

MAATALOUDEN TUTKIMUSKESKUS
KASVITAUTIEN TUTKIMUSLAITOS

Tiedote No 38

1983

YDINKASVIEN TUOTTAMINEN KASVISOLUKKO-
VILJELYN AVULLA

Katri Bremer

Tiedote No 38

1983

YDINKASVIEN TUOTTAMINEN KASVISOLUKKO-
VILJELYN AVULLA

Katri Bremer

YDINKASVIEN TUOTTAMINEN KASVISOLUKKOVILJELYN AVULLA

	Sivu
I Teoreettinen osa	1
1. Johdanto	1
2. Kasvisolukkojen käyttö tutkimuksissa	3
3. Kasvu- eli meristeemisolut kasvissa	5
4. Lämpökäsittely	9
5. Kasvisolukkojen ravinnevaatimukset	12
a. Perusravinteet	12
b. Vitamiinit	13
c. Hormonit	13
6. Mikrolisäys eli "kloonaus"	17
II Kasvisolukkoviljelyn suoritus käytännössä	22
1. Lämpökäsittely	22
2. Työpaikat ja välineet sekä niiden puhdistus	23
3. Kasvusolukon irroitus kasvista ja siirto ravintoalustalle	28
4. Ravintoalustojen valmistusohjeet	30
a. Murashige-Skoogin ravintoalusta (MS)	30
b. Murashige-Skoog - alustan perusliuokset ja alustan valmistus	33
c. Kookosmaitouute	34
d. Mansikalle käytetyt alustat	35
e. Herukoille ja karviaiselle käytetyt alustat	36
f. Vadelmalle käytetyt alustat	37
g. Omenapuulle käytetyt alustat	38
h. Krysanteemille ja neilikalle käytetyt alustat	39
i. Pelargonille käytetyt alustat	39
j. Begonille käytetyt alustat	40
k. Sipulille käytetyt alustat	40
5. Kalluskasvatukset ja niille sopivat alustat	43
a. Kallussolukkoviljelmän aloitus	43
b. Kallussolukolle sopivat alustat	43
6. Solukkoviljelysten kasvuolosuhteet	48
7. Solukoista saatujen kasvien kasvat	49

III	Tautitestaukset	50
	1. Yleistä	50
	2. Tautitestaukset kasvilajeittain	55
	a. Mansikka	55
	b. Herukat ja karviainen	57
	c. Vadelma ja mesivadelma	57
	d. Omena	58
	Liite 1. Puskuriliuosten valmistusohjeita	62

I Teoreettinen osa

1. Johdanto

Marjakasvien sadot olivat Suomessa 1960-luvulla sangen alhaisia. Syyksi tähän todettiin tautien ja tuholaisien esiintyminen marjaviljelyksillä. Lisäksi taimiaineistokin oli saastunutta ja taimien lajikeaitous vaihteli suuresti. Sama koskee myös monia koristekasveja. Marjakasvejahan lisätään kasvullisesti ja tällöin kasvintuhoojat pääsevät helposti leviämään sairaasta emokasvista otetun monistusaineiston mukana.

Marjakasveista erityisesti vadelma ja mustaherukka olivat virusten tartuttamia, mansikassa esiintyi ankeroisia ja punkkeja. Virustauteja viljelijä ei pysty torjumaan ja ankeroisten ja punkkien torjuntakin on vaikeata ja onnistuu vain kovilla aineilla.

Marjakasvien taimien laadun parantamiseksi ja sitä tietä myös satotason nostamiseksi Maatalouden tutkimuskeskuksessa aloitettiin kokeilu n.s. terve-taimitoiminnan aikaansaamiseksi. SITRAn myöntämällä varoilla Maatalouden tutkimuskeskuksen ja Maatilahallituksen muodostama TERTA toimikunta kehitti ja kokeili terveiden taimien tuotantomallia 1973-1975.

Kasvitautilien- ja tuhoeläintutkimuslaitoksilla kehitettiin menetelmät ydinkasvien tuottamiseksi, Puutarhan tutkimuslaitoksella kokeiltiin tehokkaita monistusmenetelmiä. Maatilahallituksen osana oli valikoida ja tarkastaa terveiden taimien tuottoon sopivat viljelijät, taimistot. Perunan terveiden ydinkasvien tuotto aloitettiin samanaikaisesti tai oikeastaan jo aiemminkin.

Tervetaimitoiminta vakinaistui lainsäädäntöteitse. Vuonna 1976 perustettiin Siemenperunakeskus Liminkaan ja saman vuoden lopulla Tervetaimiasema Laukaalle. Aluksi molemmat asemat saivat ydinkasvit Kasvitautilien tutkimuslaitokselta. Ydinkasveja on lisätty näillä asemilla ja virusjälkitarkastustestaukset on tehty niillä. Nykyisin Siemenperunakeskus tuottaa itse perunan ydinkasvit ja Kasvitautilien tutkimuslaitos tuottaa Tervetaimiaseman tarvitsemat ydinkasvit marja- ja koristekasveista sekä omenapuista. Tervetaimiasema luovuttaa kantavaliotaimia viljelijöille, jotka tuottavat tarkastettuja käyttötaimia marjanviljelijöille.

Virus-, viroidi-, mykoplasma- ja eräiden bakteeritautien torjunta kasveis-

ta on erittäin vaikeata, 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 käyttämällä.

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

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

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

Tämä moniste, jossa selostetaan ydinkasvien tuottamisessa käytettyjä menetelmiä, on uusittu ja laajennettu esitys v. 1978 valmistuneesta Kasvitautien tutkimuslaitoksen tiedotteesta No 31 (Katri Bremer ja Pirkko Korhonen: Kasvusolukkojen käyttö ydinkasvien tuotossa).

Vantaa 3.3.83

Katri Bremer

2. Kasvisolukkojen käyttö tutkimuksissa

Jo tämän vuosisadan alussa saksalainen tutkija Haberlandt yritti saada kasvisolukkoja kasvamaan koeputkessa kasvien ravinne- ja kasvuainetutkimusta varten. Koe ei kuitenkaan onnistunut. Vasta v. 1934 amerikkalainen White sai tomaatin juuren palan kasvamaan ja kehittymään juureksi ravintoalustalla. Samoihin aikoihin ranskalaisten Gautheret'in ja Nobecourtin onnistui saada porkkanan solukkopalanen tuottamaan kallusolukkoa. Tämän jälkeen kallusolukkojen kasvatus ja tutkimus pääsi vauhtiin.

Kallus- eli haavasolukkoahan muodostuu paremkyymisolusta, jotka kasvia vioitettaessa muuttuvat meristeemisolukon kaltaiseksi ja alkavat muodostaa erilaistumatonta haavasolukkoa. Haavasolukon tarkoituksena on suojata kasviin tullut haava.

Nyt haavasolukkoja voitiin kasvattaa "in vitro", irrallaan kasvista ja tutkia kasvisolun toimintoja hallittavissa olosuhteissa.

Solukkokasvatustutkimus edistyi ratkaisevasti v. 1962 jälkeen. Tällöin tutkijat Murashige ja Skoog kehittivät täysin synteettisen ravintoalustan tupakan kallusolukkoa varten. Tämä alusta osoittautui sopivaksi myös muiden kasvilajien erilaisten solukkojen kasvatukseen.

Viimeisten 20 vuoden aikana kasvisolukkotutkimus on laajentunut ja edistynyt. Lisäksi siitä saatuja tuloksia ja menetelmiä on voitu soveltaa käytäntöön monilla aloilla.

Paitsi erilaisia kasvinosia, esim. juuria, heteitä, emiä, alkioita, endospermejä on viljelty kallusolukkoja, meristeemi- eli kasvupistesolukkoja ja myös yksittäisiä, ketottomia soluja, protoplasteja.

Kasvin erilaisia osia, juuren, mukulan tai juurakon paloja, lehtiaiheita, varsisolukkoja ym. on käytetty kasvifysiologisissa tutkimuksissa. Niiden avulla on selvitetty ravinteiden kulkeutumista ja varastointia, kasvin osan kehitystä, solukon erilaistumista ja siihen vaikuttavia tekijöitä, erityisesti kasvuhormoneja. Kallusolukkoja on käytetty erittäin paljon kasvifysiologiin kokeisiin. Niiden avulla on tutkittu esim. säteilyn, torjunta-ainneiden, myrkkujen ja muiden aineiden vaikutusta solujen kasvuun ja kehitykseen.

Kasvinjalostus on hyötynyt paljon solukkotutkimuksista ja käyttää solukkokasvatuksia yhä enenevässä määrin hyödykseen. Seuraavassa joitakin esimerkk-

kejä:

Heteistä ravintoalustalla kasvanut solukko saadaan erilaistumaan haploidiseksi kasveiksi. Haploidiset kasvithan voidaan muuttaa diploidiseksi, esim. kolkisiinikäsittelyn avulla, ja siten lopulta on tuloksena diploidinen, homozygoottinen kasvi. Samalla tavoin voidaan tuottaa monoploideja kasveja. Triploideja kasveja, jotka usein ovat diploidisia parempia, saadaan siemenvalkuaisesta eli endospermistä kasvavasta solukosta.

Ristisiittoisilla kasveilla saadaan itsesiitos helpoimmin aikaan, jos heteet ja emit kasvatetaan ravintoalustalla ja saadut alkiot voidaan myös kasvattaa ravintoalustalla kasveiksi. Myös siemeniä voidaan saada koeputkessa kasvavasta solukosta.

Alkion kasvatus ravintoalustalla on onnistunut sellaisissakin tapauksissa, joissa eri lajeja risteytettäessä hedelmöitys on onnistunut, mutta alkion kehitys pysähtyy muutaman päivän kuluttua. Myös risteytyksien siemenien, jotka eivät idä, alkioita ravintoalustalla kasvattamalla on saatu näistä siemenistä kasveja. Siementen alkiot ovat kasvaneet myös ilman lepokautta.

Kasveista, esim. lehtilavan solukoista, on voitu entsyymien avulla irrottaa soluja. Nämä ketottomat solut, protoplastit, ovat kasvaneet ravintoalustalla ja erilaistuneet kasveiksi. Kahden eri kasvilajin protoplastit on saatu sulautumaan yhteen. Tällaisia somaattisia hybridejä on saatu aikaan Brassica-, Bromus-, Glycine-, Daucus-, Lilium-, Nicotiana-, Petunia- ja Vicia-sukujen kasveilla, vaikka tämä tutkimus on vielä alkuvaiheissaan.

Protoplasteilla on taipumus ottaa sisälleen ympäristöstään isojakoin molekyylejä, viruksia, bakteereita, DNA-molekyylejä ja kokonaisia tumiakin. Siten geneettistä insinööritaitoa on kasvien osalta päästy käyttämään protoplastien avulla hyväksi. Geenisiirtoja on tehty vasta viimeisten 10 vuoden aikana ja pääasiassa bakteereilla. Aivan viime aikoina on tullut pari julkaisua geenisiirroista kasveilla. Esim. haploidisen tomaatin kallussoluihin on siirretty lambafaagin geenejä.

Kasvijalostukselle on suuri hyöty siitä, että perintötekijöitä voidaan säilyttää syväjäädetyissä solukoissa. Solukkojen vaurioituminen estetään suojakemikaaleilla ja varovaisella jäädyttämisellä ja sulattamisella. Säilytyslämpötila on hyvin alhainen -120 - -160 °C. Solukkojen kylmäsäilytys (kryopreservointi) on vielä kehittelyn alaisena, mutta esim. mansikan, vaahteran, krysanteemin, porkkanan, soijapavun, pellavan, haavan ja kirsin-

kan solukoista on osa säilynyt elävinä usean kuukauden ajan.

Biosynteesien tutkiminen kasvisolukokasvatuksissa avaa lääketeollisuudelle mahdollisuudet tuottaa vaikeasti viljeltävistä kasveista saatavat lääkeaineet solukokasvatuksissa. Esim. alkaloidien, saponiinien, flavonoidien ja kofeiinin muodostumista solukoissa on selvitetty laboratorioissa. Paitsi lääke-, myös mauste- ja väriaineita voidaan tuottaa solukko-
viljelyksissä.

Kasvipatologiassa kasvisolukkoja on käytetty sellaisten tuhosienten kasvatukseen, jotka eivät kasva suoraan ravintoalustalla. Esim. Kasvitautien tutkimuslaitoksella on tri Linnasalmi kasvattanut möhöjuuren aiheuttajaa, *Plasmodiophora brassicae*-sientä kaalin kallussolukoissa. Viruksia on tutkittu tupakan kallussolukoissa ja protoplasteissa.

Laajimman käytön ja suurimman hyödyn käytännölle on kasvipatologian alalla tuottanut meristeemi- ja kallussolukkojen sekä solujen kasvatus terveiden kasvien tuottamiseksi.

3. Kasvu- eli meristeemisolut kasvilla

Terveiden kasvien tuottaminen on helpointa meristeemisolukoista. Kallussolukkoa ei aina saada erilaistumaan kasviksi, lisäksi kallussolukkaan saattaa jäädä helpommin viruksia kuin meristeemisolukkaan. Kallussolukossa voi tapahtua kromosomihäiriöitä ja erilaistuneet kasvit saattavat poiketa suurestikin alkuperäisestä kasvista. Myös soluviljely on vielä sangen hankalaa ja epävarmaa. Näiden seikkojen vuoksi meristeemisolukko-
viljely on varmintä terveiden kasvien tuottamiseksi.

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. Kasvusolut versojen ja juurten kärjissä aiheuttavat pituuskasvun. Nämä kärkimeristeemit pysyvät kauan kasvukykyisinä, eräissä puissa jopa satoja vuosia. Lehdissä, kukissa ja hedelmissä olevat kasvusolut ovat erilaisia kuin kärkikasvusolut. Ne ovat yleensä lyhytikäisiä. Niissä olevat solut jakautuvat

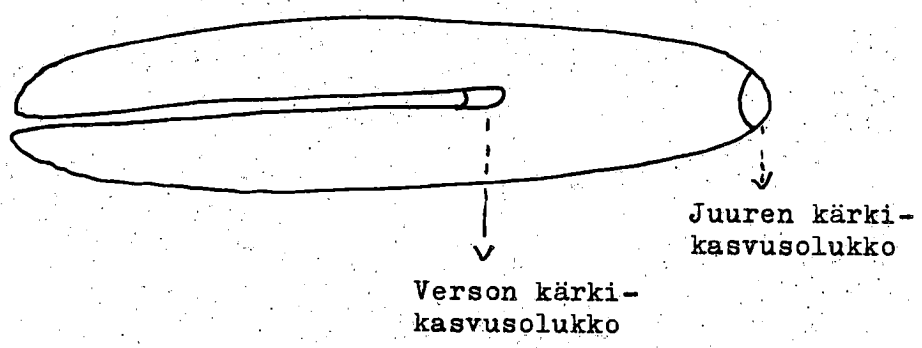
aluksi nopeasti ja solut kasvavat vasta myöhemmin lopulliseen kokoonsa. Paksuuskasvun aikaansaavat kasvusolukot sijaitsevat nilan ja puuosan välisessä jännejältenä. Kasvusolukot syntyvät alkion kehittyessä ja samalla ne myös sijoittuvat paikoilleen alkiovarren ja juuren kärkeen ja sirkkalehti-aiheisiin.

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

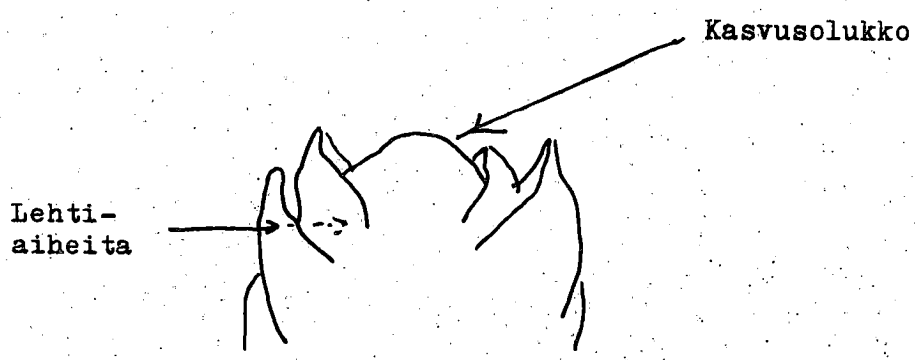
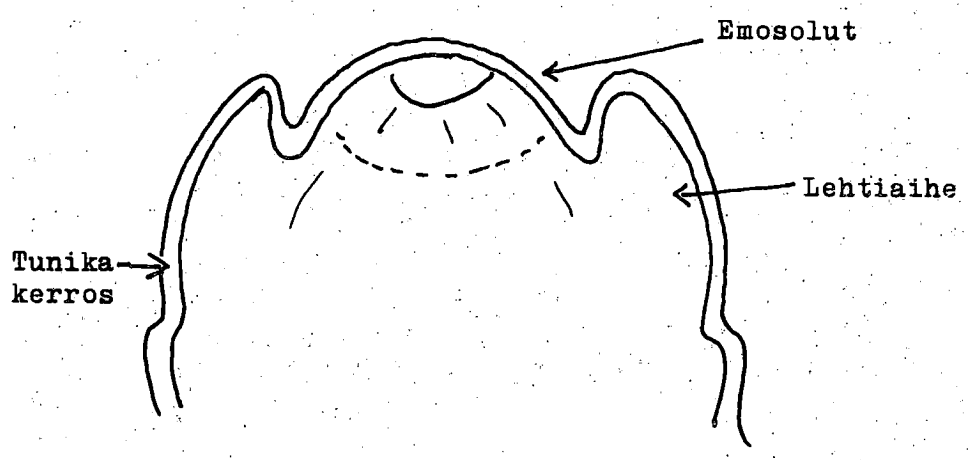
Kasvien versojen meristeemisolukot saavat aikaan haarojen, oksien ja lehtien muodostumisen. Lehden aihe syntyy meristeemin reunasoluista ja näkyy pienenä kohoutumana kasvusolukon vieressä (Kuva 1). Sivusilmujen aiheet ilmaantuvat myöhemmin kuin lehtiaiheet, mutta pian ne saavuttavat samantapaisen rekenteen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

KUVA 1.

a) Kasvusolukot siemenessä



b) Kaavakuva kasvusolukosta



Kärkikasvusolukko on suuressa määrin itsemäärävä 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.

PYYKKÖ, M. 1980. Kasvianatomia. Hämeenlinna. 292 s.

4. Lämpökäsittely

Vaikutus kasviin ja virukseen

Lämpökäsittelyä kasvitautien torjumiseksi alettiin käyttää jo 1880-luvulla, jolloin tanskalainen Jensen kokeili lämminilma-käsittelyä perunaruton ja kuumavesikäsittelyä lentonoen poistamiseksi. Saman vuosikymmenen aikana todettiin Jaavalla lämpökäsittelyn vaikuttavan virus-tautiin tutkija Koben havaitessa, että Sereh-taudin vaivaamista sokेरiruokoista saatiin tervettä lisäysaineistoa, kun pistokkaat upotettiin +50-60 °C:een veteen joksikin aikaa. Tämä menetettely tuli pian rutiinimaiseksi käytännöksi sokेरiruokoviljelyksiä perustettaessa.

Erityisen tunnetuksi ja laajalti käytäntöön otetuksi tuli lämpökäsittely virustautien torjunnassa sen jälkeen kun Kassanis Englannissa 1950-luvulla puhdisti perunoita kierreviroosista +37,5 °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 inaktiiviseksi kasvin vioittumatta. Kuumailmakäsittelyn todettiin lopuksi olevan edullisin kasveille.

Lämpökäsittely tuottaa vain silloin tuloksen, 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 subtrooppillisten ja trooppillisten seutujen kasvit ovat yleensä kestäneet paremmin lämpökäsittelyä kuin kylmän ilmanalan kasvit.

Lähellä +60 °C alkavat valkuaisaineet koaguloitua. Siten korkein lämpötila mitä kasvit ovat kestäneet on esim. persikkapuun pistokkaiden lämminvesikäsittelyssä käytetty +56 °C, eikä käsittely ole saanut kestää tällöin kuin 15 sekuntia. Mansikka-kasvit ovat kestäneet 3 vrk +48 °C lämpötilaa.

Vuodenaika vaikuttaa eräiden kasvien lämmönkestävyyteen, perustana on kasvin fysiologinen tila. Esimerkiksi krysanteemit eivät yleensä kestä lämpökäsittelyä talvella, neilikka on kestänyt lämpökäsittelyt yhtäläisesti 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. Hiilidioksiidin 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.

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 of plant virus diseases. *Adv. Virus Research* 4, 221-241.
- KRISTENSEN, H. RØNDE & THOMSEN, A. 1970. Varmebehandlings 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.

5. Kasvisolukkojen ravinnevaatimukset

a. Perusravinteet

Meristeemi on erikoistumatonta solukkoa, jonka solut tarvitsevat miltei kaikki ravinteensa ympäristöstään. Siten versosta irroitettun meristeemin tulee saada kasvaakseen varsin monipuolinen kasvualue. Samoin on myös kallusolukon yksittäisten solujen laita.

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

Solukkoviljelykset voivat tulla jonkun aikaa toimeen ilman hiilihydraattia ravintoalustassaan, mutta ei pitkää aikaa. Eri tutkijat ovat käyttäneet ravintoalustoissa hiilihydraatin lähteenä dextroosia tai sakkaroosia, glukoosia, mallassokeria, laktoosia, alkoholeja, orgaanisia happoja, dekstriiniä, 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, optimikavun ovat antaneet 0,5-2 % väliset konsentraatiot, 2 % on yleisimmin käytetty. Marjakasveilla 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, ammoniakkinitraattina vai ammoniakkisuoloina. Huomattavia eroja ei ole löydetty, mutta yleisimmin käytetyssä solukkojen ravintoalustassa, Murashige-Skoogin alustassa typpi on annettu ammoniakki-, 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 jossain määrin 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-inositol = meso-inositol.

Myo-inositolilla on ollut selvä kasvua lisäävä vaikutus, se on edistänyt juurten kasvua.

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

Kasvisolukon kasvu ja erilaistuminen eri kasvin osiksi tapahtuu geenien ja kasvuhormonien vaikutuksesta, ja kasvin kehitystä voidaan ohjailla kasvualustaan lisättyjen hormonien avulla. Kasvuhormoneja valmistuu kasveissa, jopa meristeemissäkin, mutta kasvista irroitettujen solukoiden 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 = indolyletikkahappo
 NAA = naftaleenietikkahappo
 IBA = indolylvoihappo
 2.4D = dikloorifenoksietikkahappo
- 2) Gibberelliinit, GA₃ = gibberelliinihappo
- 3) Sytokiniinit, adeniinisulfaatti
 BAP = 6- bentsylamonipuriini
 IPA = isopentyladenosiini
 kinetiini = 6- furfuryaminopuriini
 zeatiini = 6-(4-hydroxy-3-methyl but-2-enyl) amino-
 puriini

Auksiinit

Tunnetuimpia auksiineja on IAA, indolyletikkahappo. 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, naftaleenietikkahappoa. Auksiineilla on kasveissa lukuisia erilaisia vaikutuksia. Auksiinit edistävät kasvua lisäämällä solujen pituutta ja laajuuskasvua. Erittäin huomattava on auksiinien juurten kasvua edistävä vaikutus. Sen vuoksi niitä käytetäänkin paljon apuna pistokkaita juurrutettaessa. Auksiinit edistävät kallussolukon kasvua.

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 auksiinien väkevyydestä. Liian suurina annoksina auksiinit toimivat pikemminkin kasvun ehkäisijöinä kuin edistäjinä. Tähän perustuu auksiinien käyttö rikkakasvien torjunnassa.

Gibberelliinit

Gibberelliinejä tunnetaan yli 20, mutta kasvusolukoviljelyksissä 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 muodostumisessa.

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 pistokkaiisiin. 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 kokonaisuksi kasveiksi. Erittäin merkityksellistä erilaistumistapahtumalle on sytokiniinien ja auksiinien keskeinen suhde ravintoalustassa. Se on useimmiten kokeiltava joka kasvilajille, jopa lajikkeellekin.

6-bentsylamonipuriini, BAP on erittäin tehokasvaikutteinen, synteettinen sytokiniini. Se edistää sivusilmujen solujen jakautumista ja heikentää pääverson hallitsevaa vaikutusta, joka muutoin estäisi sivuversojen

muodostumisen. Tätä BAP:in vaikutusta käytetään hyväksi mikrolisäyksessä eli kloonauksessa, jota 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 aloittaa 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.

6. Mikrolisäys eli "kloonaus"

Lämpökäsittelyjen ja kasvusolukkoviljelysten avulla saadaan usein vain yksi tai muutamia harvoja terveitä kasveja, joista koko lajin tai lajikkeen lisäys on aloitettava. Tämän lisäästyön nopeuttamiseksi on pyritty kehittämään monenlaisia menetelmiä, joilla lisäystä voitaisiin nopeuttaa. Monia vanhoja menetelmiä onkin voitu parantaa ja käyttää myös kasveilla, 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, pensasmainen kasvi. Kasveissa on kuitenkin olemassa ilmiö, kärkisilmun vallitsevuus eli apikaali dominanssi, joka estää kasvien runsasta versojen tuottoa.

Solukkokasvatuksissa kärkikasvusolukon vallitsevuus on voitu estää sytokiniinien avulla. Tällöin on käytetty ravintoalustaan annettuna kinetiiniä, bentsylaminopuriinia tai muita sytokiniinejä, jotka ovat saaneet aikaan runsaan versoihteiden muodostumisen joko kasvusolukko- tai myös muussa solukkoviljelyksessä.

Tällaista lisäysmenetelmää on nimetty mikro- tai monimeristeemilisäykseksi tai kasvin "kloonaukseksi".

Mikrolisäyksessä sytokiniinejä avuksi käyttäen kiihoitetaan 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.

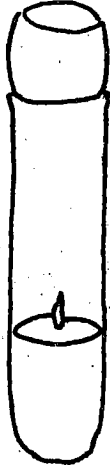
Menetelmää on käytetty menestyksellisesti mansikan lisäyksessä. Englantilainen tutkija Adams julkaisi v. 1972 ohjeen uudistetusta mansikan kasvusolukkojen viljelyyn sopivasta ravintoalustasta. Meristeemit kasvoivat melko hyvin tällä alustalla ja ne tuottivat sivuversoja niin, että neljästä kasvualustalle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

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

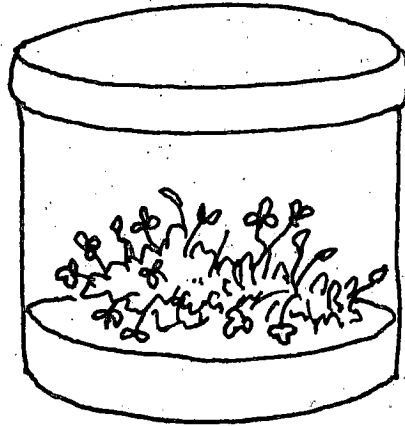
Mikrolisäys voidaan aloittaa myös muilla solukoilla kuin meristeemillä. Esim. Begonian kukkavarresta otettu pala saadaan ravintoalustalla, jossa on sopiva sytokiniini/auksiinisuhte, tuottamaan runsaasti versoja. Neilikan varresta tai meristeemistä aloitettu kallussolukko tuottaa helposti lukuisia versoja sopivalla alustalla. Samoin monet muut kasvit, joiden vegetatiivinen lisäys on muutoinkin helppoa. Muille kasveille näyttää parhaiten sopivan meristeemisolukosta aloittaminen.

Koeputkessa olevia mikrokasveja voidaan säilyttää useiden kuukausien ajan viileässä, +4-6 °C lämpötilassa ja heikossa valossa. Tällöin kasvien elintoiminnot ovat lähes lepotilassa, mutta kasvit säilyvät elossa ja jatkavat kasvuaan normaalisti tavalliseen lämpötilaan ja valoon siirrettyinä. Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on tällä tavoin säilötty sekä juurettomia että juurellisia mansikan pikkutaimia noin vuoden ajan, krysanteemin taimia noin 15 kk:n ajan.

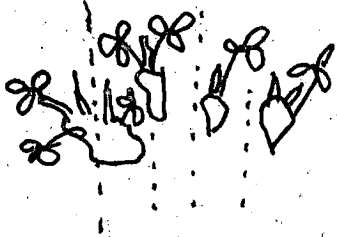
KUVA 2. Monimeristeemilisäys



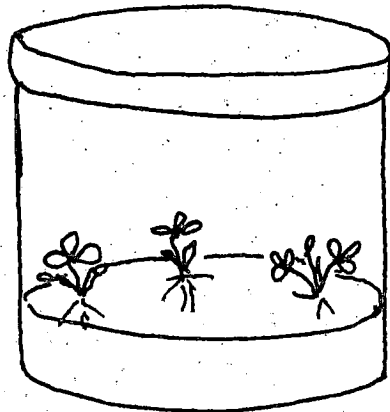
Jonkin verran kasvanut kasvusolukko siirretään sytokiniinipitoiselle kasvualustalle



jossa alkaa runsas versojen muodostus.



Juureton versopensas voidaan jakaa



ja irroitettut versot juurruttaa juurrutus-
alustalla.

Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on mansikan mikrolisäys onnistunut hyvin Red Gauntlet, Senga Sengana, Zefyr ja Ostara-lajikkeilla. Ostara-lajike on sen vuoksi kokeiltavana, koska sen rönsyn muodostuskyky on heikko ja silloin tarvitaan toinen lisäysmenetelmä. Saadut taimet ovat kasvaneet normaalisti ja tuottaneet hyvät sadot kenttäkokeissa.

Kasvitautilien tutkimuslaitoksella on kokeiltu mikrolisäystä mansikan ohella myös begonilla, krysanteemilla, neilikalla, verenpisaralla, viinimarjoilla ja omenapuilla. Koristekasveilla ja mansikalla on saatu parhaat tulokset. Ulkomailla on hedelmäpuiden mikrolisäys tullut merkittävän yleiseksi.

Mikrolisäysmenetelmän merkityksestä mainittakoon seuraavaa:

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

Taimituotanto voidaan ajoittaa hyvin, sillä koepulloissa olevia versokasvatuksia voidaan pitää elinkelpoisina viileässä jopa vuoden ajan.

Kansainvälinen taimikauppa sujuu koepuutkaitaimien 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. 367-369.
- 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 culture. 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.
- REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. (toimit.) 1977. Plant cell, tissue and organ culture. Berlin 803 s.
- 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, M.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.

WAREING, 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 Kasvisolukkoviljelyn suoritus käytännössä

I. Lämpökäsittely

Terveiden kasvien aikaansaamiseksi otetaan kantasolukko, meristeemi tai muu verson osa lämpökäsittelystä kasvista.

Lämpökäsittelyssä kasvia kasvatetaan $+35-40^{\circ}\text{C}$ välisessä lämpötilassa useiden viikkojen ajan virusten ja muiden taudinaiheuttajien heikentämiseksi. Samalla kasvin pitää pysyä kasvukunnossa.

Lämpökäsittely voidaan antaa kasvatuskammiossa, lämpökaapissa tai sopivassa kasvihuoneen osastossa. Edullisimmaksi tulee itse rakennettu lämpökaappi tai kasvihuoneen osasto. Lämpökäsittelytilassa pitää voida nostaa lämpötilaa vähitellen, ilmankosteus pitää olla säädeltävissä ja valaistus riittävä, 6 - 10 000 luksia, 16 t/vrk. Kasveille on edullista, jos kaapin alaosa, missä kasvien juuriosat ovat, on viileämpi kuin latvojen kohdalla oleva ilmatila.

Lämpökäsittelyyn tulevat kasvit istutetaan saviruukkuihin, ja annetaan niiden päästä hyvään kasvuun kasvihuoneessa ennen lämpökäsittelyä. Ennen siirtoa lämpökäsittelyyn saviruukuissa olevat kasvit on hyvä siirtää ruukkuineen isompiin, turpeella täytettyihin ruukkuihin. Ruukkujen välissä oleva kostutettu turvekerros pitää mullan ja siinä olevat juuret viileinä.

Vadelmat on hyvä leikata alas. Mansikassa ei saa olla lehdellisiä rönsyjä lämpökaappiin siirrettäessä. Alasleikatut monihaaraiset nuoret omenapuit ovat sopivimmat lämpökäsittelyyn.

Kasvien ollessa lämpökaapissa lämpö asetetaan ensin 22°C - ja nostetaan sitten vähitellen, esim. 2°C joka toinen päivä, kunnes haluttu lämpötila on saavutettu. Seuraavat lämpötilat ja ajat ovat suositeltavia: mustaherukka $+35^{\circ}\text{C}$, 3 viikkoa (suonenkatoviroosi). Mansikka, 38°C 6 viikkoa ja vadelma, 38°C , 8 viikkoa. Omena- ja muut hedelmäpuut, $37-38^{\circ}\text{C}$, 6 viikkoa.

Krysanteemi, 37°C 5-6 viikkoa, mutta kääpiökasvuviroidia ei voida täysin poistaa lämpökäsittelyllä. Neilikka, 37°C , 60 vrk.

Lämpökäsittelyn aikana kasvit pidetään sopivan kosteina, myös ruukkujen välissä oleva turve kostutetaan. Kasveja on myös lannoitettava neste-mäisellä liuoksella pari kertaa viikossa. Ilman kosteus olisi hyvä olla

ainakin 60 %, mutta eri kasveilla on erilaiset vaatimukset. Kasvi kokonaisuudessaan ei puhdistu lämpökäsittelyssä. Vain meristeemit ja käsitteilyn aikana kasvaneet versojen kärkiosat saattavat olla puhtaita. Jos solukkokasvatus ei onnistu, voidaan pienet versojen latvat joko ympätä terveisiin siemenkasveihin (omenapuut, herukat) tai juurruttaa ne suoraan (vadelma). Joka tapauksessa lämpökäsitetyistä kasveista saadut taimet on testattava.

2. Työpaikat ja välineet sekä niiden puhdistus

Kasvusolukkokasvatuksia varten tarvitaan siistiä, pölytöntä laboratorio-tilaa, jossa kaikki pinnat ovat helposti puhdistettavissa. On hyvä jos saatavilla on huone valmistelevia töitä varten ja välittömästi sen yhteydessä puhdas työhuone, jossa on koneellinen ilmanpuhdistus tai johon voidaan sijoittaa esim. laminaarivirtauskaappi. Kaikkein siisteimpänä työtilana olisi paras käyttää laminaarivirtauskaappia, jossa ilma puhalletaan takaseinän kautta vaakasuorasti suodattimien läpi. Laminaarivirtauskaappi on sijoitettava puhtaimpaan huoneeseen, jossa ei ole liikaa ovia ja läpikulkua, ja jossa ei ole pölyä kerääviä avohyllyjä tms.

Laminaarivirtauskaappeja halvempia ovat elektroniset ilmanpuhdistajat, jotka myös poistavat ilmasta pölyhiukkasia ja itiöitä. Sekä laminaarivirtauskaappeja että elektronisia ilmanpuhdistajia valmistetaan kotimaassa.

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

Edellisten lisäksi tarvitaan tilat autoklaavia, desinfioimislämpökaappia ja kasvatusastioiden pesukonetta ja pesua varten. Vaakaa varten tarvitaan myös tila ja varastotilaa kemikaalioita ja lasitavaraa varten. Solukkokasvatuksille tarvitaan kasvatushuone.

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 silmillä. Myös on pidettävä mielessä, että ultraviolettivalo ei tehoa lasin läpi.

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

Kuva 3. Ultraviolettisäilytyksellä 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 kasvisolukkoviljelyksiä tehtäessä:

Autoklaavi, jonka suuruus riippuu tarvittavien kasvuvalustojen määrästä. Ravintoalustat desinfioidaan 120 °C lämpötilassa ilmakehän paineessa 20-30 minuutin ajan. Eräät kasvuhormonit ja vitamiinit, esim. zeatiini eivät kestä korkeita lämpötiloja. Niitä sisältävät liuokset voidaan steriloida bakteerisuodattimen avulla. Bakteerisuodatettu liuos lisätään ravintoalustaan autoklavisoinnin jälkeen juuri ennen kuin agar alkaa jähmettyä.

Lämpökaappia voidaan käyttää kasvatusastioiden, työvälineiden ym. desinfioimiseen. Riittävä desinfiointi-aika on 3 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 väkevöityjä perusliuoksia. Vaaka, jolla päästään 0.1 mg tarkkuuteen on sopiva. Vaalla 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 desinfiointiä 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. Tolua voidaan myös käyttää. Delegol-liuos on osoittautunut hyväksi meillä.

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

Pienet työvälineet. Kasvusolukoiden irroittamista ja siirtämistä varten tarvitaan veitsiä, preparointineuloja, pinsettejä ym. Erittäin hyviä ovat leikkausveitset, joissa on irroitettavat ei liian suuret terät. Kaikki nämä välineet on voitava pesun jälkeen desinfioida lämpökaapissa. Ultraääniaaltopesukoneita voi käyttää pienikokoisten välineiden puhdistukseen. Veitsiä on oltava riittävästi, jotta eri työvaiheita varten on olemassa riittävästi desinfioituja välineitä. Työvälineiden desinfiointi pesun jälkeen suoritetaan lämpökaapissa ja työn aikana 70-90 % alkoholiin kastaen, ei koskaan liekissä kuumentaen. Veitset ja pinsetit on paras kääriä alumiinifolioon ennen lämpökaappisterilointia. Siten niitä on myöhemmin helppo kuljettaa ja käyttää tarpeen mukaan. Meristeemi on hyvä leikata imupaperin päällä petrimaljassa. Imupaperilliset petrimaljat steriloidaan samoin kuin veitset yksittäin alumiinifolioon käärittyinä.

Kasvisolukkojen kasvatusastioina voidaan käyttää koeputkia, leveäsuuisia lasipulloja ja lasipurkkeja kasvatettavien kasvien koon mukaan. Lasiastiat pestään vedellä ja pesuaineella ja huuhdellaan huolellisesti, sillä jotkut pesuaineet saattavat olla myrkyllisiä kasvisolukoille. Steriloidaan pesun jälkeen lämpökaapissa. Putkien ja pullojen sulkemiseen voidaan käyttää metallikorkkeja, pumpulituppoja, alumiinipaperia tai parafinikalvoa.

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 on paras säilyttää syväjäädetyttynä, joten syväjäädetytsarkku on tarpeen. Myös vitamiinit ja hormonit voidaan pakastaa pieninä esim. 1 l ravintoalustaa varten tarvittasina määrinä. Ravintoalustojen pH-mittausta varten tarvitaan pH-mittari.

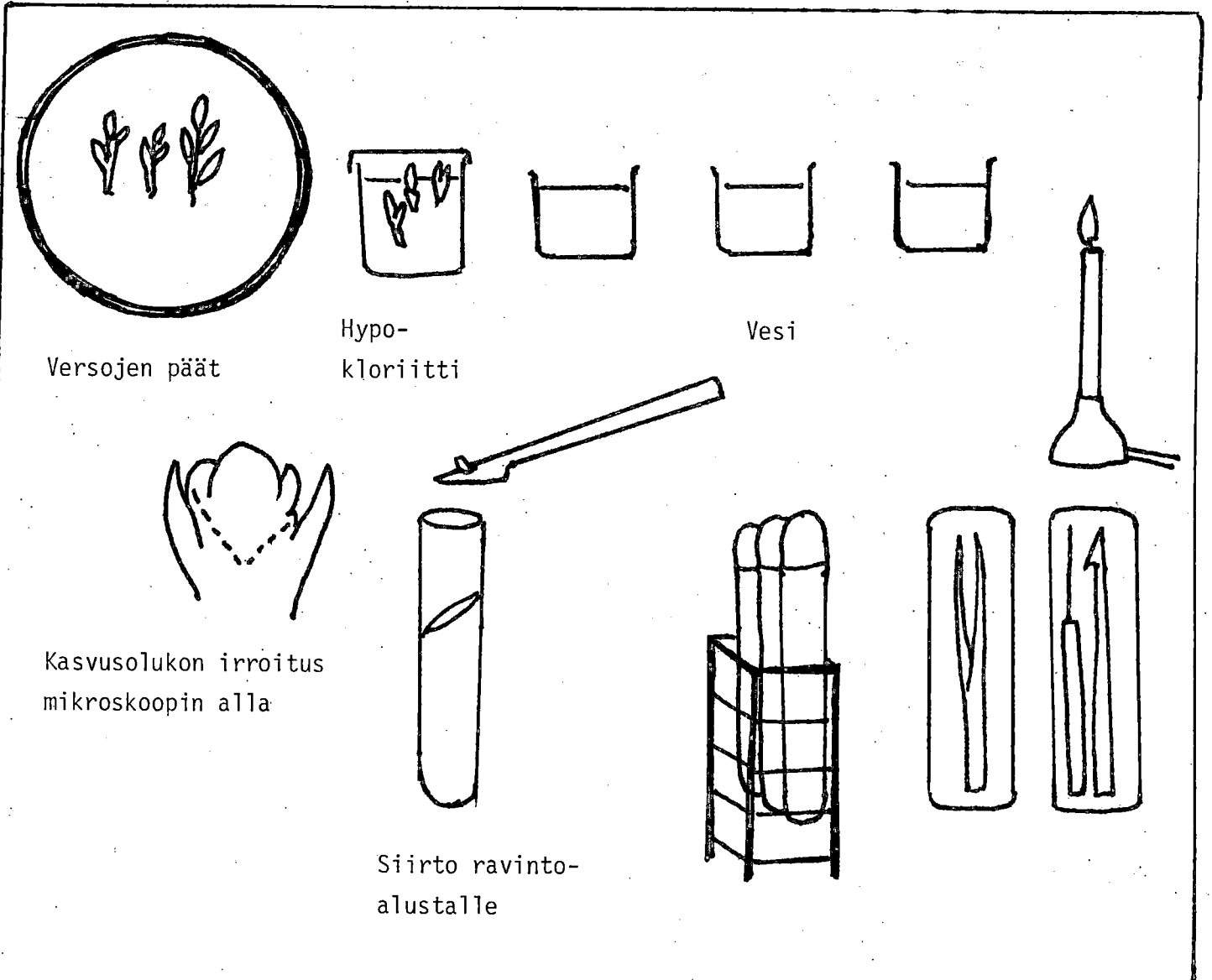
3. Kasvusolukon irroitus kasvista ja siirto ravintoalustalle

Aluksi tarkastetaan, että kaikki työvälaineet ja desinfiomisaineet ovat valmiina steriilissä työtilassa. Parasta olisi tehdä työ laminaarivirtauskaapissa. Sen jälkeen lämpökäsitellyistä kasveista otetaan pienet 2-3 cm mittaiset versojen päät, mansikoista rönsyjen päät, siisteihin astioihin ja viedään desinfiotaviksi. Versoista irroitetaan lehdet pois ja ne kastetaan nopeasti 90-95 % alkoholiin tai veteen, jossa on astianpesuainetta (80 ml vettä, 20 ml pesuainetta). Sen jälkeen ne upotetaan 10-20 minuutiksi (pehmeät versot 10, kovemmat 15-20 min.) 5 % kalsium- tai natriumhypokloriittiin. Sen jälkeen ne huuhdotaan autoklavisoidussa, tislatussa vedessä vähintään kolmeen kertaan. Tämän jälkeen leikataan aina uusia steriloituja veitsiä käyttämällä lehtiaiheita pois kunnes kasvusolukko paljastuu. Kasvuun lähdon varmentamiseksi irroitetaan kasvusolukko 2-4 lehtiaiheen kanssa joko suoraan tai vinosti poikkileikkaamalla. Kuva 4.

Irroitettu kasvusolukko siirretään veitsellä tai neulalla ravintoalustaan taivutetun imupaperin päälle tai agarille. Koeputken suu desinfioidaan liekillä ja suljetaan. Koeputken sulkemiseen voidaan käyttää parafiinikalvoa tai alumiinifoliota.

Eräiden kasvien solukot tummuvat helposti. Tummumista voidaan estää kastamalla solukko hypokloriittidesinfiointin ja vesihuuhtelun jälkeen autoklavisoituun C-vitamiiniliuokseen. Liuos = 25 mg askorbiinihappoa, 40 mg sitruunahappoa ja 500 ml destilloitua vettä.

KUVA 4. Kasvusolukkokasvatuksen aloitus.



4. Ravintoalustojen valmistusohjeet

a. Murashige-Skoogin ravintoalusta (MS)

Kaikkien tässä esitettyjen ravintoalustojen perustana on MS-alusta eli Murashigen ja Skoogin (1962) tupakan kallussolukkoviljelyksiä varten kehittämä alusta. Taulukossa 1 on esitetty Murashige-Skoog (MS) alustan alkuperäinen koostumus, vaikka sellaisenaan emme olekaan sitä käyttäneet paitsi perunalle ja sen vuoksi ravintoalustojen valmistus esitetään vasta tämän alustan sovellutusten yhteydessä.

MS-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 indolylietikkahappoa (IAA).

MS-alustan väkevyys on hyvin suuri, suurempi kuin minkään muun kallus- 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 alkuperäisistä MS-alustan määristä.

Yleensä joudutaan käyttämään kullekin kasville kolmea erilaista alustaa solukon kehitysvaiheiden mukaisesti. Meristeemi siirretään ns. I alustalle, jossa se saadaan kasvun alkuun ja noin 3-5 viikon kuluttua pieni verso siirretään II alustalle, jossa verson kasvu jatkuu ja samalla muodostuu uusia versoja. III-alustalla versoille saadaan muodostumaan juuret. Joillekin kasveille riittää I ja II-alustat. Perunalle on sopinut koko ajan MS-perusalusta tai LS eli Linsmaier-Skoogin (1964) ravintoalusta, joka eroaa MS-alustasta vitamiinien määrän kohdalla. LS-alustassa käytetään vain B_1 vitamiinia, mutta sitä 4 kertaa enemmän kuin MS-alustassa.

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	thiamiini	0,5
		myo-inositol (meso-inositol)	100
		glysiini (Glykoko11)	2,0
		IAA	1-30,0
		kinetiini	0,04-10,0

pH 5,7-5,8

Taulukko 2. Murashige-Skoog (1982) alustan perusliuokset.

Perusliuos		perusliuos	1 litraan ravinto- alustaa
A 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	
B Rauta	EDTA -FE -Na ₂ (Na ₂ -Fe-EDTA)	390,0 mg/l	100 ml
C Hivenaineet	H_3BO_3	620,0 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	
D Vitamiinit	Glysiini (glycogoli)	200 mg/l	} 10 ml
	Nikotiinihappo	50 "	
	Pyridoksiinihappo(B6)	50 "	
	Tiamiini (B1)	10 "	
E IAA (indolyletikkahappo)		50 mg/500 ml	
F IBA (indolylvoihappo)		50 - " -	
G Kinetiini (6-furfuryaminopuriini)		50 - " -	
H Gibberelliinihappo (GA ₃)		50 - " -	
I BAP (bentsylaminopuriini)		50 - " -	
K NAA (naftyletikkahappo)		50 - " -	

Seuraavat aineet punnitaan joka kerta erikseen:

Myo-inositoli (meso-inositoli)	100 mg
Kaseiini (casein hydroxylate) haluttaessa	3 g
Adeniinisulfaatti	80 mg
Sakkarosi	20 g
(Agar, haluttaessa)	8-10 g)

b. Murashige-Skoog - alustan perusliuokset ja alustan valmistus

Ravintoalusta on valmistettu seuraavasti:

Ensiksi tehdään väkevöidyt perusliuokset taulukon 2 kohtien A-K mukaan. Taulukkoon 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, jollei niitä syväjäädytetä. Lisäksi niitä tarvitaan vain pieniä määriä kerrallaan.

Mitataan perusliuokseen tarvittava määrä tislattua vettä esim. 1 l. Tästä vesimäärästä otetaan aina kutakin perusliuoksen ainetta varten dekanterilasiin 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 A 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 A aineiden liuottamiseen. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -liuos lisätään viimeiseksi koko ajan sekoittaen. Muutkin aineet yhdistetään vasta, kun ne ovat täysin liunneet veteen. Perusliuos A säilyy kauan, jos se on suojattu valolta. Samalla tavoin valmistetaan perusliuokset C ja D. Perusliuosta B (rauta) on ravistettava ennenkuin sitä otetaan ravintoliuokseen. B rauta voidaan antaa myös rautasitraattina, perusliuos 450 mg/250 ml vettä, josta 1 ml riittää 1 litraan ravinnealustaa. Perusliuos D, vitamiinit, ei säily montakaan viikkoa, joten sitä ei kannata tehdä suurta määrää kerralla. Se voidaan kuitenkin pakastaa sopivina annoksina muoviputkissa, jolloin se säilyy hyvin.

Hormoniperusliuokset (E, F, G, H, I ja muut) IAA, kinetiini, gibberelliini, IBA, indolylvoihappo ja NAA liuotetaan autoklavisoimalla 1 atm paineessa 15 minuuttia tai alkoholin avulla. Eräät tutkijat steriloiivat ne bakteerisuodattimella.

Jos IAA:n asemasta käytetään NAA (naftalyletikkahappoa), liuotetaan NAA ensin muutaman pisaraan 95 % alkoholia, jonka jälkeen lisätään tarvittava vesimäärä ja seos autoklavisoidaan tai steriloidaan bakteerisuodattimella.

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 kaapissa.

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

Lopuksi punnitaan orgaaniset aineet, esim. sokeri, myo-inositol, 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 desinfiointuuihin (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. Joillekin kasveille (hedelmäpuut) voi $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:n määrä olla liian suuri. Juurten muodostumista voi edistää suurehko, 400 mg/l määrä myo-inositolia.

c. Kookosmaitouute

Kookosmaitouute valmistetaan seuraavasti:

Kookosmaito otetaan vielä raaoista, vihreistä kookospähkinöistä ja siivilöidään tiheän kankaan läpi. Sentrifugoimalla maidosta voidaan poistaa epäpuhtauksia. Kookosmaito säilytetään esim. 50 tai 100 ml annoksiin pullo-tettuna, syväjäädetyttynä.

Jos saatavilla on vain täysin kypsiä kookospähkinöitä, valmistetaan uute niistä seuraavasti: valkoinen hedelmäliha irroitetaan pähkinöistä ja jauhe-taan hienoksi. Massaan lisätään vettä 2 ml yhtä grammaa kohti. Seos puriste-taan siiviläkankaan lävitse ja jätetään seisomaan pariaksi tunniksi, jotta rasva erottuisi. Rasvakerros kuoritaan nesteen päältä pois ja neste sentri-fugoidaan viimeistenkin rasvahiukkasten poistamiseksi. Sentrifugoinnin

jälkeen sakka heitetään pois ja uuteneeste säilytetään syväjäädetytynä.

d. Mansikalle käytetyt alustat

Mansikan perusalusta M 1

MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	1 l alustaa
A pääravinteet	100 ml
B rauta	100 ml
C hivenaineet	10 ml
D vitamiinit	10 ml
ja erikseen punnittavat aineet, ei sakkaroosia	100 mg
IBA (indolylvoihappo) (perusliuoksesta 50 mg/500 ml)	10-20 ml
tai IAA	
glukoosi	40 g

I alusta voidaan käyttää agarilla hyytelöitynä tai nestemäisenä, jolloin kasvusolukko sijoitetaan alustaan taivutetulle ja sillä kyllästetyille imupaperille. Alustaan voidaan lisätä haluttaessa 100 ml kookosmaitouutetta alkukasvun edistämiseksi. Kookosmaitouutteen valmistusohje s. 34.

Mansikan kasvusolukot saattavat kasvattaa myös juuret tällä alustalla, mutta pienet versot on siirrettävä 4 viikon väliajoin uudelle alustalle, kunnes ovat riittävän suuria siirrettäväksi muutaan kasvamaan.

Mansikan lisäsalusta M 2

Kavusolukot siirretään aluksi kasvamaan mansikan perusalustalle M 1. Kun pienet versot (2-4 viikkoa), ne siirretään lisäsalustalle M 2.

Alusta M 2:n koostumus:

MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	1 litraan ravintoalustaa
A pääravinteet	100 ml
B rauta	100 ml
C hivenaineet	10 ml
D vitamiinit	10 ml
ja erikseen punnittavat aineet, ei kuitenkaan sakkaroosia sekä seuraavat aineet	

F IBA (indolylvoihappo)	10 ml
I BAP (bentsylaminopuriini)	10 ml (10-20)
H gibberelliinihappo	5 ml
glukoosi	30-40 g
agar	5-6 g

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

Silloin kun halutaan juurellisia kasveja, on toisistaan irroitettut versot siirrettävä kasvamaan M 1-alustalle, jossa niistä kehittyy valmiit kasvit, jotka voidaan siirtää multaan kasvamaan.

Mansikan lisäys meristeemeistä voidaan siten toteuttaa näitä kahta M 1 ja M 2-alustaa käyttämällä.

e. Herukoille ja karviaiselle käytetyt alustat

Herukoille on käytetty Jones & Viner'n (1968) karviaiselle käyttämää muunnosta Murashige-Skoog - alustasta hieman muutettuina.

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

Alusta H 1

MS-alustan perusliuksista otetaan:

	yhteen litraan A ravintoalustaa
A pääravinteet	100 ml
B rauta	100 ml
C hivenaineet	10 ml
D vitamiinit	10 ml
erikseen punnittavat aineet sekä seuraavat aineet:	
glukoosi tai sakkaroosi	20 g
K NAA	5-10 ml
(kookosmaitouutetta)	100 ml)
H gibberelliinihappo	5-10 ml
I BAP	10-20 ml

Alusta H 2

MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	Yhteen litraan ravintoalustaa
A pääravinteet	100 ml
B rauta	100 ml
C hivenaineet	10 ml
D vitamiinit	10 ml
sekä erikseen punnittavat aineet ja seuraavat hormonit:	
F IBA	10 ml
I BAP	2 ml
glukoosi tai sakkaroosi	30 g
(kookosmaitoa	50 ml)

Alusta H 2:lla kasvusolukoita siirretään noin 4 viikon välein uudelle H 2 alustalle, kunnes kasvit ovat kehittyneet multaan siirrettäväksi sopivaan kokoon.

f. Vadelmalle käytetyt alustat

Kavusolukot siirretään aluksi kasvamaan herukka-alustalle V 1, jolta ne siirretään vielä kerran V 1 ja juurtumaan vadelma-alustalle V 2:lle, joiden suolapitoisuudet ovat alhaisempia kuin Murashige-Skoog-alustan.

Alusta V₁

MS-alustan perusliuoksista otetaan:

	Yhteen litraan ravintoalustaa
A pääravinteet	25 ml
B rauta	25 ml
C hivenaineet	7,5 ml
D vitamiinit	7,5 ml
sekä erikseen punnittavat aineet ja seuraavat hormonit:	
I BAP	20 ml
F IBA	1 ml

V_2 kuten V_1 , mutta kasvuhormoneista otetaan vain seuraavaa:

F IBA 3-5 ml

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.

g. Omenapuulle käytetyt alustat

Meristeemi siirretään alustalle OI

OI A = 100 ml/l l

B = 100 ml

C = 10 ml

D = 10 ml

ja erikseen punnittavat aineet MS-alustan mukaisesti sekä

I BAP 10 ml

H gibberelliini 2 ml

K NAA 1 ml

II alusta

A = 100 ml

B = 100 ml

C = 10 ml

D = 10 ml

ja erikseen punnittavat MS-alustan aineet

I BAP 20 ml

III juurtumisalusta

A = 50 ml/l l

B = 50 ml/l l

C = 10 ml/l l

D = 10 ml/l l

ja erikseen punnittavat MS-alustan aineet sekä

F IBA 2-25 ml

phloroglucin 162 mg/l

(aktiivihiili 20 g/l haluttaessa, sopii joillekin lajikkeille)

Jos kasvu on hidasta voidaan pieniä versoja siirtää 2-3 kertaa 4 viikon väliajoin aina uudelle II alustalle. Tällöin saadaan muodostumaan versoja runsaammin. Juurten muodostumista saattaa edistää versojen pitäminen pimeässä 5-6 vrk:n ajan II alustalla, juuri ennen siirtoa III-alustalle.

Floroglusiini (phloroglucin) on omenapuun juurissa esiintyvä aine, ja se on eräiden tutkijoiden mukaan edistänyt huomattavasti juurten muodostumista. I-alustassa sitä ei sovi käyttää. Juurten muodostumista voidaan edistää kastamalla juurettomien versojen päät IBA-liuokseen ennen siirtämistä kasvuhormonittomalle alustalle.

h. Krysanteemille ja neilikalle käytetyt alustat

K I-alusta

Perusliuoksista

A = 100 ml/l

B = 100 "

C = 10 "

D = 10 "

ja erikseen punnittavat aineet sekä

K NAA	1 ml
G kinetiini	5 ml

K II Versojen kasvu- ja lisäysalusta

Kuten alusta I, mutta

G kinetiini	20 ml
-------------	-------

K NAA	1 ml
-------	------

K III Juurtumisalusta

Muutoin kuten alusta I, mutta kaikki kasvuhormonit pois.

Sekä neilikan että krysanteemin meristeemit ovat kasvaneet ja monistuneet hyvin näillä alustoilla.

i. Pelargonille käytetty alusta

MS-perusliuoksista

A = 100 ml/l

B = 100 ml/l l

C = 10 - " -

D = 10 - " -

erikseen punnittavat aineet sekä

kookosmaitoa 150 ml

G kinetiini 100 ml

K NAA 10 ml

Pelargonin meristeemit ovat kasvaneet ja monistuneet samalla alustalla.

j. Begonille käytetyt alustat

B I MS perusliuoksista

A = 100 ml/l l

B = 100 ml/l l

C = 10 ml/l l

D = 10 ml/l l

punnittavat aineet sekä

I BAP 2,5 ml = 0,25 mg/l

K NAA 5,0 ml = 0,5 "

(H, gibberelliini 5,0 ml = 0,5 ")

III Juurtumisalusta

Kuten edellä, mutta ilman BAP:ia ja gibberelliiniä.

Begonilla vaihtelee kasvuhormonien määrä eri lajikkeilla. Jos halutaan solukkopala, esim. kukkavarresta tai lehtiruodista tuottamaan uusia kasveja, on yleensä sytokiniinin (BAP) määrä pidettävä pienempänä kuin auksiinin (NAA tai IAA) määrä, joskus ne voivat olla samansuuruiset. Sama koskee myös meristeemin kasvatusta. Begonin I alustassa on käytetty usein myös kookosmaitoa (50-100 ml/l) tai koivunmahlaa (100 ml/l).

k. Sipulille käytetyt alustat

Sopii esim. freesian ja ryvässipulin kasvupisteille.

S I MS-alustan perusliuoksista:

A = 100 ml/l

B = 100 "

C = 10 "

D = 20 "

Lisäksi erikseen punnittavat aineet (sakkarooosi 30 g).

I	BAP	20 ml
K	NAA	5 ml

Sipulin meristeemeistä kasvaneet versot siirretään vielä kerran tai kaksi tälle alustalle ja lopuksi juurtumisalustalle.

S III MS-alustan perusliuoksista

A = 100 ml/l I

B = 100 "-

C = 10 "-

D = 20 "-

ja erikseen punnittavat aineet (sakkarooosi 30 g) sekä

(I	BAP	5 ml
K	NAA	3 ml

Sekä S I että S II alustat olleet ilman agaria ja sipulin meristeemi on siirretty imupaperille.

Kirjallisuutta:

ADAMS, A.N. 1972. An improved medium for strawberry meristem culture.

J. hort. Sci. 47, 263-264.

ANDERSON, W.C. 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries,

Rubus idaeus and *R. occidentalis*. Acta Hort. 112:13-20.

EARLE, E.D. & LANGHANS, R.V. 1974. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro.

I Multiple plant lents from shoot tips and the establishment of tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci 99(2):128-132.

HARTMAN, 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 bio-

assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15. 473-497.

PALUDAN, N. 1971. Etablering of virusfrie meristemkulturer af havebrugs-

planter. Tidskr. Planteavl. 75. 387-410.

- PUTZ, C. 1971. Obtention de framboisiers (var. Bois blanc) sans virus par la technique des cultures de méristèmes. *Ann. Phytopath.* 3, 493-501.
- PYOTT, J.L. & CONVERSE, R.H. 1981. In vitro propagation of heat-treated red raspberry clones. *Hort. Science* 16. 308-309.
- ZIMMER, K. & POTTHOF, H. 1978. Gewebekultur bei Begonien. *Deutscher Gartenbau* 23: 962-965.
- REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. (toimit.) 1977. *Plant cell, tissue and organ culture*. Berlin. 803 s.
- THORPE, T.A. (toimit.) 1981. *Plant tissue culture*. New York-London. 379 s.

5. Kalluskasvatukset ja niille sopivat alustat

a. Kallussolukkoviljelmän aloitus

Kalluskasvatus voidaan aloittaa kasvin eri osista esim. versoista, silmuista, juuren päästä, mukuloista, hedelmistä. Kallus alkaa kasvaa hyvin myös varren palasesta. Kasvin varresta leikataan esim. 2 cm pituisia pätkiä, jotka steriloidaan tavalliseen tapaan hypokloriitissa ja huuhdellaan huolellisesti steriilillä vedellä. Tämän jälkeen leikataan (kts. kuva 5.) veitsellä suorakaiteen mukaisesti viillot varren kuoreen. Pinseteillä ja veitsellä auttaen vedetään kuori suorakaiteen alalta pois. Paljastuneesta varren osasta leikataan n. 2-3 x 2-3 x 50 mm suuruinen palanen, joka siirretään ravintoalustalle. Jonkun viikon kuluttua palasen pinnalle on kasvanut kallussolukkoa, joka voidaan irroittaa kantasolukosta ja kasvatetaan itsenäisenä seumavalla alustalla. Kallusolukon alkukasvu onnistuu myös pimeässä.

Neilikasta on saatu terveitä kasveja myös kallussolukkoviljelyn kautta. Kallusviljelämä on tällöin aloitettu meristeemistä, jota on haavoitettu veitsellä kallussolukon kasvun kiihoittamiseksi.

b. Kallussolukolle sopivat alustat

MS-alusta sopii hyvin kalluksen kasvatukseen. Sen ohella kallusta voidaan kasvatkaa myös Gamborgin kehittämällä B5-alustalla, jolla voidaan kasvatkaa myös meristeemejä ja muita solukoita. B5-alusta on laadittu soveltumaan monille sekä yksi- että kaksisirkkaisille kasvilajeille ja havupuille. Taulukossa 3 on esitetty B5-alustan koostumusta.

Ensimmäisessä alustassa, jolle kantasolukkopala on siirretty, on oltava runsas määrä auksiinia. Tupakan solukoille on sopinut IAA, yksisirkkaisille kasveille, esim. heinille 2·4 D (dikloorifenoksietikkahappo) on parhain (2-20 mg/l). Monille puuvartisille pensaille, esim. mustaherukka, ruusu, sekä lehtipuille, esim. haapa, on NAA aiheuttanut hyvän kallussolukon kasvun. Myös IBA:ta on käytetty joillakin kasvilajeille. Kookosmaidolla-kin on kalluksen kasvua edistävä vaikutus.

Taulukko 3. B5-alustan koostumus.

Pääravinteet	mg/l ravintoalusta
KNO_3	2500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150
Hivenaineet	
KJ	0.75
H_3BO_3	3.0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe-Na-EDTA	43.0
Vitamiinit ja hormonit	
Myo-inositol	100.0
Nikotiinihappo, B ₁ vitamiini	1.0
Pyridoksiini · HCl	1.0
Tiamiini · HCl	10.0
Kinetiini	0.1
2·4D	0,1 - 2.0

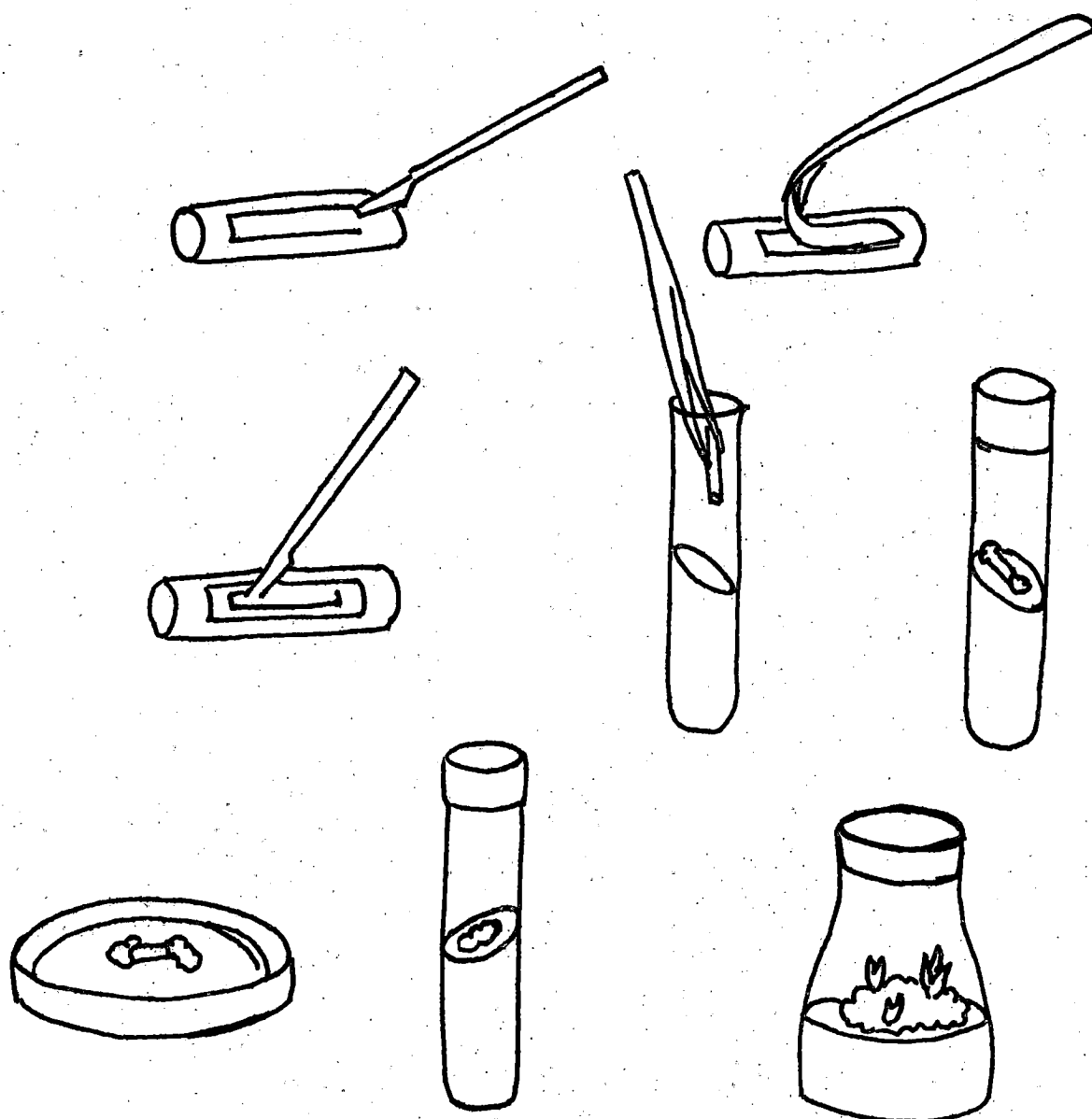
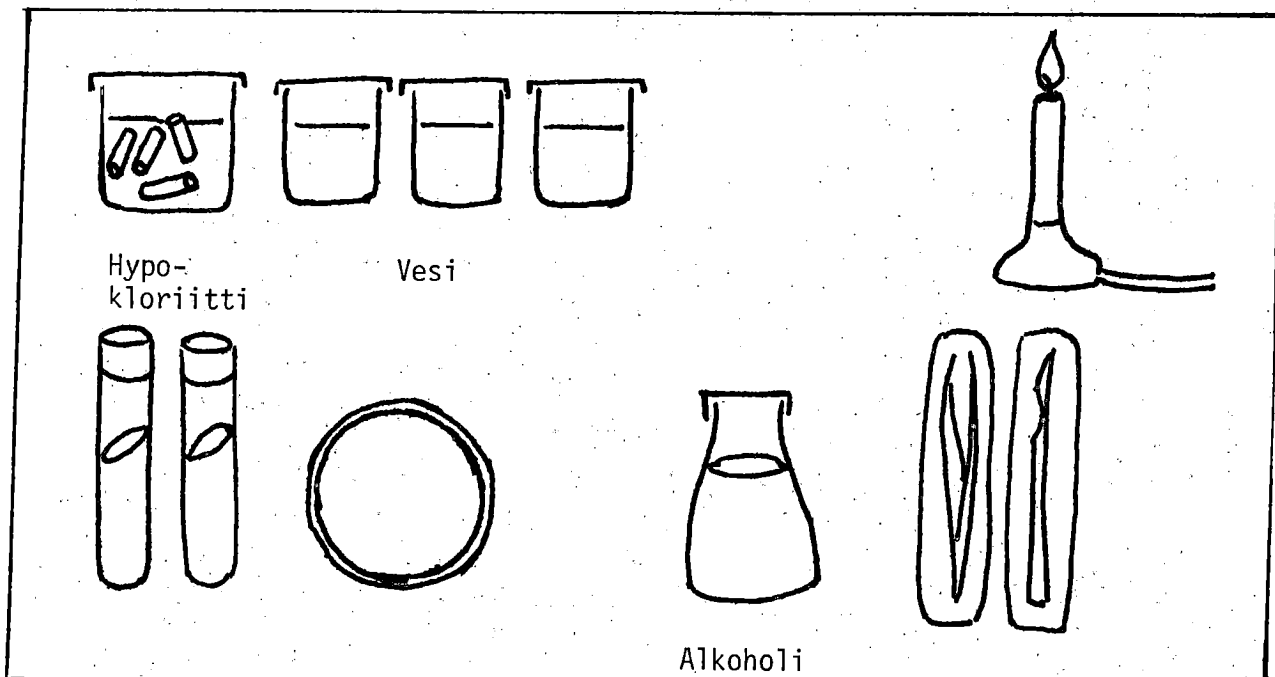
Kalluskasvatuksia
varten

Seuraavalla alustalla (MS- tai B5-alusta), tarvitaan auksiinin lisäksi pieni määrä sytokiniiniä. Jos taas halutaan saada kallussolukko erilaistumaan kasveiksi täytyy sytokiniinin määrän yleensä olla suurempi kuin auksiinin määrä. 2·4 D ei voida tällöin käyttää, sillä sillä on ehkäisevä vaikutus erilaistumiseen. Kinetiini, BAP ja zeatiini ovat yleisimmin käytettyjä sytokiniinejä.

Kallussolukon erilaistuminen ei ole onnistunut kaikilla kasvilajeilla. Esim. seuraavilla kasveilla on kallus erilaistunut: tupakka, porkkana, poppeli, sitruunapuu, kahvipensas, valkosipuli, neilikka, eräät heinäkasvit.

Esimerkkinä mainittakoon, että Petru ja Landa'n kokeissa neilikan kallussolukko on erilaistunut versoiksi MS-alustalla, jossa oli IAA:ta 4 mg/l ja kinetiiniä 2.5 mg/l. Juurten muodostuminen alkoi MS-alustalla, jossa oli NAA 0.25 mg/l ja kinetiini 0.5 mg/l.

KUVA 5. Kallussolukokasvatuksen aloitus.



Kirjallisuutta:

- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. & OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exper. Cell Res.* 50: 151-158.
- PETRU, E. & LANDA, Z. 1973. Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated in vitro. *Biol. Plant.* 16: 450-453.
- THORPE, T.A. (toim.) 1981. *Plant tissue culture*. New York. 379 s.

6. Solukkoviljelysten kasvuolosuhteet

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

Lämpö

Solukkoja kasvatetaan + 18-28 °C välisissä lämpötiloissa. Eri kasvilajien solukoilla on hieman erilaiset lämpötilavaatimukset, joskaan niitä kaikkia ei vielä tunneta.

Esimerkkeinä mainittakoon:

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

Valo

Useimpien kasvien solukot kasvavat parhaiten 16 tunnin pituisessa päivässä. Valoisuuden sopiva määrä on 3000-6000 luksia. Flora Lux- ja Kirkas Valkea-lamppujen yhdistelmä on ollut sopiva kasvusolukoille. Valomäärä voi alussa olla pieni 3000 luxia ja sen määrää lisätään versojen kasvaessa. Juurten muodostumista voi edistää 2-4 vrk:n pimeä jakso.

7. Solukoista saatujen kasvien kasvatus

Solukosta kasvanutta pientä kasvia kasvatetaan aluksi huoneessa, jonka olosuhteet vastaavat koeputkessa olevien solukkokasvatusten olosuhteita. Myöhemmin kasvi siirretään hyönteistiiviiseen kasvihuoneeseen, kasville mahdollisimman suotuisiin oloihin. 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 toteuttamisen perusteella.

Terveystarkastuksia ei tule tehdä kovin nuorista kasveista, joissa virusväkkyys voi olla vielä niin vähäinen, ettei se tule esille testauksissa. Vasta 3-6 kk:n ikäisiä kasveja, tietenkin kasvilajista riippuen, voidaan testata. Testaukset on eräillä kasveilla uusittava 1-2 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 luovutetaan lisättäviksi.

Kasvien aitous on tarkistettava. Maatalouden tutkimuskeskuksen puutarhan-tutkimuslaitos suorittaa tarvittavan aitoustestauksen. Sitä varten kasvataan osa ydinkasveista kukinta- ja hedelmävaiheeseen asti ennen kuin niistä annetaan aineistoa viljelijöille.

III Tautitestaukset

1. Yleistä

Taudinaiheuttajia, jotka kulkeutuvat kasvullisen lisäysaineiston mukana ja joiden poistamiseen tervetäimetoiminta pyrkii, ovat:

bakteerit
virukset
viroidit
mykoplasmat
rikettsiat

Bakteerien aiheuttamia tauteja esiintyy meillä perunassa ja eräissä koristekasveissa esim. begonissa ja kukkasipuleissa. Bakteeritaudit aiheuttavat monenlaisia oireita kasveihin. Lehdissä ne aiheuttavat erilaisia laikkuja. Usein laikut ovat rasvaisen tai vetisen näköisiä. Mukuloissa ja kukkasipuleissa ne aiheuttavat pilaantumista, mätämäistä pehmenemistä.

Bakteeritautien toteamiseksi meillä ei ole käytettävissä tehokkaita menetelmiä. Serologiset menetelmät, joita selostetaan myöhemmin, lienevät nopeimpia. Kuitenkin lämpökäsittely, joka annetaan ydinkasviehdokkaille, vaikuttaa joko ehkäisevästi bakteerien kasvuun, niin että meristeemit ovat puhtaita tai toisaalta bakteeritauti saattaa tulla silminhavaittavaksi korkeassa lämpötilassa kasvavassa kasvissa. Bakteeritartunta tulee ilmi viimeistään siinä vaiheessa, kun kantasolukko on siirretty ravintoalustalle. Useimmat bakteerit kasvavat solukkojen ravintoalustoilla ja tulevat siinä esille ja ne tuhoavat solukkopalan.

Mykoplasmat ja rikettsiat ovat bakteereita pienempiä, mutta viruksia suurempia ja rakenteeltaan viruksia monimutkaisempia. Niillä on vaihteleva muoto ja solukalvo. Myös mykoplasmat ja spiroplasmat voidaan poistaa lämpökäsittelyllä ja meristeemikasvatuksilla. Niihin tehoavat myös antibiootit. Niiden esiintyminen kasvissa todetaan samoilla menetelmillä kuin virustautienkin.

Virukset koostuvat lisääntymiskykyisestä nukleinihappo-osasta ja sitä ympäröivästä valkuaiskuoresta. Viroidit ovat muutoin virusten kaltaisia, mutta niiltä puuttuu valkuaiskuori. Siten ne ovat kaikkein pienimpiä taudinaiheuttajia. Viroidien esiintyminen kasvissa todetaan testikasvien tai kemiallisten menetelmien avulla. Viroidien aiheuttamia tauteja tunnetaan vain muutamia.

Virukset, viroidit, mykoplasmat ja rikettsiat aiheuttavat kaikki samantapaisia oireita. Lehdissä esiintyy keltakirjavuutta, joko laikkuina, pisteinä

tai juovina lehtilavassa tai suonia seuraavana keltaisuutena. Kurttuisuutta, kupruilua ja lehtien epämuotoisuutta voi ilmetä. Puiden rungot vääntyilevät, niissä voi olla paksunnoksia, uurteita ja kuoppia. Kitukasvuisuus on tyypillistä sekä virus-, viroidi-, että mykoplasma- ja rikettsia-tauteille. Kaikki aiheuttavat myös keltakirjavuutta lehtiin.

Ydintaimien tuottamisessa on pääasia, että kaikki mahdolliset virus-, viroidi-, mykoplasma- ja rikettsia-taudit tulevat poistetuiksi ydinkasveista. Sensijaan taudinaiheuttajan määrittäminen ei ole välttämätöntä. Koska eräät virukset ja viroidit kestävät lämpökäsittelyn ja voivat esiintyä myös meristeemisoluoloissa, on ydinkasvit testattava huolellisesti ennen kuin niitä käytetään lisäykseen.

Virustautien toteamiseksi kasveissa on olemassa useita menetelmiä, jotka ainakin osittain sopivat myös viroidi-, mykoplasma- ja rikettsia-tautien toteamiseen. Tärkeimmät menetelmät ovat seuraavat:

kasvin taudinkuva, kasvissa esiintyvät oireet,
testi- eli ilmaisinkasvit,
serologiset menetelmät,
elektronimikroskopia,
kemialliset menetelmät.

Monesti tautioireet tulevat esille ydinkasviehdokkaassa sitä sopivissa olosuhteissa kasvatettaessa. Esim. eräät maalevintäiset virukset aiheuttavat oireita herukoissa vain kerran - tavallisesti nuorten pistokastaimien kasvun alkuvaiheissa. Virusten aiheuttamien oireiden ilmenemistä edistää kohtuullinen valaistus, keväällä ja alkukesällä kasvihuone on varjostettava, lämpötila ei saa olla liian korkea, alle + 25 °C. Eräiden lamppujen, esim. Hg-lamppujen sisältämä ultraviolettivalo voi haitata oireiden ilmenemistä. Meristeemistä kasvatettuja ydinkasveja on tarkkailtava pitemmän aikaa, sillä meristeemiin jäänyt pieni virusmäärä voi tarvita usean kuukauden ajan lisääntyäkseen niin paljon, että se aiheuttaa oireita.

Testi- eli ilmaisinkasvit

Monet virukset aiheuttavat vain hyvin heikkoja ja vaikeasti havaittavia oireita tai myöhään ilmaantuvia oireita isäntäkasvissaan. Sopivassa testikasvissa oireet voivat ilmaantua selvinä tai lyhyessä ajassa. Esim. monet omenapuun ja mansikan virukset ovat piileviä tai vähäoireisia, sadon alennus voi olla ainoa oire. Tällaiset virukset todetaan siirtämällä ne herkkään testikasviin. Myös viroidit, mykoplasmat ja rikettsiat voidaan todeta testikasvi-

en avulla.

Testikasveihin taudinaiheuttaja voidaan siirtää eri tavoin. Virukset ja mykoplasmat, jotka eivät siirry kasvimehussa, voidaan siirtää testikasviin ympäriin siinä joko oksa, silmu tai kuoren pala tutkittavasta kasvista.

Monet virukset ja viroidit siirtyvät kasvimehussa. Silloin siirto testikasviin voidaan tehdä puristamalla testattavan kasvin lehdistä mehua, jota sivellään esim. pumpulipäisellä tikulla testikasvin lehdille. Lehtien haavautumiseksi on hyvä niille ripoitella esim. hiomajauhetta (carporundum, karkeusaste 600). Viruksen säilyvyyttä kasvimehussa edistää mehuun lisätty puskurineite. Esim. herukalle voidaan käyttää 2 % nikotiini (emäs) puskuria. Tavallisimpien puskuriliuosten reseptit ovat liitteenä lopussa.

Serologiset menetelmät

Monia viruksia voidaan siirtää viroottisen kasvin lehdistä puritetussa mehussa kasvista toiseen. Nämä virukset voidaan myös puhdistaa kasvin mehusta poistamalla mehusta kasvin aineosat. Jos tällaista puhdistettua virusta ruiskutetaan kaniinin vereen, vereen muodostuu virukselle vasta-aineita. Tällaisen kaniinin veren seerumia voidaan käyttää k.o. viruksen toteamiseen. Jos virotautisen kasvin mehua ja seerumia sekoitetaan keskenään, virus ja seerumissa oleva vasta-aine muodostavat sakan, joka on nähtävissä silmävaraisestikin.

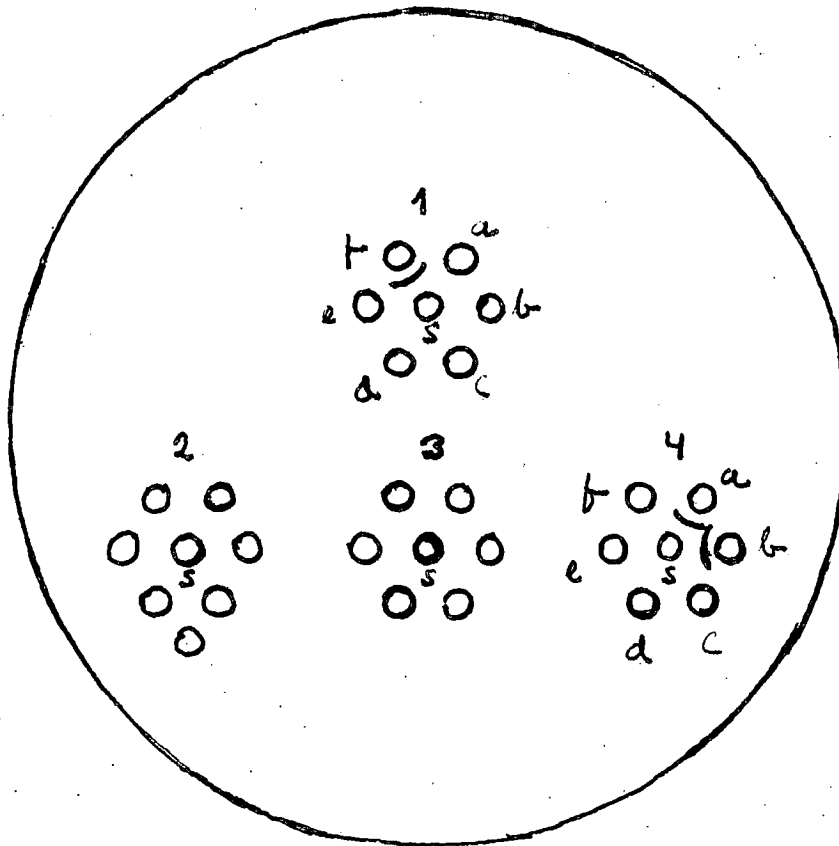
Seerumitestausmenetelmiä on monenlaisia. Käyttökelpoisimpia ovat kaksoisdiffuusiotesti ja ELISA-testi.

Kaksoisdiffuusiotesti voidaan tehdä esim. seuraavasti:

Petrimaljaan valetaan 3-4 mm paksuinen vesi agar-kerrok. Agariin tehdään korkkiporalla kolot, esim. antiseerumia varten keskelle ja sen ympärille kolot virusnäytteitä varten. (Kts. kuva 6). Sekä virus että antiseerumi imeytyvät hitaasti agariin ja kohdatessaan oikean viruksen antiseerumi muodostaa sen kanssa sakkautuman, joka näkyy agarissa vaaleana viiruna. Koska viirun muodostumiseen voi kulua pari päivää aikaa, on agariin hyvä lisätä bakteerien kasvua ehkäisevää natrium-azidea (Na N_3). Agar-seos on siis 1 g bactoagaria + 100 ml puskuroitua suolaliuosta (0.85 % NaCl + 100 ml pH 7 omaavaa fosfaattipuskuria). Hiukan jäähtyneeseen agariin lisätään 0.02 g natriumazidea. Antiseerumeita voi tavallisesti laimentaa jonkun verran (1:4 tai 1:8), samoin myös viruspitoista kasvimehua.

ELISA-testi vaatii jonkun verran enemmän laitteita ja se sopii massatestauk-

KUVA 6. Kaksoisdifфуusion testi.



Keskimmäisissä koloissa (s) eri viruksien antiseerumit. Testattavien kasvien lehtimehua koloissa a,b,c Esimerkkikuvassa on seerumi 1 ja 4 avulla löydetty virus näytteistä f ja a,b.

siin. Elisa-testi on erittäin herkkä, sillä voidaan todeta virus jopa yhdestä levittäjäkirvestä. Elisa-testi perustuu siihen, että viruksen vasta-aine seerumissa leimataan entsyymillä, jonka läsnäolo taas todetaan siihen kiinnittyvällä väriaineella. Viruksen esiintyminen todetaan siten värin muutoksena, keltaisena värinä.

Serologisin menetelmin voidaan siis todeta vain ne virukset, jotka voidaan puhdistaa kasvin mehusta ja joille voidaan valmistaa vasta-aineseerumi.

Elektronimikroskopia

Läpivalaisu- eli transmission elektronimikroskoopin avulla voidaan tarkastella virushiukkasia, mykoplasmoja, rikettsioita ja jopa pelkkiä nukleiinihappoja, siis myös viroideja.

Tässä voidaan käyttää kahta menetelmää. Viroottisen kasvin mehua voidaan siirtää sellaisenaan värjäysaineeseen hilalle, kuparilankaritulalle, jonka päällä on ohut muovikalvo. Hilalla oleva värjätty mehupisara katsotaan elektronimikroskoopissa. Tämä ns. kastomenetelmä on erittäin nopea ja helppo suorittaa. Erittäin hyvä esim. sipulin virusten toteamiseen, joiden testaus on testikasvien avulla hidasta.

Kastomenetelmällä voidaan varmimmin todeta vain sauva- ja lankamaiset virushiukkaset. Pyöreät pallomaiset virukset olisi ensin puhdistettava kasvin aineosista, jotta ne tulisivat selvinä esille.

Toinen tapa on valmistaa jostain kasvinosasta, esim. lehdestä ohut leike. Lehdestä leikataan pieniä 2 x 3-4 mm kokoisia palasia, jotka käsitellään kemikaaleilla, palasten ympärille valetaan muovikerros ja ultramikrotomilla leikataan ohuita leikkeitä. Lehtileikkeitä voidaan tarkastella läpivalaisu- mikroskoopissa. Tällöin nähdään solun osat ja missä virushiukkaset sijaitsevat. Tämä menetelmä on hitaampi ja kalliimpi kuin kastomenetelmä.

Kemialliset menetelmät

Eräiden kasvien viruksen tai mykoplasman infektoima solukko reagoi väriaineisiin niin voimakkaasti, että virustartunta voidaan todeta väriaineilla. Myös viruksen kemiallisten ominaisuuksien avulla voidaan todeta virusinfektio. Kemiallisin keinoin voidaan todeta esim. omenapuun puuosan värjäytymisestä eräs mykoplasmainfektio.

Kemiallisia menetelmiä voidaan käyttää vain harvojen virus-, mykoplasma- tai viroidilajien kohdalla.

2. Tautitestaukset kasvilajeittain

a. Mansikka

Useimmat mansikan virukset, lukuunottamatta ankeroislevintäisiä, 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 kloonveja, joiden nimilyhenteet ovat kansainvälisiä:

- EMK Englannista peräisin oleva *F. vesca*-kloni, joka on altis monille viruksille, esim. läikkä-, kurttu-, suoninauha- ja latentti-C viruksille.
- Fv. 72 on ukrainalainen *F. vesca*-kanta. Se on erittäin herkkä kurttuvirukselle.
- U.C.1 on kloni eräästä *F. vesca* alpiinisestä kannasta. Se osoittaa kurttu- ja keltalaitavirusten oireet erittäin hyvin ja heikommin 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*-kloni, joka on herkkä suoninauha-, keltalaita-, kurttu-, latentti-C ja eräille maalevintäisille viruksille.

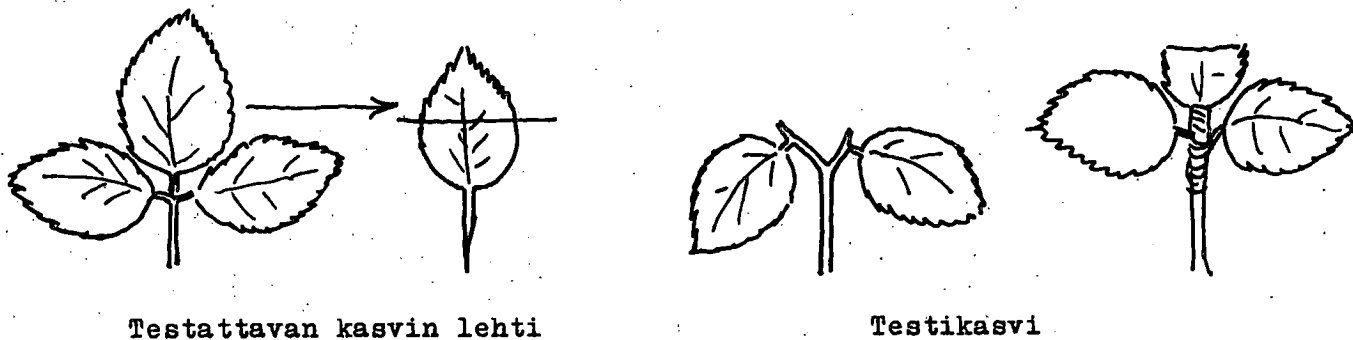
Herkimmiksi meillä ovat osoittautuneet EMK ja Fv-72.

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. Lisäksi testikasvit pidetään muovitelan alla. (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 ankeroislevintäisiä viruksia, joiden oireet ilmenevät joissakin viljellyissä mansikkalajikkeissa ja useimmissa testikasvimansikoissa.

Maalevintäisten virusten läsnäolo voidaan todeta varmimmin tekemällä mehu-

KUVA 7. Mansikan lehdykkäympäys



Testattavan kasvin lehti

Testikasvi

KUVA 8. Herukka- ja vadelmaympäys



Vettä

siirto. Testattavan mansikan lehdet jauhetaan hienoksi 0,2 molaarisen fosfaattipuskurin, pH 7,2 kanssa ja mehulla hierotaan testikasvien lehtiä. Sopivia testikasveja ovat *Chenopodium amarathicolor*, *C. quinoa*, *Nicotiana tabacum* ja *Petunia hybrida*.

b. Herukat ja karviainen

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

Mustaherukkalajike Baldwin on herkkä suoninkatovirukselle. 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 Kasvitautilien 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 asemesta on parasta lisätä lehdistä mehua puserrettaessa niihin 2 % nikotiinia. Testi onnistuu vain käyttämällä mehuksi nuoria lehtiä ja varjostamalla testikasvit, jotka on myös pidettävä viileässä, alle + 25 °C lämpötilassa.

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

Herukoiden ja karviaisen testaus vie pitkän ajan, sillä oireet ilmaantuvat useimmiten vasta seuraavana vuonna. Testikasvit on siksi talvehditettävä viileässä kasvihuoneessa. Lepokauden jälkeen ilmaantuvat oireet, jotka kuitenkin saattavat myöhemmin kesällä hävitä.

c. Vadelma ja mesivadelma

Vadelmassa ja todennäköisesti myös mesivadelmassa esiintyy hyvin monenlaisia virustauteja, joiden testaamiseen voidaan käyttää hyvinkin erilaisia testikasveja. Pelkän virustaudin osoittamiseen ilman viruslajin määrittämistä 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*. Tärkeää on *R. occidentalis*. Nämä testikasvit ovat herkkiä yleisimmille vadelman viruksille. Edellä mainittujen lisäksi voidaan käyttää *R. idaeuksen* lajikkeiden Malling Landmark ja Baumforthin B siemenkasveja.

Virustestaus näihin testikasveihin tehdään ympäällä testattavan kasvin oksa testikasviin samalla tavoin kuin herukallakin. Testikasveja on pidettävä tarkkailtavina noin vuoden ajan, koska useat taudit tulevat esille vasta talvehtimisen jälkeen.

Vadelmassa esiintyy samoja maalevintäisiä viruksia kuin mansikassa ja herukoissa ja testikasvit ovat siten samat. Puskurina on paras käyttää 2 % nikotiinia tai muita pH:ta kohottavia puskureita. Testikasvit on pidettävä yön yli pimeässä ennen ja jälkeen inokulointia ja viileähkössä, + 16-22 °C huoneessa senjälkeen. Kesällä testikasvien pitäminen varjossa on välttämätöntä. Testaus tehdään vadelman nuorista lehdistä kasvukauden alussa.

d. Omena

Omenapuissa esiintyy hyvin monia virustauteja, joiden esiintyminen todetaan testauksissa *Malus*-lajeja ja lajikkeita käyttäen. Kansainvälisen puutarhaseuran (ISHS) hedelmävirustyöryhmä on yhtenäistänyt hedelmäpuiden virustestausta ja heidän suosituksensa mukaan omenapuiden testaukseen käytetään seuraavia useille viruksille alttiita kasveja: *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:

Testattavasta kasvista välitään pitkäkö, monisilmuinen oksa, jonka latvasilmut ympätään siemenkasveihin ja kasvatetaan ydinkasviehdokkaiksi. Loput silmut ja jos ne eivät riitä, silmujen väliset kuoren palat käytetään testauksiin. Tämä sen takia, että virukset ovat jakautuneet epätasaisesti oksiin ja usein latvasilmut ovat terveitä. 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, eräiden

omenissa oireita aiheuttavien virustautien toteamiseksi osaa testikasveja jopa viisi vuotta.

Ulkomailla omenapuun testikasvit on kasvatettu koko testauksen ajan ulkona. Testikasvit eivät kuitenkaan talvehdi meillä ulkona, minkä vuoksi testaus joudutaan tekemään kasvihuoneessa. Latentit virukset tulevat hyvin esille kasvihuoneessa ja jo vuoden kuluessa. Muista viruksista ei ole tietoa. Toisaalta U.S.A:ssa kehitetään kasvihuonetestausta, jossa omenapuita pidetään leikkauksilla pienikokoisina kasvihuoneessa ja tällöin on eräät virukset saatu nopeasti esille. Tätä Fridlundin alkamaa menetelmää täytyy kehittää meillä edelleen. Pienikokoisten testipuiden avulla testaus on saatu tehdyksi sangen pienessä tilassa, minkä vuoksi kasvihuonetestaus ei tule sen kalliimmaksi kuin suuret alat pitkäksi ajaksi sitova kenttätestaus.

Omenapuissa esiintyy myös muutamia mehulevintäisiä viruksia. Ne voidaan todeta tekemällä mehusiirto aivan nuorista lehdistä tai kukkien terälehdistä tai syksyllä kypsistä hedelmistä. Useita erilaisia puskureita voidaan käyttää (kts. liite 1). Mehu valmistetaan viileässä huoneessa, jossa myös inokulointi tehdään.

Sopivia testikasveja ovat kansainvälisen työryhmän suosittamat: *Chenopodium quinoa* ja *Cucumis sativus*. Mehussa siirtyvät virukset voidaan testata myös serologisesti. Elisa-testi on osoittautunut erittäin käyttökelpoiseksi.

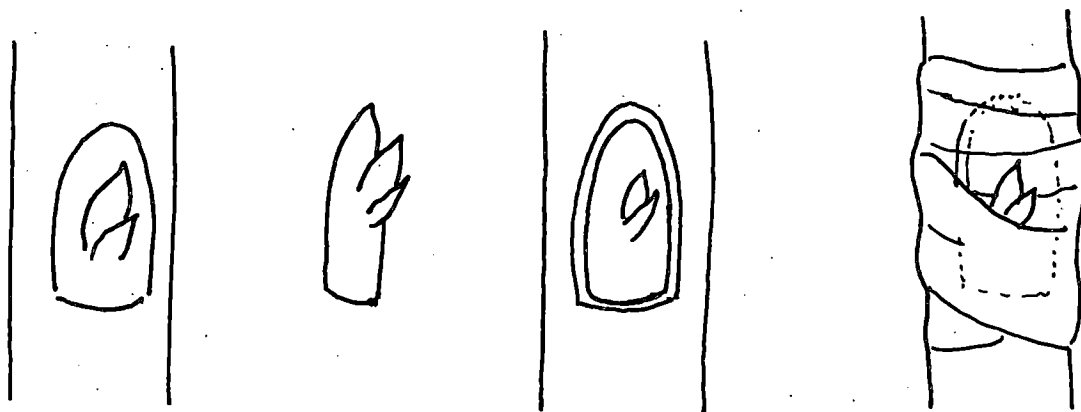
Kirjallisuutta:

- BAUMANN, G. 1972. Wichtige Viruskrankheiten des Kern- und Steinobstes. Der Erwerbsobstbau 14: 177-198.
- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked 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.
- FRIDLUND, P.R. 1980. Glasshouse indexing for fruit tree viruses. Acta Phytopath. Acad. Scien. Hungaricae 15: 153-158.
- FUCHS, E. 1980. Serological detection of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. Acta Phytopath. Acad. Scien. Hungaricae 15: 69-73.
- 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-

s. 313- 327.

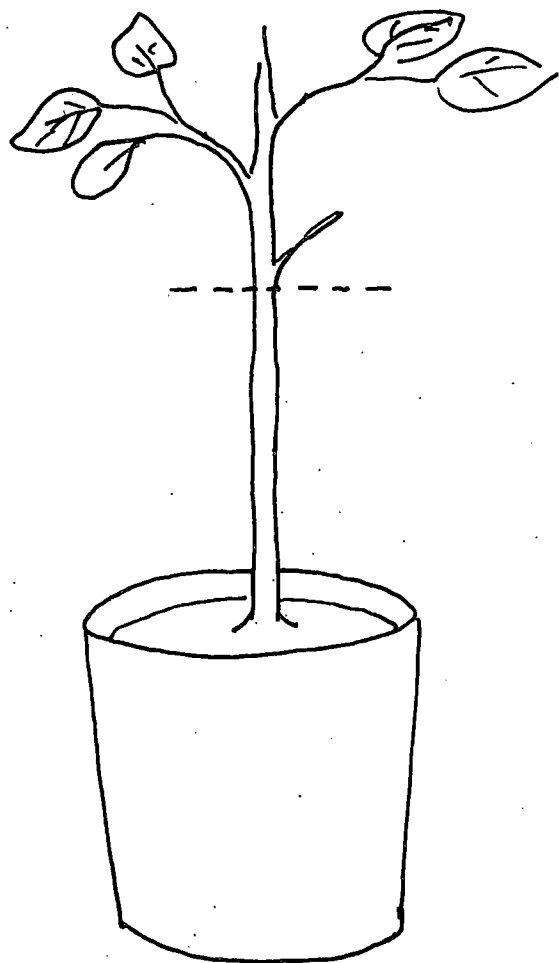
RYDEN, K. 1977. Virus och mykoplasmasjukdomar hos svenska äppelträd.
Växtskyddrap. Trädg. 1. Inst. växt. o. skogskydd. Lantbrukshögskolan,
Uppsala, 45 s.

KUVA 9. Omenan silmuympäys

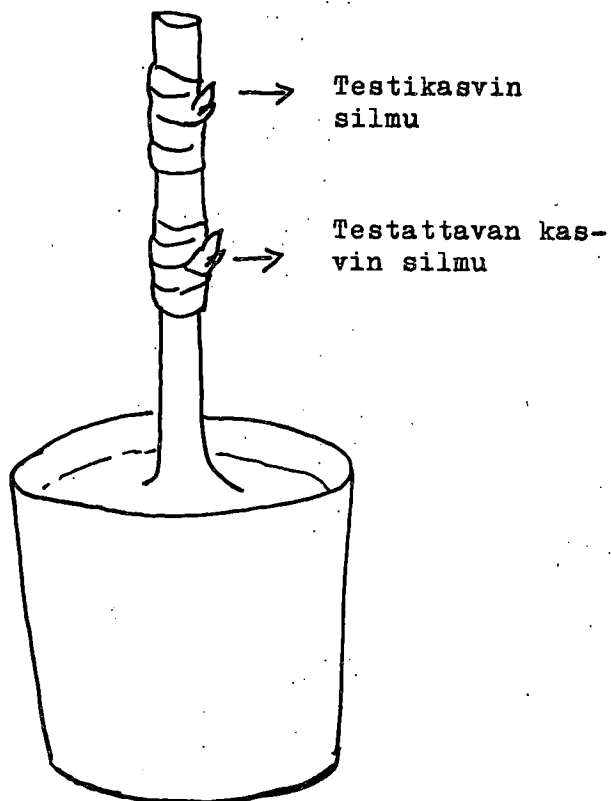


Silmupala leikataan hiukan pienemmäksi kuin kolo, johon se siirretään

Virustestauksissa käytetty kaksisilmuymppäys



Omenapuun siemenkasvi.



Liite 1. Puskuriliuosten valmistusohjeita.

a. 0.1 mol. fosfaattipuskuri pH 7.0

perusliuokset

A = KH_2PO_4 13.609 g/l lB = $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.799 - " -

195 ml A + 305 ml B = 0.1 mol. puskuri pH 7.0

b. 0.01 mol. fosfaattipuskuri

Otetaan 25 ml edellistä 0.1 mol. fosfaattipuskuria ja 225 ml tislattua vettä = 250 ml 0.01 mol. fosfaattipuskuria pH 7.0.

c. 0.2 mol. fosfaattipuskurin valmistus

Perusliuokset

A = 0.5 mol. KH_2PO_4 34.0 g/500 ml vettäB = 0.5 mol. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44.5 - " -

Sekoittamalla alla olevan kaavan mukaiset määrät perusliuoksia ja lisäämällä vedellä 100 ml:ksi saadaan halutun pH:n omaavat puskurit.

	A	B	tislattua vettä
pH	ml	ml	ml
5.8	32.20	2.60	65.20
7.0	8.30	10.60	81.10
7.2	5.66	11.40	82.94
7.6	2.0	13.86	84.14

0.02 molaarisia puskuriliuoksia saadaan ottamalla 0.2 mol. puskuria ja vettä suhteessa 1:10.

d. ditiokarbamaattipuskuri

tislattua vettä 75 ml

 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 863 mg KH_2PO_4 21 "

Na dictylditiokarbamaatti 85 "

NN diphenylthiourea 86 "

coffeini 145 "

Veteen liuotettuna seos säilyy käyttökelpoisena vain 7-10 vrk, mutta kuivat aineet voi säilyttää valmiiksi punnittuina ja sekoittaa veteen tarvittaessa.

Tätä puskuria on käytetty omenapuiden virussierroissa.

e. mercaptoetanolipuskuri

2-mercaptoetanolia (thioethylenglykoll) voidaan sekoittaa 0.02 molaarisena 0.02 mol. fosfaattipuskuriin (pH 7.8). Tätä on käytetty hedelmäpuiden virussierroihin.

f. nikotiinipuskuri

10 ml nikotiinimästä 500 ml vettä pH on noin 8.5.

Varottava, nikotiini on myrkyllistä.

Erytyisesti herukoiden ja vadelmien virusten siirtoon.

Huom.

1-molaarinen liuos sisältää yhden moolin eli molekyylipainon verran ainetta litrassa. Molekyylipainon voi laskea atomipainojen avulla, mutta se on valmiiksi laskettu kemikaalien pakkauksiin.

Molekyylipaino, Mol. Gew. (saksaksi), Mol. Wt. (engl.).

Siten esim. tehtäessä 0.1 molaarinen liuos natriumfosfaatista, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, jonka molekyylipaino on 178, sekoitetaan 1 litraan vettä 17.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Kirjallisuudessa ilmoitetaan esim. kasvuhormonien väkevyydet ppm = miljoonasosa tai μg = mikä on myös miljoonasosa.

esim. 30 mg/l lr = 3 ppm.

