytetään esim. 50 tai 100 ml annoksiin pullotettuna, syväjäädettynä.

Jos saatavilla on vain täysin kypsiä kookospähkinöitä, valmistetaan uute niistä seuraavasti: valkoinen hedelmäliha irroitetaan pähkinöistä ja jauhetaan hienoksi. Massaan lisätään vettä 2 ml yhtä grammaa kohti. Seos puristetaan siiviläkankaan lävitse ja jätetään seisomaan pariksi tunniksi, jotta rasva erottuisi. Rasvakerros kuoritaan nesteen päältä pois ja neste sentrifugoidaan viimeistenkin rasvahiukkasten poistamiseksi. Sentrifugoinnin jälkeen sakka heitetään pois ja uuteneeste säilytetään syväjäädettynä.

Kirjallisuutta:

- ADAMS, A.N. 1972. An improved medium for strawberry meristem culture. J. hort. Sci. 47, 263-264.
- HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. 1975. Plant propagation principles and practices. s. 509-532. London 662 s.
- JONES, O.P. & VINE, S.J. 1968. The culture of gooseberry shoot tips for eliminating virus. J. hort. Sci. 43, 289-292.
- & HATFIELD, S.G.S. 1976. Root initiation in apple shoots cultured in vitro with auxins and phenolic compounds. J. hort. Sci. 51, 495-499
- KASSANIS, B. 1957. The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. Ann. appl. Biol. 45, 100-127.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- PALUDAN, N. 1971. Etablering of virusfrie meristemkulturer af havebrugsplanter. Tidsskr. Planteavl. 75, 387-410.
- PUTZ, C. 1971. Obtention de framboisiers (var. Bois blanche) sans virus par la technique des cultures de méristèmes. Ann. Phytopath. 3, 493-501.

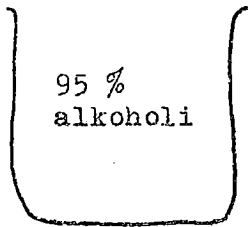
3 Kasvusolukon irroitus kasvista ja siirto ravintoalustalle

Aluksi tarkastetaan, että kaikki työvälineet ja desinfiomisaineet ovat valmiina steriilissä työtilassa. Sen jälkeen lämpökäsitellyistä kasveista otetaan pienet 2-3 cm mittaiset versojen päät siisteihin astioihin ja viedään desinfioitaviksi. Versoista irroitetaan lehdet pois ja ne kastetaan nopeasti 90-95 % alkoholiin ja upotetaan sen jälkeen 10-20 minuutiksi 5 % kalsiumhypokloriittiin. Sen jälkeen ne huuhdotaan autoklavisoitavalla vedellä kolmeen kertaan. Tämän jälkeen leikataan aina uusia steriloituja veitsiä käyttämällä lehtiaiheita pois kunnes kasvusolukko paljastuu. Kasvuun lähdön varmentamiseksi irroitetaan kasvusolukko 2-4 lehtiaiheen kanssa joko suoraan tai vinosti poikkileikkaamalla. Kuva 4.

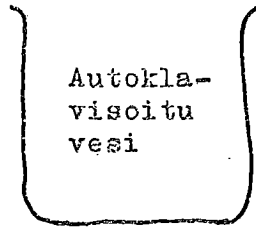
Irroitettu kasvusolukko siirretään veitsellä tai neulalla ravintoalustaan talvutetun imupaperin päälle.

KUVA 4. Kasvusolukon irroitus kasvista ja siirto kasvualustalle

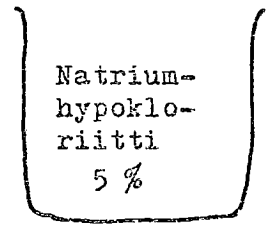
Irtileikattu verson latva desinfioidaan



Nopea upotus



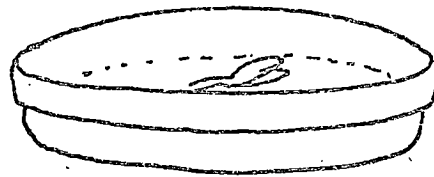
Huuhtelu



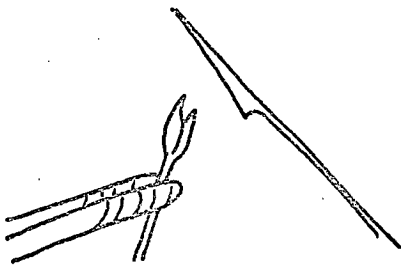
Upotus 5-15 min.



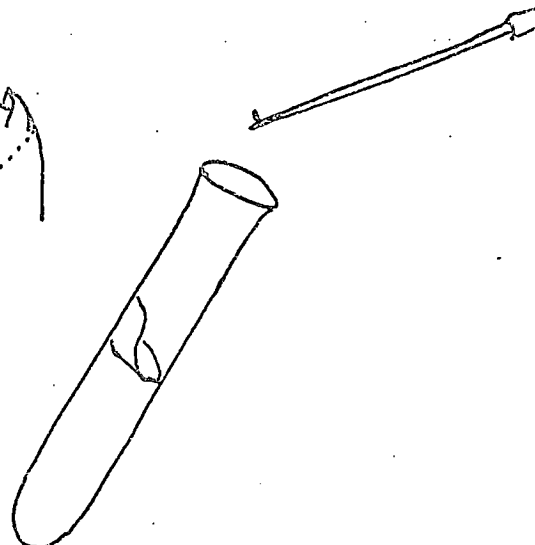
Huuhtelu



Kuivatus steriloidussa petri-
maljassa imupaperilla



Lehtien poisto
kasvusolukon
ympäristä



4 Kasvusolukkoviljelysten kasvuolosuhteet

Kasvusolukkojen kasvatukseen sopii siistipintainen, helposti puhdistettavissa oleva laboratorihuone, jossa ei ole liian paljon epäpuhtauksia tuovia ikkunoita ja ovia. Kasvatukset sijoitetaan hyllyille lamppujen alle.

Lämpö

Kasvusolukkoja kasvatetaan $+18-28^{\circ}\text{C}$ välisissä lämpötiloissa. Eri kasvilajien kasvusolukoilla on hieman erilaiset lämpötilavaatimukset, joskaan niitä kaikkia ei vielä tunneta.

Esimerkkeinä mainittakoon:

Mansikan ja perunan kasvusolukot ovat kasvaneet hyvin $+25^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa, herukan ja vadelman kasvusolukot ovat myös kasvaneet $+20-25^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa. Eräiden sipulikasvien kasvusolukot ovat kasvaneet parhaiten $+12-15^{\circ}\text{C}$ välisissä lämpötiloissa. Jos ei ole tietoa kasvusolukon lämpötilavaatimuksista on paras alkaa kasvatus $+20-22^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa.

Valo

Useimpien kasvien kasvusolukot kasvavat parhaiten 16 tunnin pituisessa päivässä. Valoisuuden sopiva määrä on 3000-6000 luksia. Flora Lux- ja Kirkas Valkea - lamppujen yhdistelmä on ollut sopiva kasvusolukoille.

5 Kasvusolukoista saatujen kasvien kasvatus

Kasvusolukosta kasvanutta pientä kasvia kasvatetaan eristetyssä hyönteistiiviivissä kasvihuoneessa kasville mahdollisimman suotuisissa oloissa. Talvilepoa tarvitseville kasveille järjestetään 3-4 kuukauden ajaksi viileänä, 0 - 6°C, pysyvä kasvihuoneen osa.

Koska eräät virukset saattavat lämpökäsittelyistä huolimatta pysyä kasveissa, jopa kasvusolukoissakin, on kasvusolukoista kasvatettujen kasvien terveys varmennettava testauksin. Virustestauksia tehdään monin eri menetelmin eli serologisin, lehti- ja testikasvitestauksin, elektronimikroskoopin avulla sekä virusten kasveihin aiheuttamien muutoksien toteamisen perusteella. Terveystarkastuksia ei tule tehdä yksinomaan nuorista kasveista, joissa virusväkevyyks voi olla vielä niin vähäinen, ettei se tule esille testauksissa. Vasta 3-6 kk:n ikäisiä kasveja, tietenkin kasvilajista riippuen, voidaan testata. Testaukset on paras uusia 2-3 kertaa siten, että testit tehdään eri vuodenaikoina.

Eräiden virustautien toteamiseksi ei ole täysin luotettavia menetelmiä, mutta niiden oireet isäntäkasvissa voivat olla riittävän selvät virustaudin toteamiseksi. Tämänkin vuoksi kasvusolukoista kasvatettuja kasveja on pidettävä niille sopivissa oloissa ja tarkkailun alaisena 1-2 vuoden ajan, ennen kuin ne otetaan lisättäviksi.

6 Virustestaukset

a. Peruna

Monet perunan virukset voidaan todeta serologisin menetelmin ja eräät taas testikasvien avulla. Kasvitautilien tutkimuslaitoksella testataan kasvusolukoista saadut kasvit seuraavilla tavoilla:

Serologiset menetelmät

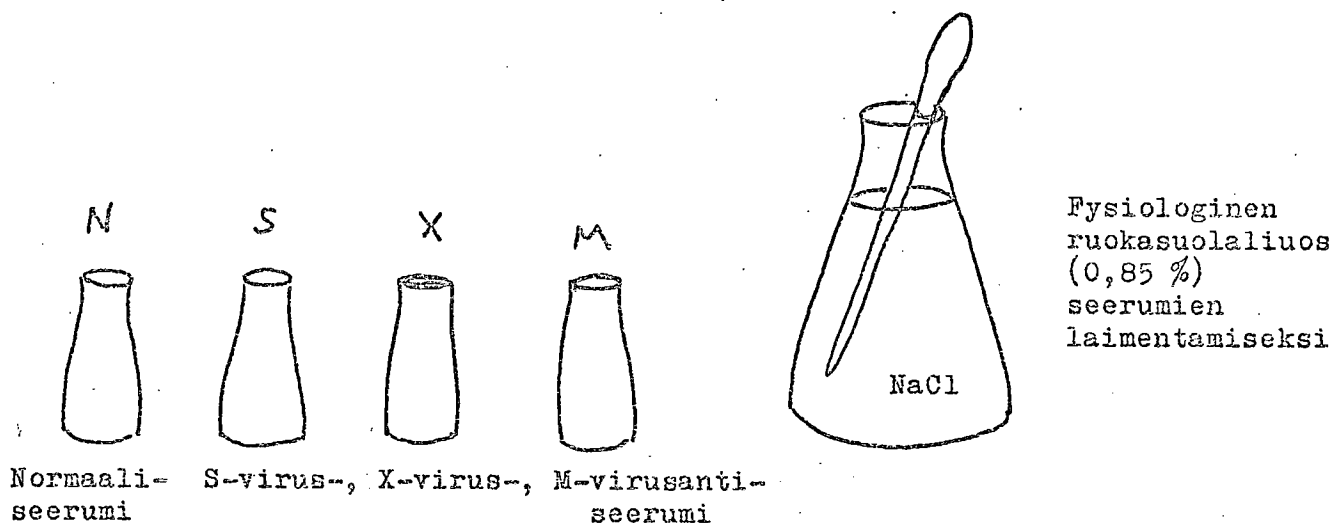
X-, S- ja M-virusten läsnäolo tarkistetaan van Slogterenin (1955) kehittämän ns. mikroagglutinaatiotestiä käyttäen. Siinä menetellään seuraavasti:

Petrimaljojen pohjiin tehdään ohut Formvar-kalvo, joka estää mehu- ja seerumitippojen leviämisen. Formvar liuotetaan kloroformiin, niin että saadaan 1 % liuos (10 g/l). Seosta kaadetaan vetokaapissa petrimaljan pohjalle niin että siihen muodostuu ohut kalvo. Testattavien perunoiden lehdistä puristettu kasvimehu sekoitetaan petrimaljan pohjalla laitetuihin seerumitippoihin. Petrimaljat suljetaan kansilla. Jos testattavassa perunassa on virusta, muodostuu tippaan sakka, joka voi näkyä välittömästi. Testaukset on kuitenkin parasta tarkastaa 1/2 - 3 tunnin kuluttua. Tipat voidaan peittää parafiiniöljyllä, jolloin ne jääkaapissa säilytettynä voidaan tarkastaa vielä 1-2 vrk kuluttua. Serologisella testillä saadaan em. virusten osalta yksinkertaisin menetelmin ja nopeasti varsin luotettavat tulokset (Kuva 5).

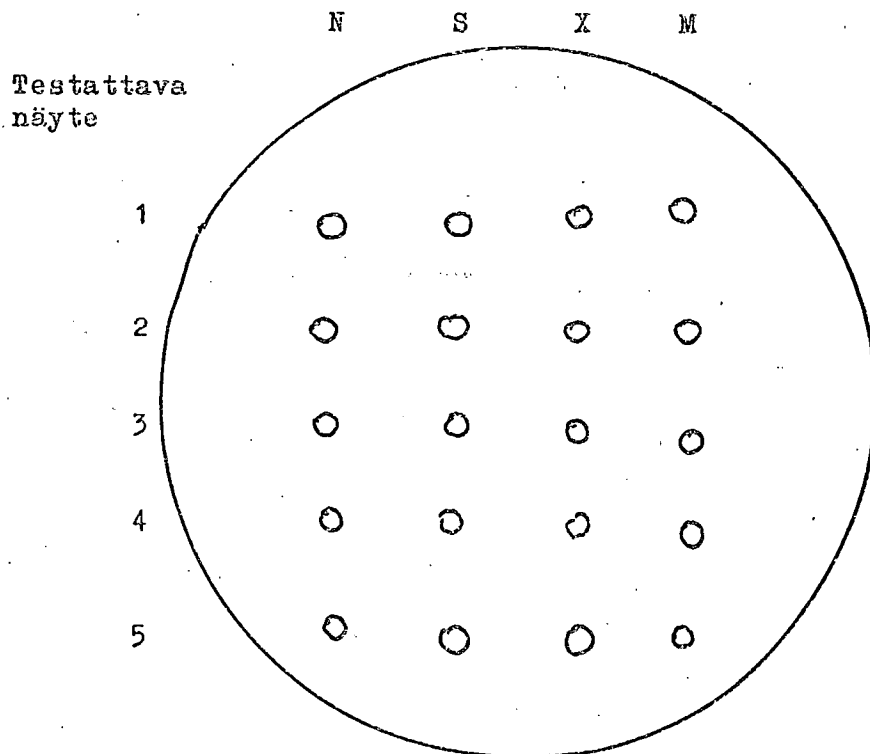
A- ja Y-virusten toteaminen seerumitestillä on vaikeampaa. Aivan viime aikoina on A-virukselle kehitetty käyttökelpoinen antiseerumi ja Y-viruksenkin seerumitestauksissa on saatu lupaavia tuloksia ns. Elisa-testillä. Näiden virusten testaukseen onkin käytetty Solanum demissumin ja Akvilan risteytyksenä saatua ns. A-6 perunaa. A-6 perunasta on irroitettu nuorehkoja täysikokoisia lehtiä, jotka sijoitetaan kostealle alustalle (esim. 8-10 kertainen suodatinpaperi) muovilaatikkoon. Irroitettuun carborundum-hiomapulverilla pölytettyyn lehteen tehdään mehu-siirto sivelemällä lehteen testattavan perunan lehdistä puristettua mehua. Inokuloidut lehdet sisältävä laatikko pidetään n. 20°C:ssa ja 2000-3000 luksin jatkuvassa valossa viikon, jonka kuluessa virus aiheuttaa A-6 perunan lehtiin tummia laikkuja (Kuva 6). A-6 perunan tilalla on koemielessä käytetty S. chacoens-perunaa.

Mainittakoon, että kasvusolukkokasvatusten kautta saadaan myös bakteerien aiheuttamat taudit rengasmätä ja tyvimätä poistetuiksi perunoista.

KUVA 5. Virustestaus mikropresipitaatiomenetelmää käyttäen



Testattavista kasveista puserretut mehutipat, joihin seerumitipat sekoitetaan

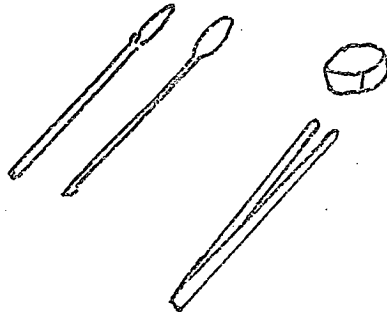


Petrimalja, jonka pohjalla olevalla Formvar-kalvolla seerumi- ja kasvimehutipat säilyttävät muotonsa

KUVA 6. Perunan Y-viruksen testaus A-6 perunan lehdissä



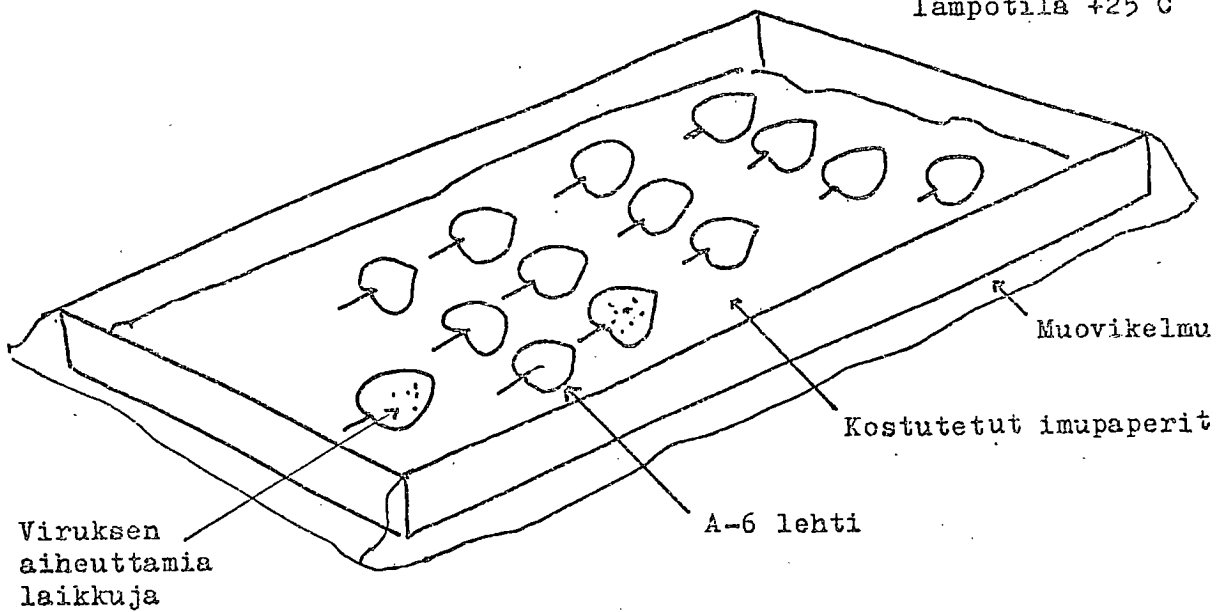
Hioma jauhe



Inokulointi pumpulipäisillä
tikuilla

tai pienillä vaahtomuovin
palasilla ja pinseteillä

Jatkuva valo
lämpötila +25°C



Virusen
aiheuttamia
laikkuja

A-6 lehti

Muovikelmu

Kostutetut imupaperit

b. Mansikka

Useimmat mansikan virukset eivät siirry mehussa ja siten niitä ei voida testata serologisesti. Mansikan virukset testataan viruksille herkkiin *Fragaria vesca*- ja *F. virginiana*-klooneihin.

Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on käytetty testikasveina seuraavia klooneja, joiden nimilyhenteet ovat kansainvälisiä:

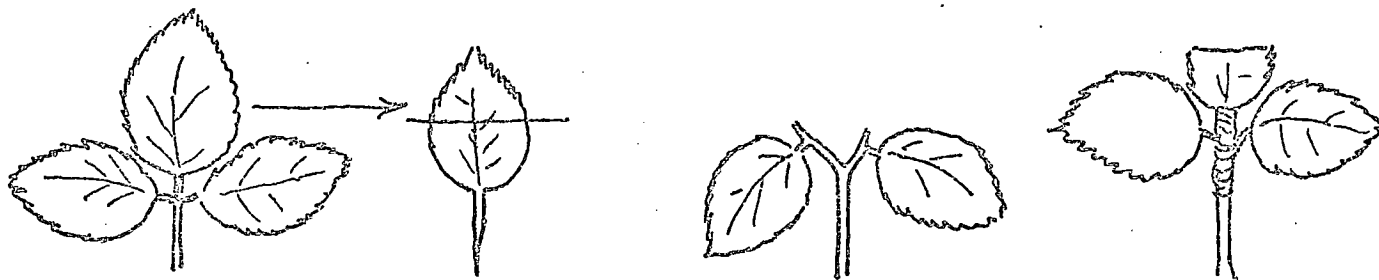
- EMK Englannista peräisin oleva *F. vesca*-klooni, joka on altis monille viruksille, esim. läikkä-, kurttu-, suoninauha- ja latentti-C viruksille.
- Fv. 72 on ukrainalainen *F. vesca*-kanta. Se on erittäin herkkä kurttu-virukselle.
- U.C.1 on klooni eräästä *F. vesca* alpiinisestä kannasta. Se osoittaa kurttu- ja keltalaitavirusten oireet erittäin hyvin ja heikommien läikkä- ja suoninauhavirusten oireet.
- U.C.2 On EMK:lle läheinen *F. vesca*-kanta, joka on arka latentti C-virukselle.
- U.C.10 on *F. virginiana*-klooni, joka on herkkä suoninauha-, keltalaita-, kurttu-, latentti-C ja erälle maalevintäisille viruksille.

Testaus on tehty lehtiympäyksenä. Testattavan kasvin lehden keskilehdykkä irroitetaan ja lehdykän ruoti leikataan kiilamaiseksi. Testikasvin keskilehdykkä leikataan pois ja lehtiruotia halkaistaan niin, että kiilamaiseksi leikattu testattavan kasvin lehdykkä sopii halkaistuun lehtiruotiin. Lehdykkä kiinnitetään parafiinikalvolla tiiviisti paikalleen. Lehdykän lehtilavasta leikataan puolet pois haihdunnan vähentämiseksi (Kuva 7). Jokaiseen testikasviin tehdään 2-3 lehdykkäympäystä ja kaikki muut lehdet paitsi ympätyt poistetaan. Lehtien poisto edistää oireiden ilmaantumista. Kun uudet lehdet kasvavat esille, on niissä virusoireet pian nähtävissä. Koko testi vie noin 6-8 viikkoa aikaa.

Mansikoissa on maalevintäisiä viruksia, joiden oireet ilmenevät joissakin viljellyissä mansikkalajikkeissa sekä useimmissa testikasvimansikoissa.

Maalevintäisten virusten läsnäolo voidaan todeta varmimmin tekemällä mehusiirto. Testattavan mansikan lehdet jauhetaan hienoksi huumareissa 0,2 molaarisen fosfaattipuskurin, pH 7 kanssa ja mehulla hierotaan testikasvien lehtiä, joille on haavojen aikaansaamiseksi ripoteltu hioma-

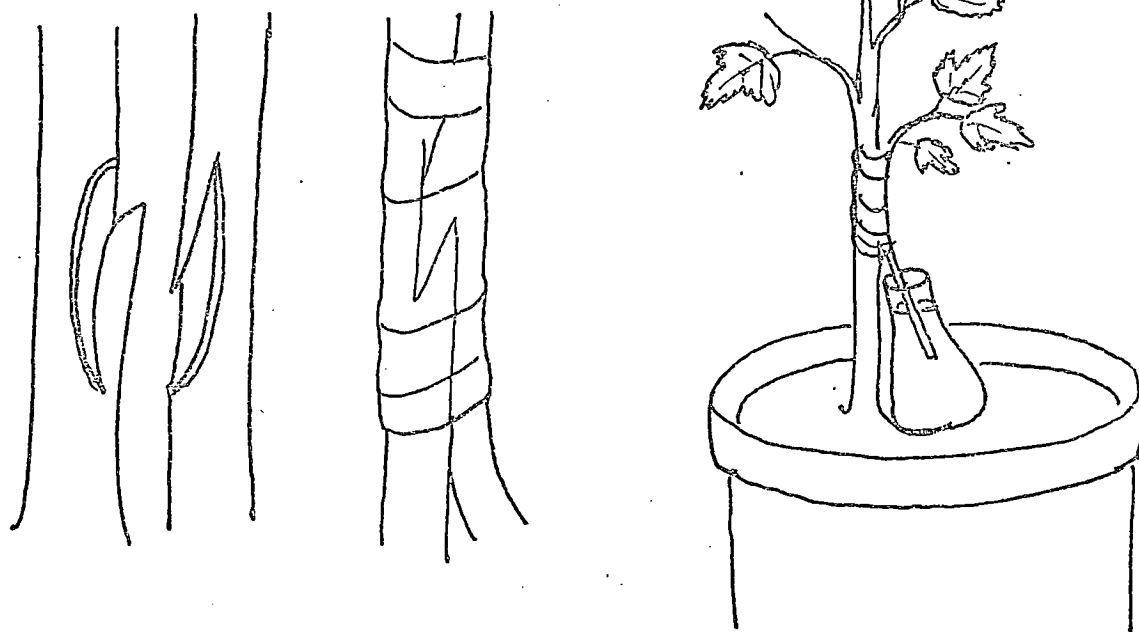
KUVA 7. Mansikan lehdykkäympäys



Testattavan kasvin lehti

Testikasvi

KUVA 8. Herukka- ja vadelmaympäys



Vettä

jauhetta (hienousaste 400-600). Sopivia testikasveja ovat *Chenopodium amaranthicolor*, *C. quinoa*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* ja *Petunia hybrida*.

0,2 mol. fosfaattipuskuri pH 7 valmistetaan yhdistämällä tietyt ml-määrät seuraavista liuoksista. Esim. seuraavasti:

KH_2PO_4	68 g/l	8,28 ml)	
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	89 g/l	10,60 ml)	+ 81,12 ml tislattua vettä

c. Herukat ja karviainen

Herukoiden ja karviaisen virustaudit todetaan eräissä viruksille herkissä herukkalajikkeissa ja karviaisen siementaimissa.

Mustaherukkalajike Baldwin on herkkä suonenkatovirukselle. Mustaherukkalajike Amos Black ei ole altis sille, mutta useimmille muille viruksille se on sopiva testikasvi. Jonkheer van Tets-punaherukkalajikkeen siemenkasvit osoittavat selvästi suonikloroosiviruksen. Näiden kolmen testikasvilajikkeen lisäksi Kasvitautien tutkimuslaitoksella on käytetty testikasvina Kaunisrannan punainen-nimisen karviaislajikkeen siemenkasveja, jotka ovat herkkiä suonikloroosivirukselle.

Mehu- ja maalevintäisiä viruksia esiintyy herukoissa. Ne voidaan todeta samoissa testikasveissa kuin mansikan maalevintäiset virukset. Fosfaattipuskurin asemasta on parasta lisätä lehdistä mehua puserrettaessa niihin 2 % nikotiinia. Testi onnistuu vain käyttämällä mehuksi vasta puhjenneita lehtiä ja varjostamalla testikasveja, jotka on myös pidettävä viileässä.

Virustestaus Baldwin, Amos Black ja siemenkasvitestauksiin suoritetaan ympäremällä testattavan herukan tai karviaisen oksa 15-25 cm mittaiseen testikasviin. Ympäryys onnistuu hyvin oheisen kuvan 8 mukaisesti tehtynä. Ympätyn oksan pää pannaan pieneen vesiputkeen haihdunnan vähentämiseksi.

Herukoiden ja karviaisen testaus vie pitkän ajan, sillä oireet ilmaantuvat useimmiten vasta seuraavana vuonna. Testikasvit on siksi säilytettävä talven yli viileässä kasvihuoneessa.

d. Vadelma ja mesivadelma

Vadelmassa ja todennäköisesti myös mesivadelmassa esiintyy hyvin monenlaisia virustauteja, joiden testaamiseen voidaan käyttää hyvinkin erilaisia testikasveja. Pelkän virustaudin osoittamiseen ilman viruslajin määrittystä riittävät muutamat testikasvilajit. Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on käytetty seuraavia testikasveja vadelman ja mesivadelman virustestauksiin: *Rubus idaeus*: lajikkeet Lloyd George, Norfolk Giant, Preussen, *R. occidentalis*, lisäksi myös *R. henryi*. Nämä testikasvit ovat herkkiä yleisimmille vadelman viruksille. Edellä mainittujen lisäksi voidaan käyttää *R. idaeus*, Malling Landmark ja Baumforth'in B siemenkasvia.

Virustestaus näihin testikasveihin tehdään ympäremällä testattavan kasvin oksa testikasviin samalla tavoin kuin herukallakin.

Vadelmassa esiintyy samoja maalevintäisiä viruksia kuin mansikassa ja herukoissa ja testikasvit ovat siten samat. Puskurina on paras käyttää 2 % nikotiinia tai pH:ta kohottavia puskureita. Testikasvit on pidettävä yön yli pimeässä ennen inokulointia ja viilleähkössä, +16-22°C huoneessa sen jälkeen. Kesällä testikasvien pitäminen varjossa on suotavaa.

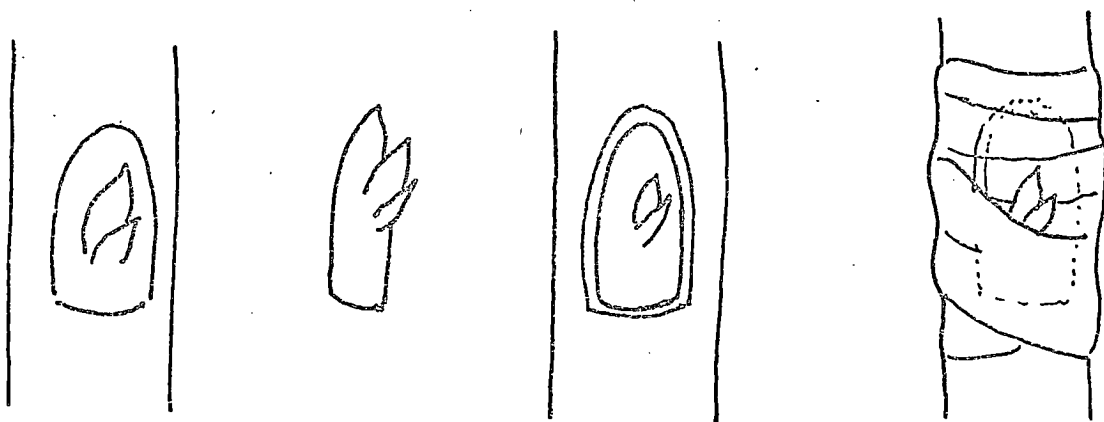
e. Omena

Omenapuissa esiintyy hyvin monia virustauteja, joiden esiintyminen todetaan testauksissa 5-6 *Malus*-lajia tai -lajiketta käyttäen. Kasvitautilien tutkimuslaitokselle on hankittu seuraavat yleisimmin käytetyt, monille viruksille alttiit virustestikasvit: *Malus pumila*: lajikkeet Cox Orange Pippin, Lord Lambourne ja Gravenstein, *M. platycarpa*, Venäläinen siemenkasvi (Russian seedling R 12740/7/A), Spy 227 (amerikkalainen perusrunko) sekä Virginia Crab (amerikk. perusrunko).

Edellä mainittuja puuvartisia testikasveja käytettäessä virustestaus tehdään seuraavasti:

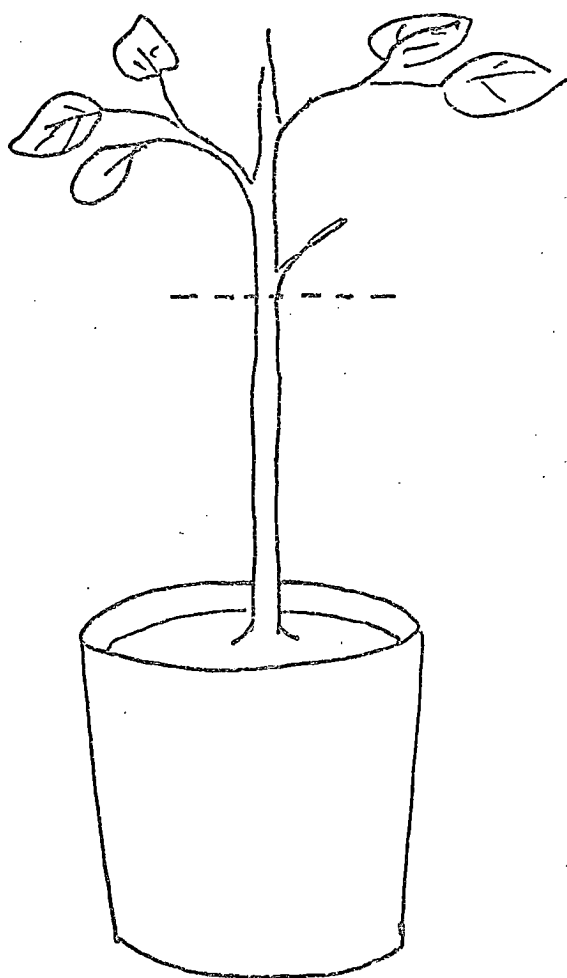
Pieniin 15-30 cm korkuisiin omenan siemenkasveihin (omenan virukset eivät siirry siemenissä) ympätään testattavasta kasvista otettu silmu varren alaosaan ja sen yläpuolelle testikasvin silmu, jonka yläpuolelta siemenkasvi leikataan poikki (Kuva 9). Silmuista kehittyvien versojen annetaan kasvaa jonkun aikaa, mutta sitten testattavasta silmusta kasvanut verso poistetaan. Testisilmusta kasvanut verso kasvaa sitten pieneksi puuksi, ja siihen tulevat virusoireet. Omenapuun testipuita joudutaan kasvattamaan ainakin kolme vuotta, erään virustaudin toteamiseksi osaa testikasveja jopa viisi vuotta.

KUVA 9. Omenan silmuympäys

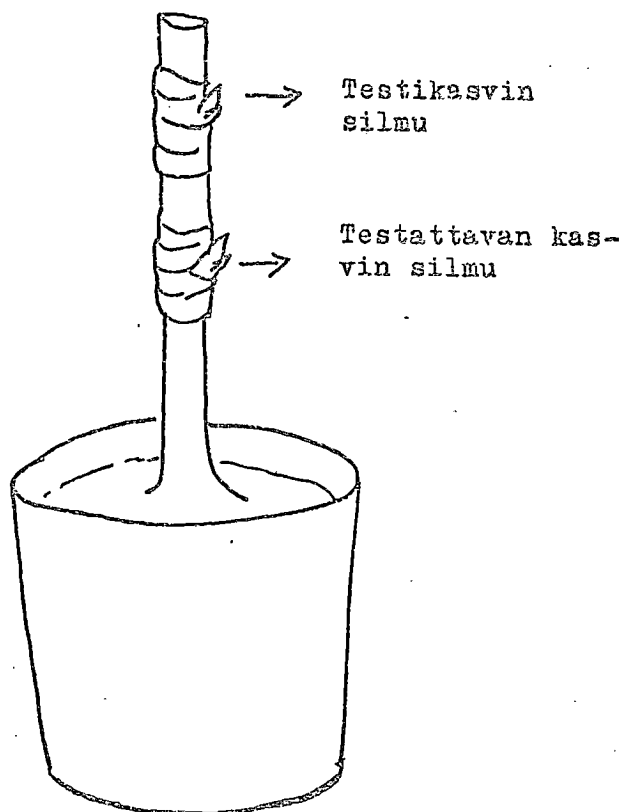


Silmupala leikataan hiukan pienemmäksi kuin kolo, johon se siirretään

Virustestauksissa käytetty kaksisilmuymppäys



Omenapuun siemen-
kasvi



Omenapuissa esiintyy myös mehulevintäisiä viruksia. Ne voidaan todeta tekemällä mehusiirto aivan nuorista lehdistä tai kukkien terälehdistä. Useita erilaisia puskureita voidaan käyttää. Mehu valmistetaan viileässä huoneessa, jossa myös inokulointi tehdään.

Sopivia testikasveja ovat *Chenopodium quinoa* ja *Cucumis sativus*.

Kirjallisuutta:

- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- FRAZIER, N.W. (toimittaja) 1970. *Virus diseases of small fruits and grapevines*. Berkeley 290 s.
- KADO, C.I. & AGRAWAL, H.O. (toim.) 1972. Principles and techniques in plant virology. *Plant virus serology* s. 466-472.
- KLINKOWSKI, M. 1967. *Pflanzliche Virologie*. Band I. Die Virusdiagnose s. 313-327.
- RYDÉN, K. 1977. Virus och mykoplasmasjukdomar hos svenska äppleträd. Växtskyddrap. Trädg. 1. Inst. växt. o. skogskydd. Lantbrukshögskolan, Uppsala, 45 s.

