

Metropolia ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Erja Jalo

Kasvatusolosuhteiden vaikutus kaksoisjuoste-RNA-virusten esiintymiseen juurikäävässä

Insinööriyö 5.12.2008

Ohjaajat: tutkija Eeva Vainio

professori Jarkko Hantula

Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vaehri

Metropolia Ammattikorkeakoulu Insinööri­työn tiivistelmä

Tekijä Otsikko	Erja Jalo Kasvatusolosuhteiden vaikutus kaksoisjuoste-RNA-virusten esiintymiseen juurikäävässä
Sivumäärä Aika	69 sivua 5.12.2008
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaajat Ohjaava opettaja	tutkija Eeva Vainio professori Jarkko Hantula yliopettaja Marja Vaheri
<p>Insinööri­työn tarkoituksena oli selvittää, voidaanko juurikääpvirusten puhdasviljelmissä esiintyvien virusten pitoisuutta lisätä. Juurikääpärihmaston puhdasviljelmiä kasvatetaan juurikääpvirusten määritykseen liittyviin tutkimuksiin. Lisääntynyt viruspitoisuus tutkittavassa näytteessä vahvistaisi tutkimustulosten tulkittavuutta ja luotettavuutta, helpottaisi virusten määritystyötä jatkotutkimuksissa ja vähentäisi työstä aiheutuvia kustannuksia.</p> <p>Työssä valmistettiin erilaisia kompleksisia kasvualustoja ja yksi synteettinen kasvualusta, joiden vaikutusta juurikääpärihmaston kasvuun ja viruspitoisuuden muutoksiin tutkittiin. Kasvualustat olivat synteettinen Hagem-agar, kuusenneulasuutetta sisältävä MOS (modified orange serum) -agar, kuusen purua sisältävä MOS-agar ja V8-agar, joka sisältää vihannesmehua. Lisäksi MOS-agarilla kasvatettiin 28 °C:ssa yleensä kasvatuslämpötilana käytetyn 22 °C:n sijaan.</p> <p>Viruksen pitoisuuden toteamiseksi virusperäiset RNA-molekyylit puhdistettiin sienirihmastosta ja muista nukleinihapoista käyttämällä hyväksi kaksoisjuoste-RNA:n spesifistä sitoutumista CF-11-selluloosakuituun. Menetelmä perustuu selluloosakuidun nukleinihappojen affiniteettiin ja 15-prosenttisessä etanolikonsentraatioissa tapahtuvaan kaksoisjuoste-RNA:n adsorptioon. Kaksoisjuoste-RNA-eristysmenetelmään sisältyi mm. solujen rikkominen kemiallisesti ja homogenisaattorilla, puhdistus fenoli- ja kloroformiuutoilla, näytteiden pesu kolonnien läpi pesupuskureilla sekä lopuksi geelielektroforeesiajo.</p> <p>Työn tuloksista ilmeni, että juurikäävän rihmaston kasvua voidaan nopeuttaa ja lisätä käyttämällä sopivaa kasvualustaa sekä lisätä juurikäävän viruspitoisuutta juurikääpärihmastossa. Epäsopiva kasvualusta tai olosuhteet taas heikentävät rihmaston kasvua ja vähentävät viruspitoisuutta.</p> <p>Kasvualustoista parhaimman tuloksen viruspitoisuuden ja juurikääpärihmaston kasvun kannalta antoi kuusenpuru-MOS-agar. Tätä agaria voidaan käyttää jatkotutkimuksissa pienen viruspitoisuuden omaaville juurikääpäkannoille. Tämän työn tulosten valossa myös uusia kasvualustoja tullaan kokeilemaan virussaannon lisäämiseksi juurikääpärihmastossa.</p>	
Hakusanat	juurikääpä, kaksoisjuoste-RNA, virus, kasvualusta, <i>Heterobasidion parvivorum</i>

Author	Erja Jalo
Title	The effect of growth conditions on the occurrence of double-stranded RNA viruses in <i>Heterobasidion sp.</i>
Number of Pages	69
Date	5 December 2008
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructors	Eeva Vainio, Researcher Jarkko Hantula, Professor
Supervisor	Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>The aim of this final year project was to research the possibility of increasing the concentration of <i>Heterobasidion sp.</i> viruses in the fresh cultures of fungal mass. The fungal mass of <i>Heterobasidion sp.</i> is grown for the studies of the <i>Heterobasidion sp.</i> viruses. Increased virus concentration in the sample would confirm the interpretation and reliability of the research results in future.</p> <p>Different kinds of complex mediums and one synthetic medium were prepared to study the influence to growing of fungal mass and concentration of viruses. The mediums were synthetic Hagem-agar, MOS (modified orange serum) –agar with spruce needle-extract, MOS-agar with spruce sawdust and V8-agar with vegetable juice. The growth temperature used in addition in MOS-agar was 28 °C instead of the commonly used 22 °C.</p> <p>To screen the content of <i>Heterobasidion sp.</i> viruses, virus RNA molecules were separated from fungal mass and from other nucleic acids by using specific binding of double-stranded RNA to CF-11-cellulose powder. The CF-11-isolation method is based on the cellulose powder's affinity for nucleic acids and the adsorption of double-stranded RNA at ethanol concentrations of 15 %. Isolation of the double-stranded RNA includes the breaking of cells chemically and by homogenizator, cleaning with phenol-chloroform extractions and washing in columns with buffers. In the end there was a gel electrophoresis.</p> <p>It is possible to speed and raise the growth of <i>Heterobasidion sp.</i> fungal mass and increase the concentration of <i>Heterobasidion sp.</i> viruses by using a proper medium. It was shown that improper medium or conditions will weaken the growth of fungal mass and reduce the amount of viruses.</p> <p>The best result with virus concentration and with the growth of <i>Heterobasidion sp.</i> fungal mass was given by MOS-agar with spruce sawdust. This agar can be used as a medium for <i>Heterobasidion sp.</i> species with low virus concentration. As a result of this final year project, also new mediums will be tested to gain even higher virus concentration in the <i>Heterobasidion sp.</i> fungal mass.</p>	
Keywords	<i>Heterobasidion sp.</i> , double-stranded RNA, virus, growth medium, <i>Heterobasidion parviporum</i>

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

1 Johdanto	5
2 Kirjallisuusosa.....	7
2.1. Juurikäätä.....	7
2.1.1 Kuusenjuurikäätä <i>Heterobasidion parviporum</i>	9
2.1.2 Juurikäävän esiintymiseen vaikuttavat kasvupaikkatekijät	11
2.1.3 Juurikäävän torjunta	12
2.2 Juurikäävän virus	16
2.2.1 Mykrovirukset	16
2.2.2 Juurikäävän virusten kaksoisjuoste-RNA:n eristys	18
2.2.3 Kaksoisjuoste-RNA-liuosten viruspitoisuuden arviointi	20
2.3 Kasvualustat.....	20
2.3.1 Kasvumaljakokeeseen valittujen kasvualustojen käyttö eri tutkimuksissa ..	22
3 Materiaalit ja menetelmät	23
3.1 Työn kulku.....	23
3.2 Kasvualustojen valmistus	25
3.3 Kaksoisjuoste-RNA-eristys CF-11-selluloosakuidulla ja elektroforeesiajo.....	29
4 Tulokset.....	34
4.1 Juurikäävän kasvatuskokeiden tulokset.....	34
4.1.1 Hagem-agar.....	35
4.1.2 Kuusenpuru-MOS-agar.....	39
4.1.3 Kuusenneulasuute-MOS-agar	44
4.1.4 MOS-agar 28 °C.....	47
4.1.5 V8-agar	50
4.2 Kasvualustojen virussaannon vertailu.....	54
5 Yhteenveto	63
Lähteet	65

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin Metsäntutkimuslaitoksen (Metla) metsäpatologian laboratoriossa Vantaan Jokiniemessä. Metla on maa- ja metsätalousministeriön alaisuudessa toimiva valtion tutkimuslaitos. Sen tehtävänä on edistää metsien taloudellisesti, ekologisesti ja sosiaalisesti kestävää hoitoa ja käyttöä tutkimuksen keinoin. Toiminta-ajatuksena on rakentaa metsäalan tulevaisuutta tuottamalla ja välittämällä tietoa sekä osaamista yhteiskunnan parhaaksi.

Tämä opinnäytetyö liittyy Suomen Akatemian rahoittamaan tutkimushankkeeseen, jossa selvitetään juurikääpävirusten ekologiaa ja evoluutiota. Juurikääpä kuuluu kaikkein yleisimpiin ja suurinta tuhoa aiheuttaviin lahottajasieniin koko maailmassa. Suomessa juurikääpä on taloudellisesti merkittävin puiden lahovikojen aiheuttaja. Juurikääpä leviää itiöiden avulla tuoreisiin puun leikkauspintoihin tai puiden välisten juuriyhteyksien kautta terveisiin puihin. Kesäaikaiset hakkuut ja mahdollisesti myös ilmaston lämpeneminen vaikuttavat juurikäävän leviämiseen Suomessa yhä laajemmalle.

Yli sadalla sienilajilla on havaittu esiintyvän kaksoisjuoste-RNA-genomin omaavia mykovirusia. Osa mykovirusista ei aiheuta havaittavia muutoksia isäntäänsä, mutta on myös löydetty mykovirusia, joiden vaikutus isäntänsä fenotyyppiin vaikuttaa hyödylliseltä tai muistuttaa enemmän tautia. Näitä kaksoisjuoste-RNA-virusia etsitään myös juurikäävistä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, voidaanko juurikäävän puhdasviljelmissä esiintyvien virusten määrää lisätä. Työn käytännön tavoitteena on tuottaa menetelmä, jonka avulla virusten havaitsemista ja eristämistä voitaisiin tehostaa. Työssä pyritään löytämään virusta sisältävän kuusenjuurikäävän kasvatukseen sopiva ravintoalusta, jolla tutkittavan kuusenjuurikäävän sienirihmaston kasvunopeutta, määrää ja erityisesti virusten pitoisuutta käävän rihmastossa saataisiin lisättyä.

Lisääntynyt viruksen määrä tutkittavassa näytteessä vahvistaisi tutkimustulosten tulkittavuutta ja luotettavuutta, helpottaisi virusten määrittelyä ja vähentäisi työstä aiheutuvia kustannuksia.

Juurikäpärähmaston viruspitoisuus on merkittävä tekijä kaksoisjuoste-RNA-tutkimusten tulosten kannalta. Liian alhainen viruspitoisuus voi estää kaksoisjuoste-RNA-virusten havaitsemisen ja hankaloittaa viruksen sekvenssin määrittelyä. Tässä työssä arvioidaan, paljonko kaksoisjuoste-RNA:ta saadaan eristettyä eri kasvualustoilta.

2 Kirjallisuusosa

2.1. Juurikäpä

Juurikäpä on maailman havumetsien vahingollisimpia tuhosieniä [13]. Se on levinnyt pohjoisten havumetsien kylmimpiä osia ja trooppisia alueita lukuun ottamatta kaikkialle maailman metsiin. Juurikäpä on lahottajasieni, joka voi käyttää useita eri kasvilajeja ravinnokseen. Sitä on tavattu yli 180:lla eri puu- tai kasvilajilla. Tärkeimpiä juurikäpäsienen isäntiä ovat havupuut, mutta se voi aiheuttaa tautia myös lehtipuissa.[16, s. 136.] Euroopassa yksi kaikkein tuhoisimpia havupuiden tauteja on juurikäävän aiheuttama laho. Sen aiheuttama taloudellinen menetys Euroopassa arvioidaan olevan vuosittain 800 miljoonaa euroa [2, s. 395].

Suomessa esiintyy kaksi juurikäpäalajia, P-tyyppiä eli männynjuurikäpä *Heterobasidion annosum* ja S-tyyppiä eli kuusenjuurikäpä *Heterobasidion parviporum* [16, s.136]. Tyyppin kirjain ilmaisee juurikäävän isäntälajia, P (pine) mäntyä ja S (spruce) kuusta [21, s. 11].

Kuusenjuurikäävän esiintyvyys on Suomessa männynjuurikäpää yleisempää. Männynjuurikäpä aiheuttaa tyvitervastautia mäntyihin, jonkin verran kuusentyvilahoa ja lisäksi lahottaa monia muita puulajeja. Kuusenjuurikäpä aiheuttaa kuusentyvilahoa eli maannousemaa. [16, s.136; 18.] Etelä-Suomessa juurikäävän kuusille aiheuttamista vaurioista noin 90 % on kuusenjuurikäävän ja 10 % männynjuurikäävän aiheuttamaa [3, s. 30].

Juurikäpä leviää puiden välisten juuriyhteyksien kautta tai ilmavintäisten itiöiden avulla [13]. Pääasiallisesti tartunta tapahtuu kantaitiöiden avulla tuoreisiin kantopintoihin sekä juurien tai rungon tuoreisiin vaurioihin [2, s. 397]. Juuriston kautta juurikäpä voi tarttua hyväkuntoisiin puihin [2, s. 398; 13]. Sienen leviäminen juuriyhteyksien kautta sairastuneen puun juurista terveeseen puuhun on paljon hitaampaa kuin levintä itiöllisenä tartuntana [18].

Itiöitä on kahta tyyppiä, kantaitiöitä ja juurikääpärihmastosta kasvavien kuromankannattimien muodostamia kuromaitiöitä [16, s. 138; 18]. Kääpämäisiä itiöemiä esiintyy sairaiden tai kuolleiden puiden tyvillä, juurien alla tai laho-onkaloissa. Juurikääpärihmaston kuromankannattimia muodostuu lahojen puiden tuoreisiin leikkaus- ja murtopintoihin kostealla säällä, kuten lahojen myrskyn kaatamien kuusten runkoihin. Kesäaikaiset hakkuut synnyttävät kuromien kehitykselle sopivia kantopintoja, jos puut ovat jo sienien saastuttamia. [16, s. 138.]

Itiöllinen levintä tarvitsee tapahtuakseen tuoreen puun leikkaus- tai murtopinnan [10, s.387; 18]. Tuore kantopinta on altis juurikääpärtartunnalle muutamien viikkojen ajan kaadon jälkeen [37, s. 15]. Tuoreelle puun pinnalle laskeuduttuaan itiö kasvattaa rihmastoa [4].

Itiöitä muodostuu ja leviää tuulen mukana koko sulan maan ajan. Runsaimmin itiöitä muodostuu ja vapautuu ilman ollessa kostea. Itiöt saastuttavat tuoreita puun leikkauspintoja lämpimän säätyypin vallitessa, mutta talvella itiötartuntaa ei tapahdu. Kesähakkuut edistävät sienien leviämistä terveisiin metsiköihin ja sairaissa metsiköissä ne lisäävät sienten määrää.[16, s. 138.]

Juurikääpärtartunnan saanut metsä tartuttaa mitä todennäköisimmin myös seuraavia puusukupolvia. Juurikääpärtartuntoja voidaan vähentää tekemällä hakkuut talvella, käsittelemällä kannot biologisella tai kemiallisella torjunta-aineella tai poistamalla kannot hakkuun jälkeen [37, s. 15.] Juurikääpä voi säilyä vanhoissa kannoissa lisääntymiskykyisenä vuosikymmenten ajan [2, s. 398; 3, s. 30; 35, s.40].

Koska juurikääpä on taloudellisesti merkittävin puiden lahovikojen aiheuttaja Suomessa, on erittäin tärkeää saada tarkempaa tietoa sen käyttäytymisestä ja mahdollisuuksista tehostaa sen torjuntaa. Talousmetsissä juurikääpä on vaikea ongelma, jonka torjunta ja leviämisen estäminen tulee ottaa vakavasti huomioon.

2.1.1 Kuusenjuurikäpä *Heterobasidion parviporum*

Kuusenjuurikäpä *Heterobasidion parviporum* on lahottajasieni, joka aiheuttaa kuusiin kuusentyvilahoa eli maannousemaa [16, s. 140]. Etelä-Suomessa kuusentyvilaho on pahin kuusten lahon aiheuttaja [3, s. 30].

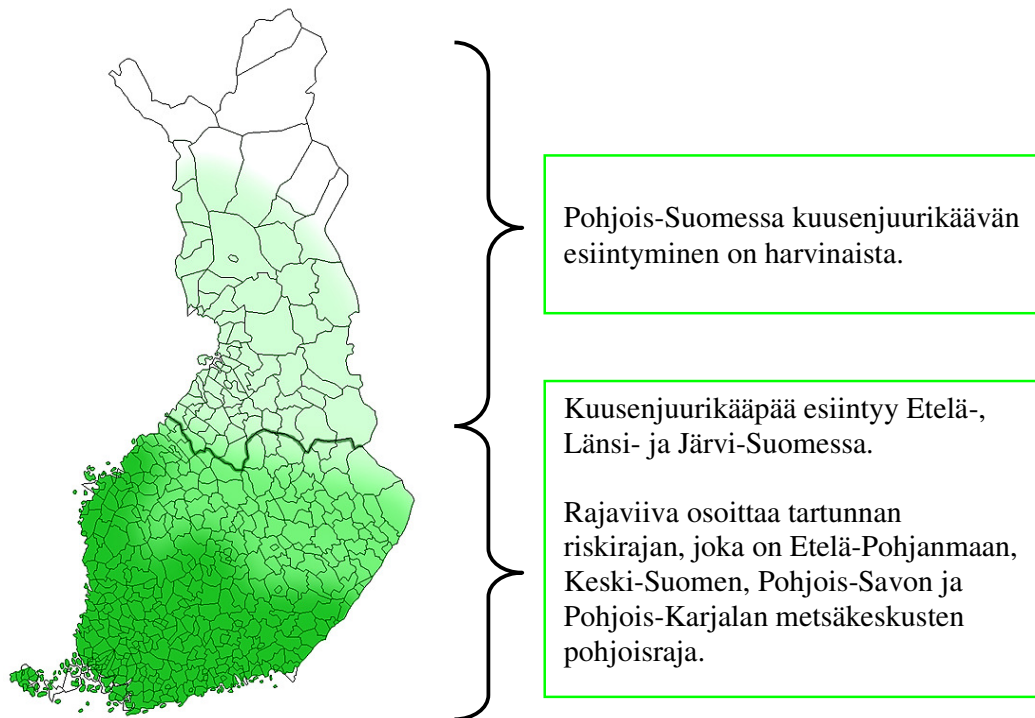
Kuusentyvilaho alkaa elävissä puissa kuolleeseen sydänpuuhun tai syvälle pintapuuhun ulottuvista vaurioista. Laho valtaa ensin sydänpuun rungon tyvessä ja etenee sitten vähitellen ylemmäs ja laajemmalle rungossa. Laho voi levitä kuusen rungossa noin 20 cm vuodessa. [16, s. 140.] Kuusentyvilaho vähentää kuusten kasvua ja altistaa niitä tuulen aiheuttamille vaurioille [3, s. 30]. Kuvassa 1 kuusentyvilaho on vaurioittanut kuusen sydänpuuta ja juuristoa.



Kuva 1. Kuusenjuurikäävän aiheuttama tyvilaho aiheuttaa vaurioita puun arvokkaaseen tyviosaan. [19]

Tyvilaho voi ulottua sydänpuussa jopa 12 m korkeuteen kantoleikkauksesta [13; 16, s. 140]. Ensisijaisesti juurikäpäsieni hajottaa puun sisältämää ligniiniä [13]. Lahoamisen edistyessä puu menettää kiinteytensä ja rungosta tulee vähitellen ontto, kun hajottamisprosessiin tulee mukaan muitakin organismeja juurikäävän lisäksi. [16, s. 140.]

Kuusenjuurikäätä on levinnyt Etelä- ja Länsi-Suomen kuusikoihin, joissa suurimmat tuhot sijaitsevat [3, s. 30; 13]. Pahimmilla tuhoalueilla jopa 30 %:lla hakkuukypsistä puista on tyvilahoa [17, s. 179; 35, s. 12]. Järvi-Suomessa kuusenjuurikäätä esiintyy paikoitellen ja Pohjois-Suomessa harvinaisena vain rehevimmillä kuusen kasvupaikoilla, kuva 2 [13].



Kuva 2. Kuusenjuurikäävän levinneisyys. Suurimmat kuusenjuurikäävän aiheuttamat tuhot sijaitsevat kuvan tummanvihreällä alueella Etelä- ja Länsi-Suomen kuusikoissa. [13, muokattu]

Lahovikaisten puiden erottaminen metsässä on vaikeaa, koska pystyissa ei ole varmasti lahon ilmaisevia oireita [13; 35, s. 40]. Juurikäätätartunnan saanut kuusi voi elää vuosikymmeniä ulkoisesti täysin oireettomana [13].

Kuusenjuurikäävän tuntomerkkejä ovat kuusen kantojen juurenniskan alapuolelle, onttojen kantojen onkaloihin, tuulen kaatamien kantojen juurakoihin sekä metsään jätettyjen puun runkojen alapinnoille ja poikkeuksellisesti tyvilahojen pystypuiden kuolleisiin juuriin kehittyvät käävät. Itiömät kasvavat pinnanmyötäisesti juurten

alopinnoilla ja ovat yleensä piilossa sammalten alla. Itiöemän yläpinta on ruskea ja pillipinta on kermanvalkoinen, kuten kuvassa 3, tai kuivana vaaleanruskea. [35, s. 40.]



Kuva 3. Kuusenjuurikäpiä hakkuualalle jätetyn lahon puunrungon pinnalla, kun rungon maata vasten ollut osa on käännetty ylös. [18]

Kuusenjuurikäpä leviää kanta- ja kuromaitiöiden sekä rihmaston välityksellä. Ilman lämpötilan ollessa yli 5 °C kantaitiöt ja kuromat tartuttavat puiden juuriston vioituksia tai tuoreita kantopintoja. Rihmasto tartuttaa kannon tai sen juurien kautta elävien puiden juuria. [35, s. 40-41.]

2.1.2 Juurikäävän esiintymiseen vaikuttavat kasvupaikkatekijät

Lahottajasienten kasvun minimitekijä on yleensä puun alhainen typpipitoisuus. Keski-Euroopassa voimakkaan tyvilahotartunnan on todettu liittyvän mangaanin, typen ja raudan puutteeseen [16, s. 144]. Juurikäävää ei esiinny happamilla mailla, joissa maan pH on alle 3. Keinoalustoilla kasvatettaessa juurikäävän kuromien muodostus on ollut voimakkainta pH:n ollessa 3,5 – 4,5. Kuromien muodostusta on saatu lisättyä vähentämällä ravinteiden määrää kasvualustalla. Saksassa on havaittu, että juurikäävällä on happamille ja vähemmän happamille maille sopeutuneet variaatiot. Rihmaston kasvun pH-optimit näille variaatioille keinoalustoilla olivat n. 4 ja 5-6. [16, s.143-144.]

USA:ssa kuivilla kasvupaikoilla juurikäpää on esiintynyt kosteita kasvupaikkoja runsaammin. Ajoittain kuivuudesta kärsivät juuret voivat olla jatkuvasti vesitaloudeltaan kunnossa olevia juuria alttiimpia tartunnalle. Kuitenkin sekä alhainen että korkea vesipotentiaali vähensivät kuusenjuurikäävän tartuntaa ja rihmaston kasvua kuusen taimille tehdyissä kasvatuskokeissa. [16, s. 144]

Koska ravinteiden ja taudin suhteet vaihtelevat liiaksi tapauskohtaisesti, mitään yleispätevää johtopäätöstä ravinteiden vaikutuksesta tyvilahon esiintymiseen ja kuusenjuurikäävän kasvuun ei voida tehdä. [16, s. 144] Niiden perusteella ei voida selvästi lähteä kehittämään kasvatusolosuhteita juurikäävän kasvulle edulliseen suuntaan laboratoriossa.

2.1.3 Juurikäävän torjunta

Kemikaalien käyttö kasvien patogeenien torjuntaan on lisääntynyt viimeisten 20 -30 vuoden aikana. Ympäristöystävällisempien torjuntamenetelmien käyttö olisi kuitenkin toivottavampaa. Maanviljelyssä ja metsätaloudessa käytetäänkin nykyisin kasvitautien torjumiseen useita biologisia menetelmiä. Uusien biologisten ja ympäristöystävällisten torjuntamenetelmien löytämiseksi on kuitenkin vielä mahdollista tehdä paljon työtä. [9, s.7.]

Juurikäävän torjuntaan on testattu useita eri kemikaaleja. Käytetyt kemikaalit voidaan jakaa sienille myrkyllisiin tai juurikäävän kilpaileville sienille hyödyllisiin kemikaaleihin. Paras kemikaali juurikäävän torjuntaan on urea. [37, s. 15.]

Biologiseen juurikäävän torjuntaan on testattu lukuisia sieniä niiden antagonismin ja kilpailukyvyyn suhteen männynjuurikäpää *Heterobasidion annosum s.l.* vastaan. [37 s. 15-16; 40, s. 441-456.] Nykyisin ainoastaan harmaaorvakkasienen *Phlebiopsis gigantea* itiöitä käytetään juurikäävän biologiseen torjuntaan kaupallisessa mittakaavassa [37, s. 15-16].

Biologinen torjunta

Organismin esiintyvyys tietyllä kasvupaikalla määräytyy osittain sen ekologisesta vuorovaikutuksesta toisten, usein kilpailevien organismien kanssa. Tämä mahdollistaa kilpailevien organismien käytön patogeenien biologisessa torjunnassa. *Heterobasidion annosumin* ja muiden juurikäpien tapauksessa metsän syntyperäinen patogeeni stimuloituu metsänhoidollisista töistä. Puiden kaataminen luo juurikäävän itiöille poikkeuksellisen tiheän levintäpintojen määrän. Tämä johtaa myöhemmin lahojen pystypuiden korkeaan määrään. [8, s. 235.]

Kemialliset tai biologiset kantokäsittelyt puiden kaadon yhteydessä vähentävät juurikäävän leviämistä ja tukkipuun hävikkiä. Biologiset torjunta-aineet ja niiden hajoamistuotteet ovat biohajoavia. Useimmiten enemmän kuin yksi geeni on osallisena biologista torjuntakeinoa käytettäessä. Vaikutus on tällöin pysyvä, koska organismin täytyisi mutatoitua vaikutuksen neutraloimiseksi. [8, s. 235.]

Biologisten torjuntakeinojen haittapuolina ovat mahdolliset sivuvaikutukset, kuten ilmaston vaikutus sen toimintaan. Mahdollisia sivuvaikutuksia voi myös esiintyä organismeille, jotka eivät ole torjunnan kohteena. Biologisten torjuntakeinojen asianmukainen käsittely vaatii enemmän tietoa kuin kemikaalien käyttö, ja niiden säilyvyysaika on rajallinen. [8, s. 235.]

Sienien viruksissa on potentiaalia biologiseksi torjuntakeinoksi kasvitauteja vastaan [22, s. 378]. Mykoviirukset siirtyvät lajien välillä rajatusti, joten todennäköisesti muut kuin kohdelajit eivät vahingoittuisi biologisessa torjunnassa. Nykyisin vain muutamia mykoviiruksia hyödyntäviä biologisen torjunnan keinoja tunnetaan, kuten hypoviirukset kastanjansurman *Cryphonectria parasitica* torjunnassa. [9, s. 27.] Tätä tautia on saatu heikennettyä tartuttamalla sienten hypoviiruksia tautia sairastavaan kastanjaan. Useat eri hypoviruslajit voivat vaikuttaa *Cryphonectria parasitica*an eri tavoin. Ilmiötä kutsutaan hypovirulenssiksi. [20, s. 27.]

Heterobasidion annosumista on esitetty että mykovirus joka vähentäisi sen kasvua jo juurikäätartunnan saaneilla alueilla, olisi merkittävä lisä juurikäävän biologiseen torjuntaan [10, s. 388].

Juurikäävän torjuntakeinot

Juurikääpä aiheuttaa laatutappioita metsän omistajille ja metsäteollisuudelle heikentämällä metsien terveyttä. Juurikäävän lahottamat puut eivät kelpaa tukkipuiksi, vaan niitä käytetään energian tuottamiseen ja sellun valmistukseen. Etelä-Suomessa noin joka kahdeksas kuusi on sairastunut juurikäävän aiheuttamaan tautiin. [4.]

Koska juurikääpä tartuttaa puita myös seuraavassa sukupolvessa, torjunnassa on erittäin tärkeää estää juurikäävän leviäminen alueille, joissa sitä ei ole vielä esiintynyt. Torjunnalla voidaan vähentää tuhoja jo saastuneilla alueilla. Jollei torjuntaa tehosteta, tuhot lisääntyvät vuosittain ja juurikäävän esiintymisalue leviää yhä pohjoisempaan.[4.]

Tuoreiden kantopintojen kautta tapahtuva juurikäävän leviäminen voidaan estää tekemällä hakkuut marras-huhtikuun aikana lämpötilan pysyessä alle 5 °C:ssa, tai käsittelemällä tuoreet kannot harmaaorvakan itiösuspensiolla tai 30-prosenttisella urealiuoksella [35, s. 43]. Havupuiden kantojen suojaamiseksi torjunta-ainekäsittely tehdään yleensä hakkuukoneeseen liitetyllä lisälaitteella. Torjunta-aine voidaan levittää myös manuaalisesti ruiskulla tai sivelemällä torjunta-ainetta kannon pintaan välittömästi kaadon jälkeen tai viimeistään kolmen tunnin kuluessa kaadosta.[13.]

Kestävän metsätalouden rahoituksesta annetun lain (n:o 1094/1996) 23. pykälän toisen momentin mukaisesti yksityisille metsänomistajille voidaan korvata juurikäävän torjunta-ainekustannuksia vastaava määrä sekä levityksestä aiheutuviin kustannuksiin kasvatushakkuissa 0,44 €/m³ ja uudistushakkuissa 0,22 €/m.[13.]

Urea

Urean vesiliuos levitetään hakkuun yhteydessä kannolle. Kannossa oleva ureaasi-entsyymi hajottaa levitetyn urean ammoniakiksi ja hiilidioksidiksi. pH-arvo nousee kannon pinnalla yli 7:ään, kun ammoniakki yhtyy vetyionien kanssa ammonium-ioniksi. Juurikäpä ei kasva näin korkeassa pH:ssa, jolloin tuoreen kannon pinnalle muodostunut kate estää juurikäpäpartunnan kanton. [13.]

Urea on lievästi myrkyllinen kemikaali. Valtaosa kantojen ympärillä olevista kasveista, joille urealiuosta roiskuu kantokäsittelyn yhteydessä, kuolee. Kasvillisuus palautuu ennalleen muutamassa vuodessa. Ureakäsittely muuttaa sienilajistoa niin, että lahottajasienet vähenevät ja eräät homeet lisääntyvät. [13.]

Rotstop®-kantokäsittelyaine

Biologinen Rotstop®-kantokäsittelyaine on ympäristöystävällinen kotimainen tuote. Rotstop sisältää kuusenjuurikäävän luonnollisen kilpailijan, harmaaorvakkasienen (*Phlebiopsis gigantea*) itiöitä, joiden avulla juurikäävän leviämistä voidaan estää harvennuksissa ja päätehakkuissa. [4.]

Harmaaorvakka asuttaa tuoreen kantopinnan ja estää siten juurikäpäitiöiden pääsyn kanton. Rotstop estää myös juurikäävän leviämistä juuriston kautta, koska harmaaorvakka kasvaa syvemmälle kanton ja rajoittaa juurikäävän leviämistä kannon juuristossa. [4; 13.]

Harmaaorvakka ei tartu kasvaviin puihin, eikä se pysty syrjäyttämään juurikäpäpuusta, jonka juurikäpä on jo tartuttanut. Rotstopin tehoon vaikuttava tekijä kuusen kannoissa on riittävä harmaaorvakan itiömäärä kannon pinnalla. Käsittelyn teho saattaa alentua, jos kuusen kannolle laskeutuu poikkeuksellisen paljon juurikäävän itiöitä (enemmän kuin yksi juurikäpäitiö kymmentä orvakkaitiota kohti). Tämä on kuitenkin Suomen oloissa poikkeuksellista. [13.]

Rotstop-valmisteeseen pääkomponentti harmaaorvakka on myrkytön, metsissä yleisesti kasvava sieni. Muut komponentit ovat elintarvikelaatua olevia suoja-aineita.

Harmaaorvakkakäsittelyllä ei ole kantojen ulkopuolelle ulottuvia vaikutuksia.

Harmaaorvakan käyttö juurikäävän torjuntaan kantokäsittelyssä mukaileekin luonnon omaa torjuntakeinoa. Käyttäjille ei ole osoitettu terveydellisiä haittoja. [13.]

2.2 Juurikäävän virus

Ensimmäinen sieniä infektoiva virus löydettiin herkkusienestä *Agaricus bisporus*, jota oli jo satojen vuosien ajan kasvatettu ravinnoksi. 1940-luvulla näistä sieniviljelmistä löydettiin La Francen tauti, jonka huomattiin olevan tarttuvaa. Vasta yli kymmenen vuotta taudin havaitsemisen jälkeen kasvivirotologi Holling osoitti viruspartikkelien olemassaolon taudin tartuttamissa herkkusienissä. [9, s. 8.]

Syy myöhäisille sienten virusten löydöksille voi olla se, että useimmissa sienissä esiintyvät mykovirukset eivät aiheuta havaittavia muutoksia isäntiinsä toisin kuin eläinten, kasvien ja bakteerien virukset [9, s. 9]. Sienten soluissa ei tavata luonnostaan kaksoisjuoste-RNA:n suuria molekyyliä. Siksi kaksoisjuoste-RNA:n esiintymisen sienissä katsotaan johtuvan virusinfektiosta. [10, s. 387.] Mykovirusten löytymisen jälkeen on selvinnyt, että sienissä esiintyy mykovirusia yleisesti [6, s. 119; 9, s. 9; 28, s. 37].

2.2.1 Mykovirukset

Mykovirusia tavataan yli sadalla eri sienilajilla [10, s. 387]. Valtaosa mykoviruksista on genomiltaan kaksoisjuoste-RNA-virusia [6, s. 119-120; 22, s. 377; 28, s. 38].

Vaikka monilla mykoviruksilla ei ole havaittavaa vaikutusta isäntäänsä [6, s. 119-120; 10, s. 387; 33, s. 9], on myös tehty havaintoja, joissa jotkin mykovirukset aiheuttavat muutoksia isäntänsä fenotyyppiin. Jotkin näistä muutoksista vaikuttavat olevan hyödyllisiä isännälleen, kun taas toiset muutoksista muistuttavat enemmän tautia. [33, s. 9.]

Mykovirusten taksonomia

Virusten genomi voi olla rakentunut erityyppisistä nukleiinihapoista, toisin kuin elävien solujen genomi, joka sisältää aina kaksoisjuoste-DNA:ta. Tämä on tärkeä tekijä viruksia luokiteltaessa. [9, s. 9.] Virusten genomi voi olla rakentunut yksijuosteisesta tai kaksijuosteisesta DNA:sta tai RNA:sta [9, s. 9; 33, s. 9]. Yksijuosteinen-RNA voidaan jakaa vielä sen koodausominaisuuden mukaan plus- tai miinusmerkkiseksi [7, s. 293; 9, s.9].

Modernin virusten taksonomisen luokittelun mukaan seitsemän virusperheen ja yhden luokittelemattoman viruslajin virukset infektoivat sieniä. Näitä mykovirusperheitä ovat *Hypoviridae*, *Partitiviridae*, *Totiviridae*, *Barnaviridae*, *Narnaviridae*, *Metaviridae* ja *Pseudoviridae*. *Rhizidiovirus* kuuluu luokittelemattomaan viruslajiin. Useat mykovirukset kuuluvat virusperheisiin *Partitiviridae* ja *Totiviridae*, joilla on oireeton virusinfektio isäntäänsä. [9, s. 9-10.]

Hypoviridae-virusperhe ei sisällä varsinaisia viruspartikkeleita. Genomi muodostuu yhdestä lineaarisesta kaksoisjuoste-RNA-segmentistä, jonka koko on 9-13 kep. Monia tämän virusperheen jäseniä on tunnistettu, mutta toistaiseksi hypovirusia on löydetty ainoastaan *Cryphonectria paracitica*. [9, s. 9; 33, s. 11.] Se aiheuttaa kastanjan versosurmaa [20, s. 87; 33, s.11].

Partitiviridae-virusperheen genomi muodostuu kahdesta lineaarisesta kaksoisjuoste-RNA-segmentistä, jotka ovat yleensä samankokoisia [9, s. 9; 33, s. 10]. Genomin koko on 4-6 kep. Tämä virusperhe infektoi kasveja ja monia eri sienilajeja. [9, s. 10.] Juurikäävän virukset kuuluvat *Partitiviridae*-virusperheeseen [38].

Totiviridae-virusperheellä viruspartikkelit ovat isometrisiä ja genomi muodostuu yksittäisestä lineaarisesta kaksoisjuoste-RNA-molekyylistä. Kooltaan genomi on 4-7 kep. *Totiviridae*-virusperheen jäsenet infektoivat sieniä ja alkueläimiä. [9, s. 10; 33, s. 10.]

Barnaviridae-virusperheen genomi muodostuu lineaarisesta +-merkkisestä yksijuosteisesta RNA-molekyylistä. Genomin koko on 4.0 kep. [9, s. 10; 33, s. 12.] Virus löydetään usein herkkusienistä La Francen taudin yhteydessä, vaikka se ei olekaan tämän taudin pääaiheuttaja [9, s. 10].

Narnaviridae-virusperheeltä puuttuvat viruspartikkelit. Genomi muodostuu yksittäisestä lineaarisesta molekyylistä, joka koostuu yksijuosteisesta RNA:sta tai kaksijuosteisesta RNA:sta. [9, s. 10; 33, s. 11.] Genomin koko on 2-3 kep [9, s. 10].

Metaviridae- ja *Pseudoviridae*-virusperheen jäsenet ovat morfologialtaan huonosti luokiteltuja retrotransposoneja. Niiden genomi muodostuu +-merkkisestä yksijuosteisesta RNA:sta, jonka koko on *Metaviridae*-virusperheellä 4-10 kep ja *Pseudoviridae*-virusperheellä 5-8 kep. *Metaviridae*- ja *Pseudoviridae*-virusperheet infektoivat sieniä, kasveja ja selkärangattomia. [9, s. 10; 33, s. 12.] *Pseudoviridae*- ja *Metaviridae*-virusperheiden pääasiallinen ero on niiden genomin toiminnassa [33, s. 12].

Rhizidiovirusta ei ole luokiteltu mykovirusiin kuuluvaksi. Viruspartikkelit ovat isometrisiä ja genomi rakentuu yksittäisestä molekyylistä lineaarista kaksoisjuoste-DNA:ta. [9, s. 10; 33, s. 12.] Genomin koko on 27 kep. [9, s. 10].

Monia tunnistettuja mykovirusia ei ole luokiteltu eri mykovirusperheisiin. Näillä mykovirusilla on usein kaksoisjuoste-RNA-genomi ja isometriset viruspartikkelit. [9, s. 10; 33, s. 13.]

2.2.2 Juurikäävän virusten kaksoisjuoste-RNA:n eristys

Ensimmäiset havainnot sienten viruksista tai viruksen oloisista partikkeleista tehtiin käyttämällä elektronimikroskooppia. Menetelmän yksinkertaisuudesta huolimatta väärintulkitseminen on mahdollista isäntälajin rakenteiden voidessa muistuttaa viruksen näköisiä partikkeleita. Elektronimikroskooppiset tutkimukset edellyttävät suhteellisen korkeaa viruspitoisuutta, joten pienillä pitoisuuksilla tutkittaessa viruspartikkeleita voi

jäää havaitsematta. [9, s. 18; 33 s. 9.] Myös muissa virusten havaitsemiseen käytetyissä menetelmissä virusten konsentraatio voi olla pienempi kuin valitun menetelmän havaitsemistaso edellyttää [9, s. 18].

Nykyisin viruksia etsitään sienistä useimmiten eristämällä niistä kaksoisjuoste-RNA [9, s. 18; 33, s. 9]. Tällöin nukleiinihapot eristetään ja kaksoisjuoste-RNA erotetaan muista nukleiinihapoista [9, s. 18]. Kaksoisjuoste-RNA-eristys voidaan toteuttaa käyttämällä spesifisiä sidosominaisuuksia omaavia eri selluloosatyyppisiä tai eristämällä kaksoisjuoste-RNA litiumkloridilla [9, s. 18; 10, s. 387-388; 33, s. 9].

Virusperäinen kaksoisjuoste-RNA voidaan puhdistaa muista nukleiinihapoista sitomalla se selluloosakuituun. Menetelmä perustuu selluloosakuidun nukleiinihappojen affiniteettiin ja spesifisemmin 15 %:ssa etanolikonsentraatiossa tapahtuvaan kaksoisjuoste-RNA:n adsorptioon. Tässä etanolikonsentraatiossa kaksoisjuoste-RNA on ainoa nukleiinihappojen pääryhmä, joka liittyy selluloosakuituun. Menetelmä soveltuu pienien näytemäärien (1-10 g) kaksoisjuoste-RNA-eristykseen suoraan virusinfektoituneesta isäntäkasvista. [24, s. 854.] 100 mg CF-11 selluloosakuitua voi absorboida jopa 5 µg kaksoisjuoste-RNA:ta [32].

Nykyinen kaksoisjuoste-RNA-eristysmenetelmä antaa tietynsuuntaisen yleisen kuvan virusten esiintymisestä sienissä, koska kaikkia virustyyppisiä ei pystytä tällä eristysmenetelmällä havaitsemaan. [33, s.9.]

Elektroforeesi

Elektroforeesi on menetelmä, jota käytetään biomolekyylien koon ja varauksen perusteella tapahtuvaan erotukseen. Molekyylit kulkevat elektroforeesijossa kiinteässä väliaineessa sähkövirran vaikutuksesta vastakkaisesti varattua napaa kohti. Kaikki nukleiinihapot ovat negatiivisesti varautuneita rakenteessaan esiintyvän fosfaattiryhmän takia. [31, s. 72; 32, s. 178 -179.] Sen vuoksi nukleiinihappojen elektroforeettinen erottelu perustuu niiden kokoon [27].

Fluoresoivaa etidiumbromidia (EtBr) eli etidiumionia käytetään geelin käsittelyyn nukleiinihappovärjäyksissä. Se tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin, jolloin erottuneet nukleiinihapot näkyvät etidiumbromidilla värjättyssä geelissä UV-valossa oranssinkeltaisina juovina. [31, s. 72.]

Virusperäisiä partikkeleita tutkittaessa nukleiinihappojen preparaattien laadulla on hyvin suuri merkitys geelielektroforeesijon juovien onnistumiseen. Fenoli- ja happoyhdisteiden korkeat konsentraatiot voivat häiritä kaikkien nukleiinihappojen esiintymistä. Siksi eristykseen käytettävien liuosten tulee olla oikein valittu juuri tietyille tutkimuksen kohteena olevalle materiaalille. [29.]

2.2.3 Kaksoisjuoste-RNA-liuosten viruspitoisuuden arviointi

Geelielektroforeesilla voidaan analysoida näytteen konsentraatiota, koska suurempi pitoisuus synnyttää vahvempana näkyvän juovan. Juovat jakaantuvat elektroforeesijon aikana kokonsa mukaiseen järjestykseen, jolloin pienimmät molekyylit kulkeutuvat geelissä pisimmälle.

Nukleiinihappoliuosten pitoisuuden arviointiin käytetty yleinen menetelmä on laimennossarjan ajaminen näytteestä agarosigeelillä ja juovien fluoresenssin voimakkuuden vertaaminen tunnetun standardin vastaaviin. Menetelmä ei kuitenkaan epätarkkuutensa vuoksi ole varsinainen mittausta, vaan arviointi. Tarkkuutta voidaan lisätä digitaalisella kuvankäsittelyllä tai juovien intensiteetin mittaamisella densitometrillä. [31, s.67.]

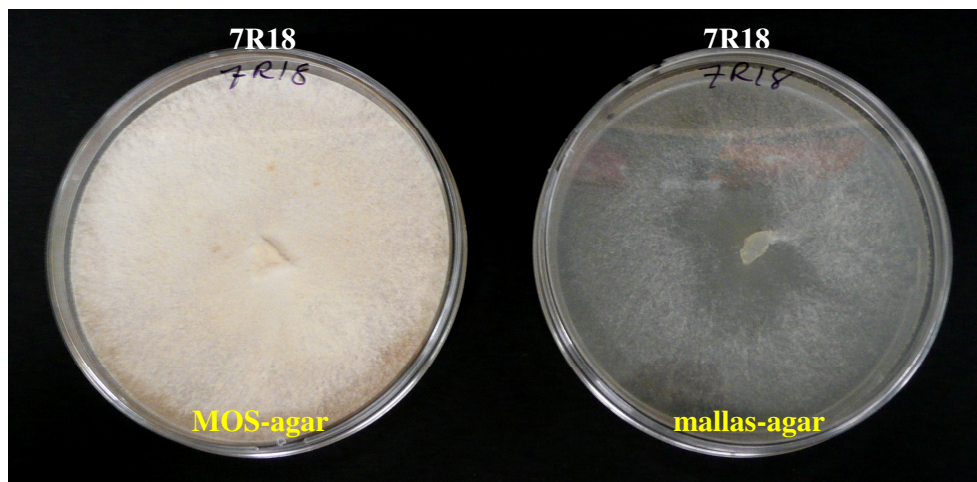
2.3 Kasvualustat

Mikrobiologisissa laboriokasvatuksissa käytetään koostumukseltaan erilaisia kasvualustoja. Kasvualustat voidaan jakaa niiden rakenteen perusteella jähmeisiin tai nestemäisiin kasvualustoihin. Jähmeistä kasvualustoista yleisimpiä ovat agaria sisältävät kasvualustat. [30, s. 56.] Juurikäypään liittyvissä tutkimuksissa käytetään yleensä agaria sisältäviä kasvualustoja [38].

Synteettisten ravintoalustojen kaikki ravinnekomponentit tunnetaan kemiallisesti tarkoin, kun taas kompleksisten ravintoalustojen tarkka kemiallinen koostumus on tuntematon. Kompleksisten ravintoalustojen aineosia voivat olla erilaiset proteiinien tai muiden biologisten materiaalien hydrolyysituotteet [30, s. 56]. Tässä työssä kasvualustojen pääraaka-aineina on käytetty agarin lisäksi kuusenleulasuutetta, kuusen purua ja vihannesmehua.

Tutkimusten onnistumisen kannalta kasvualustan sopivuus on erittäin merkittävää. Epäsopivalla kasvualustalla organismi voi kasvaa hitaasti, kitukasvuisesti tai jopa tuhoutua. Tutkimukselle suotuisa kasvumalja voi taas tuoda esiin muuten vaikeasti havaittavia ominaisuuksia.

Kuvassa 4 on sienikannan 7R18 samaan aikaan siirrostettuja kasvustoja erityyppisillä kasvualustoilla. MOS (modified orange serum) -agar-maljalla kasvu on tiheää, kun taas mallas-agar-maljalla kasvu on harvaa. Sopivan kasvualustan valinnalla voidaan mahdollisesti vaikuttaa juuri haluttuihin kasvussa esiintyviin ominaisuuksiin.



Kuva 4. Juurikäpäkannan 7R18 rihmaston kasvua eri kasvatusmaljoilla kasvatusajan ollessa sama. Kuvassa vasemmalla MOS-agar-malja, jossa rihmaston kasvu on tiheää, ja oikealla mallas-agar-malja, jossa rihmaston kasvu on hyvin harvaa.

2.3.1 Kasvumaljakokeeseen valittujen kasvualustojen käyttö eri tutkimuksissa

METLAssa on juurikäypään liittyvissä tutkimuksissa käytetty pääosin mallas-agar-maljoja biologisten lajiryhmien kasvulliseen erotukseen ja MOS-agar-kasvumaljoja nukleiinihappojen eristämiseen [38]. MOS-agaria on esim. käytetty kasvualustana tutkimuksessa, jossa selvitettiin sienten steroli- ja rasvahappoprofiileja [25, s. 98].

Ruotsalaiset tutkijat ovat käyttäneet Hagem-agaria kasvualustana tutkiessaan kaksoisjuoste-RNA:n siirtymistä juurikäävällä [11, s. 147-149]. Kaksoisjuoste-RNA:n siirtymistä *Heterobasidion annosumini* sienirihmastosta toiseen tai suvullisiin itiöihin on tutkittu myös Hagem-agar-alustalla [12, s.150].

Purua sisältävää agaria on käytetty aikaisemmin esimerkiksi *Lentinula edodes*-sienen luokittelua, molekyylien kloonausta ja differentiaalisia lakkaasigeenien ekspressioanalyysijä tutkittaessa [41, s. 4908]. Myös *Ophiostoma setosum*-sientä on tutkittu käyttäen ravintoalustana purua sisältävää agaria [36, s. 486].

Kuusenneulasuutetta sisältävää agaria on puolestaan käytetty esim. useiden *Rhizosphaera kalkhoffii*-isolaattien rihmaston kasvun lämpötila- ja pH-vaatimusten tutkimiseen [14, s. 37]. *Lophodermium*-sienilajien tutkimuksissa METLAssa on käytetty kuusenneulasuutetta sisältävää Hagem-agaria ja mallas-agaria *Lophodermium*-isolaattien kasvun tutkimiseen eri lämpötiloissa [15, s. 4-5].

V8-vihannesmehu on sienillä yleisesti käytetty rikas kasvualusta, joka sisältää ravinteita monipuolisesti. V8-vihannesmehu sisältävää agaria on käytetty kasvualustana esim. tutkittaessa *Fusarium proliferatum*-isolaattien mykotoksiinin tuotantoa riisissä [1, s. 99]. *Cryptococcus neoformans* MATa-feromonigeenin eristämistä ja karakterisointia on myös tutkittu käyttämällä V8-vihannesmehua sisältävää agaria yhtenä tutkimuksen kasvualustana [23, s. 936].

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Työn kulku

Kaksoisjuoste-RNA-eristysmenetelmällä [10, s.388-389; 24, s.854-855; 32, s.198-199] voidaan määrittää, sisältääkö juurikäävän rihmasto kaksoisjuoste-RNA-virusia.

Hankaluutena eristysmenetelmässä on, että eri juurikäpäkantojen rihmastojen kasvatusajat vaihtelevat ennen tutkimuksiin riittävän kasvuston saamista jopa useita viikkoja. Myös sienirihmaston kasvustojen laadulla on ollut eri juurikäpäkantojen välillä huomattavia eroja. Toiset juurikäpärihmastot kasvavat samalla kasvuajalla hyvin harvaksi ja kevyeksi rihmastoksi, kun taas toiset tiheiksi ja painaviksi.

Tässä työssä valmistettiin erilaisia kompleksisia kasvualustoja ja yksi synteettinen kasvualusta, joiden haluttiin lisäävän ja nopeuttavan kuusenjuurikäävän kasvua.

Kasvualustat olivat synteettinen Hagem-agar ja kompleksiset kuusenneulasuutetta sisältävä MOS-agar, kuusen purua sisältävä MOS-agar ja V8-agar, joka sisältää vihannesmehua. Lisäksi MOS-agarilla kasvatettiin 28 °C:ssa yleensä kasvatuslämpötilana käytetyn 22 °C:n sijaan.

Uusilla kasvualustoilla haluttiin myös vaikuttaa juurikäpävirusten pitoisuutta lisäävästi. Runsaampi näytemäärän saanto ja korkeampi viruspitoisuus vähentäisi tarvittavan työn, kemikaalien ja laitteiden käytön määrää ja näin ollen vähentäisi työstä aiheutuvia kustannuksia. Eristystyössä esiintyviä virhetekijöitä voitaisiin saada minimoitua suuremman viruspitoisuuden ansiosta.

Tähän työhön ei löydetty lähteeksi tutkimuksia, joissa olisi tutkittu kasvualustojen vaikutuksia juurikäpärihmaston kasvuun. Luetuissa lähteissä oli käytetty erilaisia kasvualustoja erityyppisissä sienien tutkimuksissa. METLAn juurikäpä tutkimuksissa käytetty MOS-agar valittiin standardiksi, jonka antamaa viruspitoisuutta käytettiin tämän opinnäytetyön uusien kasvualustojen vertailuun.

Ruotsissa juurikäpätutkimuksiin käytettyä Hagem-agaria haluttiin verrata kasvatusominaisuuksiltaan muihin kasvualustoihin.

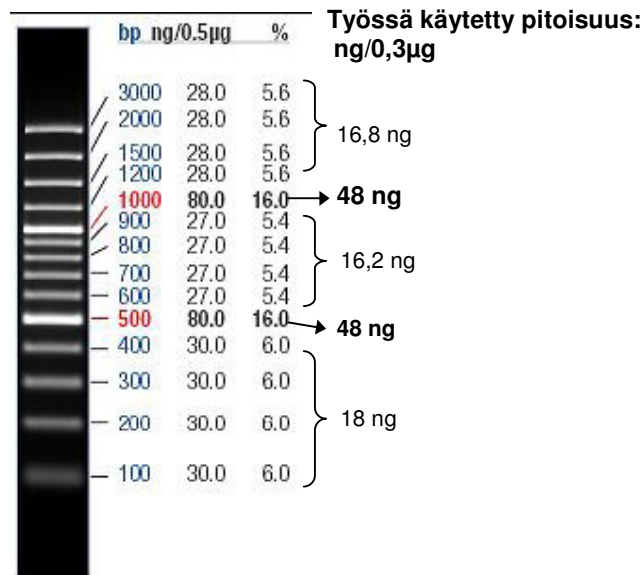
Kuusenpurua yhdistettiin tässä työssä MOS-agariin, koska juurikäpä lahottaa puuta käyttäen sitä ravinnokseen. Puusta sahattu puru vastaa siten juurikäävän luontaista ravintoa ja voisi mahdollisesti vaikuttaa suotuisasti juurikäpärihmaston kasvuun kasvumaljalla.

Juurikäävän isäntäkasvista eristetty neulasuute voisi vaikuttaa juurikäävän kasvuun suotuisasti, ja siitä valmistettiin kuusenneulasuute-MOS-agaria. Vihannesmehun käytön agarin osana arveltiin voivan sisältää juurikäpärihmaston kasvua stimuloivia ravinteita tai kasvin osia. Siten työssä valmistettiin vihannesmehua sisältävää agaria.

Kasvumaljakokeessa haluttiin myös tutkia kasvatuslämpötilan vaikutusta juurikäävän rihmaston kasvuun. Rajallisen ajan vuoksi työhön valittiin MOS-agarilla 28 °C:ssa kasvatus yleensä kasvatuslämpötilana käytetyn 22 °C:n lisäksi.

Tämän työn kasvatuskokeilla seurattiin, miten uusi kasvualusta vaikutti käpärihmaston kasvuun ja siinä esiintyvien kaksoisjuoste-RNA-virusten määrään. Kaksoisjuoste-RNA:n eristykseen käytettiin CF-11-selluloosakuitua. Kokostandardina (std) oli Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, USA).

Kokostandardin juovien kokoa verrataan kaksoisjuoste-RNA-eristyksen geielektroforeesijon juoviin, jolloin voidaan arvioida näytteen pitoisuutta. Kuvassa 5 on kokostandardi, jonka juovien koot ovat 100- 3000 ep. Vastaavasti pitoisuus voidaan arvioida samoista juovista, jolloin pitoisuus on 27- 80 ng/ 0,5µg. Tässä työssä kokostandardin juoviin käytettiin konsentraatiota 0,3 µg/µl. Kuvassa 5 on lueteltu työssä käytetyn konsentraation antamat pitoisuudet 16,2- 48 ng/0,3µg.



Kuva 5. Kokostandardin juovia voidaan käyttää RNA:n koon ja pitoisuuden arvioimiseen. Vahvempi juova ilmaisee suurempaa kokoa tai vahvempaa pitoisuutta. [5, muokattu]

Työssä käytettiin myös Lambda-sarjaa (Lambda DNA N3011S, New England BioLabs Inc., USA) juovien pitoisuuksien arviointiin. Lambda DNA on lambda bakteriofaagin genomista eristettyä DNA:ta, josta on tehty laimennossarja. Lambda-sarjan juovat osoittavat pitoisuuksia 5, 10, 20, 40, 80 ja 160 ng.

3.2 Kasvualustojen valmistus

Kasvualustat valmistettiin elatusainekeittimessä AES Laboratoire 98000. Keitin kuumentaa, sekoittaa, autoklavoi ja jäädyttää agarin haluttuun lämpötilaan. Elatusainekeittimen tulostin tulostaa keiton aikana tapahtuvat lämpötilan muutokset paperille.

Autoklavoinnin jälkeen elatusainekeitin jäädyttää agarin haluttuun lämpötilaan, jolloin maljojen valu voidaan aloittaa. Petrimaljoille valettiin 37 g agaria maljalle, minkä jälkeen maljojen annettiin jäähtyä ja jähmettyä. Maljoille tiivistyvän kosteuden annettiin kuivua ennen jähmettyneiden maljojen pakkaamista pusseihin. pH mitattiin indikaattoripaperilla.

Kaikille kaksoisjuoste-RNA-eristykseen käytettäville maljoille laitettiin sellofaanikelmu (400 P, Visella Oy), joka estää agarin irtoamisen kaavittavan näyterihmaston mukaan. Agar häiritsee kaksoisjuoste-RNA-eristyksen tuloksia.

Juurikäpäkantojen rihmastoja säilytettiin ennen kasvumaljakokeiden suorittamista mallas-agarilla. Tässä työssä mallas-agaria ei käytetä varsinaisissa kasvatuskokeissa, mutta se on mukana kasvumaljojen viruspitoisuuden vertailussa.

Hagem-agar

0,49 %	C ₆ H ₁₂ O ₆	
0,05 %	NH ₄ NO ₃	
0,05 %	KH ₂ PO ₄	
0,05 %	MgSO ₄	
0,49 %	mallasuute	(Bacto™ malt extract) (Difco, USA)
1,46 %	agar	(Bacto™ Agar) (Difco, USA)
97,42 %	vesi	

Hagem-agar valmistettiin elatusainekeittimessä, jossa se autoklavoitiin 20 min 120 °C:ssa. Autoklavoinnin jälkeen 48 °C:n Hagem-agar valettiin petrimaljoihin, 37 g agariala maljalle. Valettujen maljojen annettiin jäähmettyä 30 min, jonka jälkeen ne siirrettiin jäähtymään. Hagem-agarin pH oli 6.

MOS-agar

2,84 %	appelsiiniagar	(Orange serum agar) (Difco, USA)
0,76 %	mallasuute	(Bacto™ Malt extract) (Difco, USA)
0,76 %	dekstroosi	(Difco™ Dextrose) (Difco, USA)
0,85 %	agar	(Bacto™ Agar) (Difco, USA)
94,79 %	vesi	

MOS-agar valmistettiin elatusainekeittimessä, jossa se autoklavoitiin 15 min

121 °C:ssa. Autoklavoinnin jälkeen 48 °C:n MOS-agar valettiin petrimaljoihin, 37 g agaria maljalle. Valettujen maljojen annettiin jäähmettyä 30 min, jonka jälkeen ne siirrettiin jäähtymään. MOS-agarin pH oli 6.

Kuusenpuru-MOS-agar

5 %	kuusen puru	kuorittu kuusi, hienojakoinen sahajauho
2 %	vesi	
93 %	MOS-agar	

Kuusenpuru-MOS-agar valmistettiin punnitsemalla erlenmeyerpulloon 100 g kuusenpurua. Koska puru oli kevyttä ja ilmavaa, valmistukseen käytettiin 2 l:n erlenmeyerpulloa, jotta agar saataisiin sekoitettua hyvin tilavuudeltaan suurelta näyttävään purumäärään. Puruun lisättiin 50 ml tislattua vettä, ja se autoklavoitiin 120 °C:ssa 20 min.

MOS-agar valmistettiin erikseen elatusainekeittimessä, koska puru olisi voinut tukkia annosteluletkun kärjen tai syöttöputken. Agaria ei valmistettu suoraan purua sisältävään erlenmeyerpulloon, koska haluttiin nähdä, miten suurelta vaikuttava purumäärä saataisiin sekoitettua tasaisesti agariin ja kuinka juoksevaa siitä tulisi. Elatusainekeittimessä erikseen valmistettua agaria voitaisiin tarvittaessa lisätä liian paksulta vaikuttavaan puru-MOS-agariin.

Autoklavoituun puru-erlenmeyerpulloon lisättiin MOS-agaria elatusainekeittimestä, jonka jälkeen agaria sekoitettiin. Puru saatiin sekoitettua melko hyvin agariin, josta tuli helposti juoksevaa. Koska agarissa oli kuitenkin selviä purupaakkuja, päätettiin lisätä agaria 2 l:n merkkiin asti. Purupaakut saatiin sekoittumaan agariin, jota oli myös helppo valaa. Puru-MOS-agarin pH oli 5.

Kuusenneulasuute-MOS-agar

Kuusenneulasuute

33 %	kuusenneulasia
67 %	tislattu steriili vesi

Kuusenneulasuute-MOS-agaria varten valmistettiin kuusenneulasista uutetta, joka lisättiin elatusainekeittimessä valmistettuun MOS-agariin. Kuusenneulasuute valmistettiin riipimällä tuoreista kuusen oksista neulasia 150 g, jotka murskattiin tehosekoittimessa veden kanssa. Tislattua steriiliä vettä lisättiin 300 ml.

Neulaset murskautuivat melko hienoksi massaksi. Tästä puristettiin neste harsokankaan läpi ja jaettiin saatu vihreä neste 100 ml:n näyteputkiin ja sentrifugoitiin 10 000 x g, 15 min ajan. Saatu kirkas, hieman kellertävä supernatantti suodatettiin 1 µm:n suodattimella steriiliin pulloon ja vielä 0,2 µm:n suodattimella uuteen steriiliin pulloon.

Kuusenneulasuute-MOS-agar

10 %	kuusenneulasuute
90 %	MOS-agar

MOS-agar valmistettiin elatusainekeittimessä ja jäähdytettiin 50 °C:seen, jolloin kuusenneulasuute lisättiin elatusainekeittimessä olevaan agariin. Agar valettiin petrimaljoille. Kuusenneulasuute-MOS-agarin pH oli 6. Valmiit maljat säilytettiin jääkaappilämpötilassa.

V8-agar

9 %	V8® Vegetable Juice (Campbell Grocery Products LTD, Englanti)
0,2 %	CaCO ₃
1,3 %	agar (Bacto™ Agar) (Difco, USA)
89,5 %	vesi

V8-agar valmistettiin käyttämällä V8-vihannesmehua, joka sisältää tomaattia, porkkanaa, selleriä, punajuurta, persiljaa, lehtisalaattia, vesikrassia ja pinaattia sekä suolaa ja mausteita. Agaria autoklavoitiin 20 min 120 °C:ssa ja valettiin petrimaljoille. V8-agarin pH oli 6,5.

2 % Mallas-agar

1,45 %	agar	
1,93 %	mallasuute	(Bacto™ Malt extract) (Difco, USA)
96,6 %	vesi	

Mallas-agar valmistettiin elatusainekeittimessä autoklavoimalla 20 min 120 °C:ssa. Autoklavoinnin jälkeen 48 °C:n mallas-agar valettiin petrimaljoihin, 37 g agaria maljalle. Valettujen maljojen annettiin jähmettyä 30 min, jonka jälkeen ne siirrettiin jäähtymään. Mallas-agarin pH oli 6.

3.3 Kaksoisjuoste-RNA-eristys CF-11-selluloosakuidulla ja elektroforeesiajo

Reagenssit

Kaksoisjuoste-RNA-eristys

- ionivaihdettu steriloitu vesi
- 5 M natriumkloridiliuos
- fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholi (25:24:1)
- 99,5-prosenttinen etanoli
- kuitumainen selluloosavalmiste (CF-11) (Whatman International Ltd, Englanti)
- kloroformi-isoamyylialkoholi (24:1)
- tris-EDTA-natriumdodekyylisulfaatti-merkaptetanoli-puskuri: 1000 mM tris-HCl, 500 mM EDTA, 20 % natriumdodekyylisulfaatti, 100 % 2-β-merkaptetanoli (lyysipuskuri)

-tris-natriumkloridi-EDTA-etanoli-puskuri: 10 mM tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 15 % etanoli (pH 8,0)(TSE-EtOH-puskuri)

-tris-natriumkloridi-EDTA-puskuri: 1 M tris-HCl, 3 M NaCl, 500 mM EDTA (pH 8,0)(TSE-puskuri)

Geelielektroforeesi

-1 % agarooosi (SeaKem LE Agarose) (Promega Corporation, USA)

-1 % Synergel (Synergel Agarose clarifier Additive)
(Diversified Biotech, USA)

-etidiumbromidi

-tris-HCl-EDTA-liuos: 6 mM tris-HCl, 1mM EDTA (TE)

-tris-asetatti-EDTA-puskuri: 400 mM tris-asetatti, 10 mM EDTA (pH 8)
(1x TAE-puskuri)

- Ficoll® 400-EDTA- bromofenolinsininen-ksyleenisyanoli-liuos: 20 % Ficoll® 400 polymeeri (Sigma Aldrich, USA) 20 mM EDTA, 0,05% bromofenolinsininen, 0,03 % ksyleenisyanoli (TD)

-kokostandardi (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder) (Fermentas, USA)

-Lambda-sarja (Lambda DNA N3011S)
(New England BioLabs Inc., USA)

Laitteet

Kaksoisjuoste-RNA-eristys

- homogenisaattori (ULTRA-TURRAX® TP-18/10) (Janke and Kunkel GmbH Co KG IKA-Werk, Saksa)

- sekoitin (Vortex -Genie 2) (Scientific Industries Inc. USA)

- sentrifugi (Megafuge 1.0) (Heraeus Instruments, Saksa)

- pöytäsentrifugi (Eppendorf Centrifuge 5417 D) (Eppendorf, Saksa)

Geelielektroforeesi

- ajoallas
- virtalähde
- UV-pöytä (Spectroline Ultraviolet Transilluminator)
(Spectronics Corporation, USA)
- videotulostin (Mitsubishi P66E) (Sonar Oy)

Työn suoritus

50 ml:n näyteputket punnittiin ja numeroitiin. Haluttu näytemäärä kaavittiin agar-maljoilta näyteputkiin spaattelilla. Kaksoisjuoste-RNA:n eristys sienirihmastosta aloitettiin solujen mekaanisella ja kemiallisella hajotuksella. Sulatettua lyysipuskuria pipetoitiin 2,5 ml:aa näyteputkiin. Näyte-lyysipuskuriseos homogenisoitiin mekaanisesti homogenisaattorilla. Homogenisaattorin terä pyörii suurella nopeudella rikkoen näytteen solut ja homogenisoi näytteen turbulenssin vaikutuksesta. Rikkoutumatta jääneet solut erotettiin myöhemmin sentrifugoimalla.

Fenoli-kloroformiuutto

RNA:ta eristettäessä näyte täytyy puhdistaa proteiineista. Fenoli ja kloroformi ovat orgaanisia liuottimia, jotka eivät hajota nukleiinihappoja, mutta saostavat ja denaturoivat proteiineja. Käytettävän fenolin tulee olla nukleiinihappolaatua tai vähintään uudelleentislattua ja Tris-puskurilla tasapainotettua. Kloroformiin sekoitetaan isoamyylialkoholia vaahtoamisen estämiseksi. [26.]

Homogenisoituun näytesuspensioon pipetoitiin 3 ml fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholia ja sekoitettiin Vortexilla 2 minuutin ajan fenolin ja kloroformin sekoittumisen edistämiseksi vesiliuokseen. Syntyvässä emulsiossa fenoli ja kloroformi pääsevät kosketuksiin vesiliuoksessa olevien proteiinien kanssa saostaen ne [26]. Sentrifugoitiin 30 min ajan nopeudella 2500 x g, jolloin fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholi laskeutui putken pohjalle alafaasiksi.

Sentrifugoiduista näytteistä pipetoitiin nukleinihappoja sisältävä yläfaasi 1,5 ml:n numeroituihin eppendorffputkiin, noin 1 ml näytettä / putki. Saostuneet proteiinit kerrostuivat faasien rajapinnalle.

Koska fenoli inhiboi entsyymejä, seuraavat uutot tehtiin kloroformilla fenolin jäämien poistamiseksi [26]. Näyteputkiin pipetoitiin 200 µl kloroformi-isoamyylialkoholia ja sekoitettiin Vortexilla 2 min ajan. Näytettä sentrifugoitiin pöytäsentrifugilla 3 min ajan nopeudella 14 000 x g.

Sentrifugoiduista näytteistä pipetoitiin yläfaasi uusiin eppendorffputkiin ja lisättiin 30 µl NaCl (5M) ja 250 µl etanolia. Eppendorfnäyteputket täytettiin tislattulla ja steriloidulla vedellä 1,5 ml:n merkkiviivaan asti ja sekoitettiin. Näyteputket laitettiin inkuboitumaan 20 min ajaksi pakastimeen -20 °C:een, jotta RNA saostuisi.

Tämän jälkeen näyteputket sulatettiin, lisättiin CF-11-selluloosakuitua 100 µl:n merkkiviivaan asti ja sekoitettiin Vortexilla. CF-11-selluloosakuitu adsorboi kaksoisjuoste-RNA:ta. Näyteputket laitettiin jäihin ja 10 min ajaksi sekoittimeen. Sekoituksen jälkeen selluloosakuitusakan annettiin laskeutua näyteputken pohjaan.

Supernatantti pipetoitiin kolonneihin, jotka oli valmistettu lisäämällä noin 0,5 mm pumpulituppoa 1 ml pipetinkärkein ja autoklavoimalla ne. Selluloosakuitusakka pestiin näyteputkesta käyttämällä 1 ml TSE-EtOH-puskuria ja pipetoimalla seos kolonneihin. Kolonnit pestiin lisäämällä 16,8 ml TSE-EtOH-puskuria 1,2 ml:n erissä. Pesupuskurin annettiin valua sakan läpi vapaasti.

Tämän jälkeen kolonnit puhallettiin kuivaksi käyttämällä 5 ml:n pipetinkärkeä, jonka kärjestä oli katkaistu pois noin 1 cm, ettei se osuisi sakkahan. Kolonnit siirrettiin kokonaisuudessaan uusiin eppendorffputkiin. Kaksoisjuoste-RNA eluointiin lisäämällä kolonniin 400 µl TSE-puskuria jonka annettiin valua sakan läpi. TSE-puskuri irrottaa kaksoisjuoste-RNA:n CF-11-selluloosakuidusta.

Kolonneihin puhallettiin uudestaan ilmaa 5 ml:n pipetinkärjellä ja kolonnit poistettiin näyteputkista. Näyteputkiin lisättiin 30 µl NaCl:a (5 M) ja täytettiin 1,5 ml:n merkkiviivaan asti etanolilla ja sekoitettiin. Näytteet laitettiin -20 °C:seen saostumaan 20 min ajaksi.

Saostetut näytteet sentrifugoitiin 20 min ajan kierrosluvun ollessa 14 000 x g. Supernatantti poistettiin muodostuneen pelletin päältä, joka kuivattiin 48 °C:n lämpöblokkissa laminaarikaapissa noin 20 - 30 min ajan.

Geelielektroforeesiajoa varten näytepelletin päälle lisättiin 10 µl TE:tä ja sen annettiin liueta noin 15 min, jonka jälkeen näyte sekoitettiin Vortexilla. Agaroosigeeliin pipetoitiin 10 µl näyteliuosta ja suoritettiin geelielektroforeesiajo tehon ollessa 120 V ja ajan 30 min + 30 min. Geeli kuvattiin molempien ajojen jälkeen UV-valossa.

Kaksoisjuoste-RNA-eristyksen geelielektroforeesiajossa syntyvät juovat antavat kuvaa viruspitoisuuden määrästä. Vertaamalla MOS-maljoilta saadun 2 g:n näytteen elektroforeesiajon juovan vahvuutta uusien kasvualustojen juovien vahvuuteen voitiin arvioida viruspitoisuuden muutoksia uusilla kasvualustoilla kasvatettaessa. Lisäksi kääpärihmastojen kasvua vertailtiin testattavilta kasvualustoilta MOS-agar-maljojen kasvuun punnitsemalla kääpärihmastojen kokonaissaannot 14 maljalta. Jatkotutkimuksissa hyvälaatuista kaksoisjuoste-RNA:ta tarvitaan sekvenssimääriytyksiä varten vähintään 100 - 200 ng [38].

4 Tulokset

4.1 Juurikäävän kasvatuskokeiden tulokset

Tätä työtä varten valmistettiin neljä koostumukseltaan erilaista agaria. Agarit olivat Hagem-agar, kuusenneulasuutetta sisältävä MOS-agar, kuusen purua sisältävä MOS-agar ja V8-agar, joka sisältää vihannesmehua. Lisäksi MOS-agarilla kasvatettiin 28 °C:ssa yleensä kasvatuslämpötilana käytetyn 22 °C:n sijaan.

Kasvualustakokeessa käytettiin kolmea kotimaista kuusenuurikäpäkantaa, joissa oli havaittu elektroforeettisesti kaksoisjuoste-RNA:ta. Kannat olivat RKU 3.1.37, 7R18 ja RT 3.49C. Maljoilla kasvatuksista tehtiin koesarja, jossa näytemääränä oli 1 g, 2 g ja 3 g sienirihmastoja uudelta kasvumaljatyyppiltä, sekä lisäksi MOS-maljoilta 2 grammaa näytettä kutakin sienikantaa geelielektroforeesiajon juovien vertailuun.

Aluksi uudelle kasvualustatyypille sekä MOS-maljalle siirrostettiin näytekantaja esikasvatukseen. Kun rihmasto oli kasvanut riittävästi siirrostusta varten, sellofaanikelmulla päällystetyille uudelle maljatyyppille sekä MOS-maljalle siirrostettiin näytekantaja kasvamaan. Maljoja kasvatettiin 22 °C:n lämpötilassa ja kaksoisjuoste-RNA-eristys suoritettiin 14 päivän kasvatuksen jälkeen. Kasvumaljoilta punnittiin saanto 14 maljasta.

MOS-maljoille tehdyt siirrostukset kasvoivat yleensä nopeimmillaan 14 päivän aikana niin laajalle kasvumaljan reunoille asti, että sitä kannatti määrällisesti käyttää tutkimuksiin. Taulukossa 1 on MOS-maljojen kuusenuurikäpärihmastojen yhteissaanto 14 maljasta kullekin kasvatukseen valitulle kuusenuurikäpäkannalle. Siinä kokonaissaanto vaihtelee käpäkannasta riippuen välillä n. 6,6 – 9,8 g. Näitä MOS-maljojen rihmaston saantomääriä käytettiin uusien testattavien kasvualustojen saannon vertailuun.

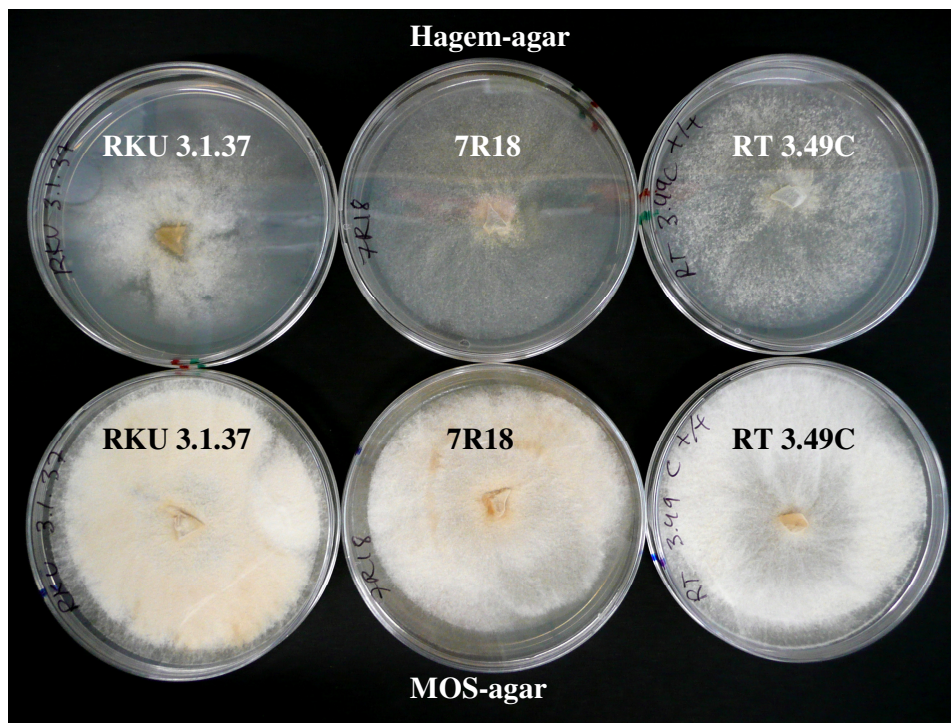
Viruseristys tehtiin uusien kasvualustatyyppien alhaisillekin saannoille, jotta voitiin nähdä onko viruspitoisuus muuttunut samassa suhteessa kuin rihmaston paino.

Taulukko 1. Kääpärihmastojen yhteissaanto MOS-agarilta 14 maljalta.

Kanta	Kasvumalja	Saanto, g
RKU 3.1.37	MOS-agar	7,52
7R18	MOS-agar	6,62
RT 3.49C	MOS-agar	9,75

4.1.1 Hagem-agar

14 päivän kasvatuksen jälkeen Hagem-agarille siirrostetut kääpäkantojen rihmastot olivat kasvaneet heikosti. Kasvusto ylsi kuitenkin osittain maljojen reunoille. Vertailuna olleet MOS-agarille tehdyt siirrostet olivat kasvaneet myös osittain maljojen reunoille asti, mutta kasvu oli paksumpaa kuin Hagem-maljoilla, kuten kuvasta 6 on nähtävissä.



Kuva 6. Kuusenjuurikääpäkantojen RKU 3.1.37, 7R18 ja RT 3.49C Hagem-agar-kasvumaljakoe. Kuvassa ylhäällä Hagem-agar-maljoilla oleva rihmasto on harvaa, kun taas vastaavasti alarivillä olevissa MOS-agar-maljoissa rihmasto on tiheämpää. Saanto Hagem-maljoilta oli alle 0,1 g maljalta ja MOS-maljoilta noin 0,6 g rihmastoja maljalta.

MOS-maljoilta kaavittiin näytteeksi rihmastoja noin 0,6 g maljalta ja Hagem-maljoilta alle 0,1 g maljalta. Taulukossa 2 on lueteltuna kasvumaljakokeen rihmaston grammamääräinen yhteissaanto kullekin kuusenuurikäpäkannalle 14 maljalta sekä kasvun muutos -% uusilla kasvumaljatyypeillä verrattuna MOS-maljojen saantoon. Siirrostetut 14 maljaa riittivät ainoastaan 0,8 - 1 g:n yhteissaantoon Hagem-maljoilta taulukossa 2.

Rihmaston kasvu väheni 5,7 - 9 g verrattuna MOS-agarin saantoon. Hagem-agarilla kasvatettujen käpäkantojen rihmaston kasvu aleni siis painomääräisesti 87 - 92 %, taulukossa 2. Aiemmin siirrostetuilta Hagem-maljoilta oli nähtävissä, ettei kasvusto lisääntynyt useankaan viikon kasvatuksen jälkeen. Näistä tuloksista oli pääteltävissä, ettei Hagem-agar sovellu käpärihmaston nopeampaan ja runsaampaan kasvatukseen.

Taulukko 2. Rihmaston yhteissaanto Hagem-agar-kasvumaljakokeen 14 maljasta sekä kasvun muutos grammaa ja % verrattuna MOS-maljojen saantoon.

Kanta	Hagem-agar saanto, g	MOS-agar saanto, g	Kasvun muutos +/- g verrattuna MOS-agarin saantoon	Kasvun muutos +/- % verrattuna MOS-agarin saantoon
RKU 3.1.37	0.99	7.52	-6.53	-86.84
7R18	0.88	6.62	-5.74	-86.71
RT 3.49C	0.77	9.75	-8.98	-92.10

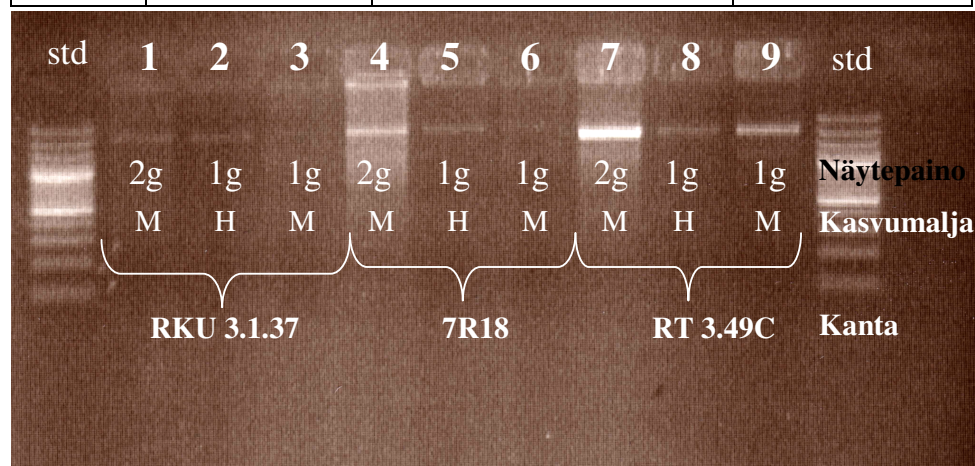
Hagem-agarilta saadut näytemäärät eivät riittäneet suunniteltuihin koesarjoihin. Siksi kaksoisjuoste-RNA-eristykseen käytettiin Hagem-agarilta saadut näytemäärät sekä MOS-agar maljoilta näytemäärät 1 g ja 2 g.

Kuvassa 7 on Hagem-agar-geelielektroforeesijon tulokset. Kuvasta 7 on nähtävissä elektroforeesijon näytejärjestys, likimääräinen näytepaino grammoina, kasvumaljan laatu ja juurikäpäkanta. Kasvumaljan laatu on merkitty lyhenteellä M (MOS-agar) tai H (Hagem-agar). Kuvaan on liitetty geelielektroforeesijon näytejärjestys näytepainoineen.

Kuvassa 7 juurikäpäkannan RKU 3.1.37 Hagem-agarin juova 2, jonka näytepaino on 1 g, arvioidaan samanvahvuiseksi MOS-agarin juovan 1 kanssa, jonka näytepaino on 2 g. Tämä osoittaa, että kannan RKU 3.1.37 kohdalla Hagem-agarilla kasvatettaessa viruspitoisuus ei ole ainakaan vähentynyt, mutta täysin selkeää viruspitoisuuden lisääntymistä ei pystytä toteamaan.

Kuvassa 7 kannan RKU 3.1.37 MOS-agarin juova 3 ja kannan 7R18 MOS-agarin juova 6, joiden näytepaino on 1 g, eivät ole luettavissa. Juovien 3 ja 6 kohdalla voidaan olettaa, että pienten näytemäärien viruspitoisuudet ovat elektroforeettisen havaitsemistason alapuolella.

Kaivo	Kanta	Kasvumalja	Näytepaino, g
standardi			
1	RKU 3.1.37	MOS-agar	2,002
2	RKU 3.1.37	Hagem-agar	0,991
3	RKU 3.1.37	MOS-agar	1,004
4	7R18	MOS-agar	2,018
5	7R18	Hagem-agar	0,880
6	7R18	MOS-agar	1,014
7	RT 3.49C	MOS-agar	2,086
8	RT 3.49C	Hagem-agar	0,777
9	RT 3.49C	MOS-agar	1,021
standardi			



Kuva 7. Hagem-agar-geelelektroforeesiajon tulokset ja näytejärjestys näytepainoineen.

Kannan 7R18 Hagem-agarin juova 5, jonka näytepaino on 1 g, arvioidaan pitoisuudeltaan hieman heikommaksi MOS-agar-juovaan 4 verrattuna, jonka näytepaino on 2 g. Koska MOS-agar-juova 6 ei ole luettavissa, viruspitoisuuden ei arvioida ainakaan vähentyneen kannan 7R18 Hagem-agarin kohdalla.

Kannan RT 3.49C kohdalla kuvassa 4 Hagem-agarin juova 8 on heikompi kuin MOS-agarin juovat 7 ja 9. Tämä osoittaa, ettei kannan RT 3.49C kohdalla ole tapahtunut viruspitoisuuden lisääntymistä verrattuna MOS-agarin viruspitoisuuteen, vaan pikemminkin vähenemistä.

Kokostandardiin verrattuna saanto on juovissa 2, 3, 6 ja 9 arviolta 5 ng, juovissa 5 ja 10 arviolta 18 ng ja juovassa 8 arviolta 50 ng.

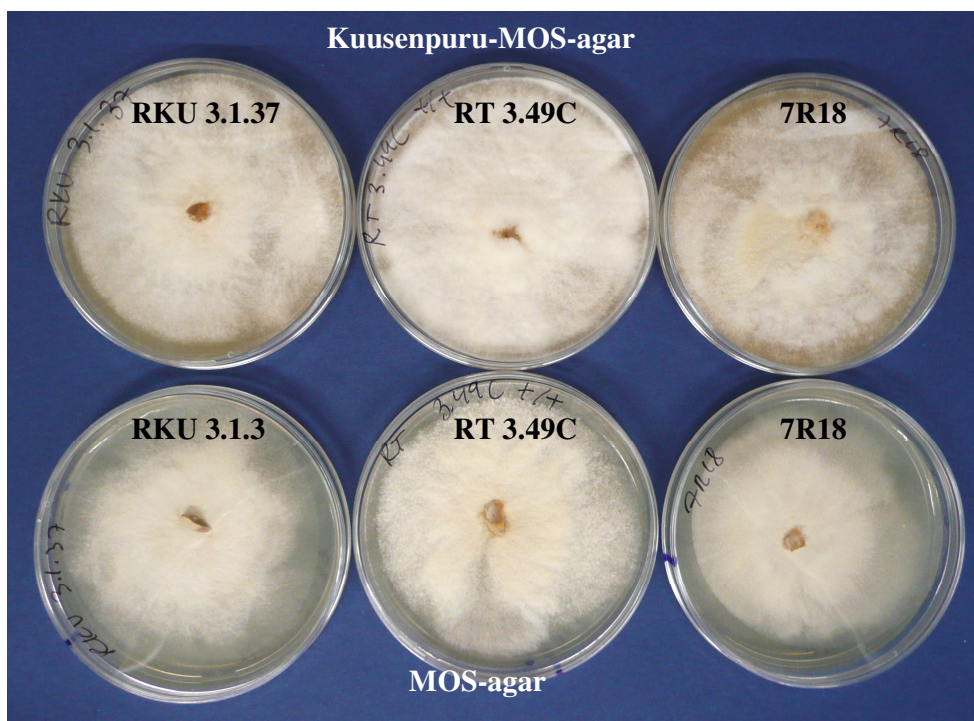
Geelielektroforeesiajon tuloksista kuvassa 7 oli nähtävissä, että Hagem-agarin käyttö kasvualustana voi vaikuttaa viruksen määrään sitä alentavasti verrattuna MOS-agarilta saatuun kasvustoon. Hagem-agarilta saadut näytemäärät olivat kaikilla kolmella kuusenjuurikäpäkannalla erittäin pienet. Siksi se ei sovellu juurikäpärihmaston tehokkaampaan kasvatukseen.

1 g:n näytemäärät ovat kaksoisjuoste-RNA:n elektroforeettisen detektoinnin alarajoilla. Tällöin esiintyy eristysmenetelmästä johtuvaa vaihtelua, joka mahdollisesti vaikuttaa tuloksissa esiintyvään viruspitoisuuteen. Hagem-agarilla rihmaston kokonaissaanto jäi jopa alle 1 g:n, jolloin elektroforeesijossa vertailuun käytettyä rihmastonäytettä MOS-agarilta olisi voinut punnita saman verran selkeämmän vertailun aikaansaamiseksi.

Hagem-agar voisi soveltua mallasuute-agar-maljojen tapaan kasvustojen säilyttämiseen, koska kasvusto oli samantyyppistä kuin mallasuute-agarilla. Nämä maljat soveltuvat mikroskoopilla tehtäviin tutkimuksiin, koska rihmaston kasvusto pysyy harvana. Harvasta kasvustosta pystytään erottamaan mikroskopoinnilla yksittäisiä rihmastoja ja niiden päitä, toisin kuin paksuna mattona kasvavasta rihmastokasvustosta.

4.1.2 Kuusenpuru-MOS-agar

Kuusenpuru-MOS-agar-maljoilla kääpärihmastojen kasvu oli 14 päivän kasvatuksen jälkeen selvästi runsaampaa kuin MOS-agar-maljoilla olevien rihmastojen kasvu, kuten kuvasta 8 on nähtävissä. Rihmastokasvu oli paksumpaa ja tiheämpää kuusenpuru-MOS-agar-maljoilla kuin MOS-agar-maljoilla.



Kuva 8. Kuvassa kuusenjuurikäpäkantojen RKU 3.1.37, RT 3.49C ja 7R18 kuusenpuru-MOS-agar-kasvumaljakoe. Kuvan ylärivillä kuusenpuru-MOS-agarilla oleva rihmaston kasvu on runsaampaa kuin vastaavasti samojen kantojen kasvusto kuvan alarivillä olevilla MOS-maljoilla.

Kuusenpuru-MOS-agarilta rihmastoja kaavittaessa havaittiin, että rihmaston agarista erottamiseen käytetty sellofaanikalvo oli sulautunut rihmaston niin, ettei sitä voitu poistaa. Täten osa näytepainosta muodostuu sellofaanikalvon painosta. Kuusenpuru-MOS-agar-maljat olivat kuivuneet huomattavasti enemmän kuin muut aiemmin käytetyt kasvumaljat. Tämä voi olla osasy sellofaanikalvon tiukka tarttumiseen rihmaston.

Juurikäpäkantojen 7R18 ja RKU 3.1.37 rihmastosta sellofaanikalvo saatiin poistettua osittain, kun taas kannan RT 3.49C kohdalla sellofaanikalvoa ei saatu poistetuksi. Agar-maljoilta kerättyjen sellofaanikalvojen keskimääräinen kappalepaino oli 0,33 g. Täten sellofaanikalvon painosta koostuva näytemäärän hävikki voi olla varsin huomattava.

Taulukossa 3 on rihmaston yhteissaanto kullekin kuusenjuurikäpäkannalle. Kokonaissaanto kuusenpuru-MOS-agar-maljoilta oli n. 8,5 -17,5 g käpäkannasta riippuen, kun taas MOS-maljoilta n. 6,6 -9,8 g. Rihmaston painon lisäksi painomääräisesti oli noin 13 -80 % verrattuna MOS-maljojen saantoon, taulukko 3.

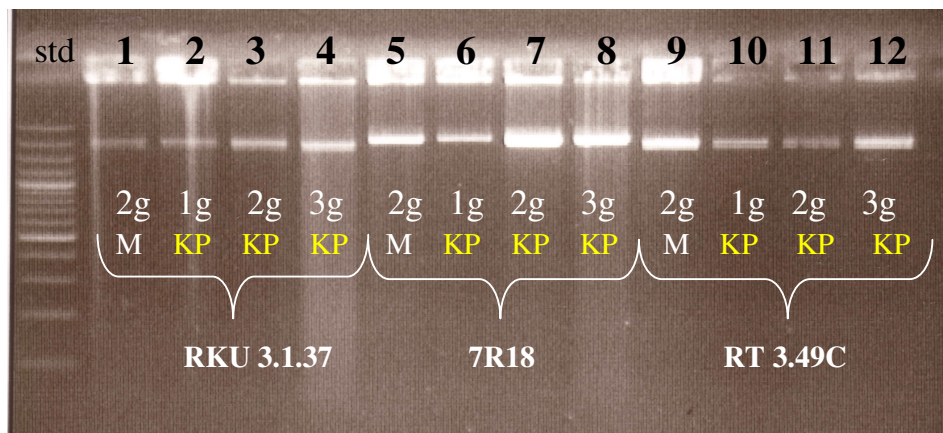
Taulukko 3. Rihmaston yhteissaanto kuusenpuru-MOS-agar-kasvumaljakokeen 14 maljasta sekä kasvun muutos grammaa ja % verrattuna MOS-agarin saantoon.

Kanta	Kuusenpuru-MOS-agar saanto, g	MOS-agar saanto, g	Kasvun muutos +/- g verrattuna MOS-agarin saantoon	Kasvun muutos +/- %, verrattuna MOS-agarin saantoon
RKU 3.1.37	8.49	7.52	0.97	12.90
7R18	9.48	6.62	2.86	43.20
RT 3.49C	17.49 (12,87)	9.75	7.74 (3,12)	79.38 (32)

Koska kannan RT 3.49C korkea näytepainon lisäys muodostuu kuitenkin osittain sellofaanikalvon painosta, taulukkoon 3 on lisätty sulkeisiin tulokset, joissa on poistettu kalvojen oletettu keskimääräinen paino. Kun kannan RT 3.49C 14 kuusenpuru-MOS-agar kasvumaljan kokonaissaannon tuloksesta vähennetään 14 sellofaanikalvon paino 4,62 g, jää saannoksi 12,87 g. Kasvun muutokseksi verrattuna MOS-agarin saantoon tulee tällöin 3,12 g. Verrattuna MOS-agarin saantoon kasvun muutos olisi 32 %. Sellofaanikalvon painon vaikutus näytemäärään voi siten olla varsin huomattava.

Kuusenpuru-MOS-agar-elektroforeesiajon tulokset ovat näkyvissä kuvassa 9. Kuvasta 9 on nähtävissä myös elektroforeesiajon näytejärjestys, näytepaino, kasvumaljan laatu ja juurikäpäkanta. Kasvumaljan laatu on merkitty lyhenteellä M (MOS-agar) tai KP (kuusenpuru-MOS-agar).

Kaivo	Kanta	Kasvumalja	Näytepaino, g
standardi			
1	RKU 3.1.37	MOS-agar	2,014
2	RKU 3.1.37	Kuusenpuru-MOS-agar	1,070
3	RKU 3.1.37	Kuusenpuru-MOS-agar	2,005
4	RKU 3.1.37	Kuusenpuru-MOS-agar	3,014
5	7R18	MOS-agar	2,074
6	7R18	Kuusenpuru-MOS-agar	1,077
7	7R18	Kuusenpuru-MOS-agar	2,044
8	7R18	Kuusenpuru-MOS-agar	3,048
9	RT 3.49C	MOS-agar	2,072
10	RT 3.49C	Kuusenpuru-MOS-agar	1,002
11	RT 3.49C	Kuusenpuru-MOS-agar	2,030
12	RT 3.49C	Kuusenpuru-MOS-agar	3,064



Kuva 9. Kuusenpuru-MOS-agar-geelelektroforeesiajon näytejärjestys ja tulokset. Kuusenpuru-MOS-agarin juovat ovat pääsääntöisesti voimakkaampia kuin MOS-agarin juovat, mikä osoittaa viruspitoisuuden lisääntyneen uudella kasvualustalla kasvatettaessa. Kannan RT 3.49C heikompaa tulosta selitetään sellofaanikalvon painon vaikutuksella näytepainoon sitä alentavasti.

Verrattaessa kuvan 9 kannan RKU 3.1.37 MOS-agarin näytejuovaa 1 kuusenpuru-MOS-agarin näytejuovaan 2 on nähtävissä, että näytemäärän 1 g omaava juova 2 on samanvahvuinen kuin näytemäärän 2 g omaava juova 1. Tämä osoittaa, että viruspitoisuus on lisääntynyt kuusenpuru-MOS-agarilla kasvatettaessa.

Samoin juova 3 on vahvempi kuin MOS-agarin juova 1, joissa on molemmissa käytetty 2 g näytettä. Viruspitoisuus on siten lisääntynyt. Juova 4 noudattelee juovien 2 ja 3 lisääntynyttä viruspitoisuutta.

Kuvan 9 juurikäpäkannan 7R18 MOS-agarin juovaa 5 verrattaessa kuusenpuru-MOS-agarin juoviin 6, 7 ja 8 on havaittavissa, että viruksen määrä on lisääntynyt MOS-agarin verrattaessa. Juovat 7 ja 8 ovat pitoisuudeltaan hyvin voimakkaita verrattuna juovaan 5.

Näytteen 6 kohdalla voidaan olettaa että näytteen käsittely, eristysmenetelmästä johtuva vaihtelu tai sellofaanikalvon paino on voinut vaikuttaa 1 g:n näytemäärään sen viruspitoisuutta alentavasti. Tulos on kuitenkin hyvä näin pienellä näytemäärällä, vaikka se ei täysin noudattelekaan näytteiden 7 ja 8 voimakkaita juovia.

Toisaalta kannan RT 3.49C näytteiden kuusenpuru-MOS-agar-juovissa 10, 11 ja 12 on havaittavissa viruspitoisuuden heikentymistä verrattuna MOS-agar-juovan 9 vahvuuteen. Pienillä näytemäärillä eristettäessä mukaan tuleva sellofaanikalvon paino voi vähentää rihmaston näytepainoa merkittävästi. Koska juovan 11 viruspitoisuus on jopa heikompi kuin juovan 9 vahvuus, pelkkä sellofaanikalvon painon vaikutus ei ehkä ole ainoa tekijä heikompaan viruspitoisuuteen.

Agarin joutuminen näytteen mukaan sellaisilta kasvumaljoilta, joissa rihmasto on takertunut sellofaanikalvoon, on hyvin todennäköistä, koska pienten agar-määrien havaitseminen on hyvin vaikeaa. Pienetkin määrät agaria voivat vaikuttaa tuloksiin merkittävästi. On myös mahdollista, että juuri tämän kuusenjuurikäpäkannan RT 3.49C virukset eivät viihdy juurikäpärihmastossa tämän tyyppisellä kasvualustalla. Kannan RT 3.49C rihmaston kasvun määrä oli kuitenkin lisääntynyt huomattavasti verrattuna MOS-agarin kasvuston määrään (taulukko 3). Viruspitoisuus onkin voinut vähentyä rihmaston kasvun voimistuessa.

Kokostandardiin verrattuna saanto on kuvan 9 juovissa 1, 2 ja 11 arviolta 17 ng ja juovissa 3, 4, 6 ja 10 arviolta 50 ng. Juovissa 5 ja 12 pitoisuuden arvioidaan olevan 100

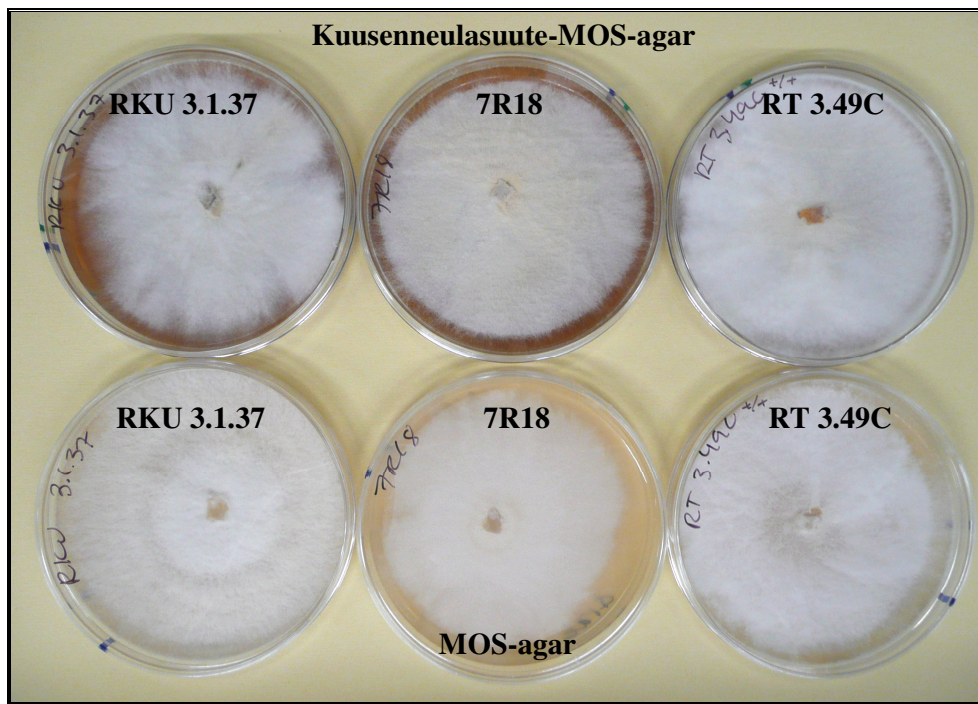
ng ja juovissa 7, 8 ja 9 arviolta 150 ng. Tämä osoittaa, että ainakin kannan 7R18 kohdalla viruspitoisuus on lisääntynyt verrattuna juovan 5 pitoisuuteen 100 ng jopa 150 ng:aan juovilla 7 ja 8.

Kuusenpurun lisätessä kasvumaljojen kuiva-ainepitoisuutta kuusenpuru-MOS-agar-maljat kuivuivat MOS-agar-maljoja nopeammin. Kosteuden hävitessä kasvava rihmasto voi takertua tiukemmin sellofaanikalvoon, jolloin sitä ei saada kaavittua irti rihmastosta. Kalvon paino vähentää näytteeksi kaavitun rihmaston painoa, joten syntyvän näyttemäärän hävikin voidaan olettaa vaikuttavan viruspitoisuuteen sitä alentavasti.

Kuusenpuru-MOS-agarin tulokset olivat riittävän hyviä osoittamaan, että kuusenpuru-MOS-agarin käytöllä saadaan lisättyä sekä rihmaston kasvunopeutta ja määrää sekä viruspitoisuutta ainakin kannan 7R18 rihmastossa. Jatkossa olisi hyvä selvittää, voidaanko kuusenpuru-MOS-agarista vähentää agarin määrää kosteuden säilyttämiseksi esim. 50 %. Pienemmän purumäärän käyttö voisi myös edistää kosteuden säilymistä. Tällöin voitaisiin saada selville, vaikuttaako maljojen kosteus rihmaston tarttumiseen sellofaanikalvoon.

Tiedossa ei ole, mitkä tekijät kuusenpuru-MOS-agarissa saivat sekä kääpärihmaston että viruksen pitoisuuden lisääntymään. Kuusenpurun määrän ja agarin kosteuden osalta olisikin hyvä selvittää, mitkä muutokset vaikuttavat rihmaston ja viruksen määrään niitä lisäävästi. Tarkempi kuusenpuru-MOS-agarin eri ainesosien vaikutuksen tutkiminen juurikääpärihmaston kasvuun ja viruspitoisuuden lisääntymiseen voisi tuoda esiin selkeämpää viruspitoisuuden lisääntymistä vähemmällä raaka-aineiden käytöllä.

4.1.3 Kuusenneulasuute-MOS-agar



Kuva 10. Kuvassa kuusenneulasuute-MOS-agar-kasvumaljakoe. Kuvan ylärivillä kuusenneulasuute-MOS-agar-maljat ja alarivillä vastaavasti samojen kantojen MOS-agar-maljat. Kasvustojen välillä ei näyttäisi olevan huomattavaa eroa.

Kuusenneulasuute-MOS-agar-maljoilla kääpärihmastojen kasvussa ei näyttänyt olevan huomattavaa eroa verrattuna MOS-agar-maljojen kasvustoon, kuten kuvasta 10 on nähtävissä. Taulukossa 4 on esitettyinä rihmaston grammamääräinen yhteissaanto kullekin kuusenneulasuute-MOS-agar-maljalle sekä vertailuun käytettävän MOS-agarin saannot.

Taulukko 4. Rihmaston yhteissaanto kuusenneulasuute-MOS-agar-kasvumaljakokeen 14 maljasta sekä kasvun muutos grammaa ja % verrattuna MOS-agarin saantoon.

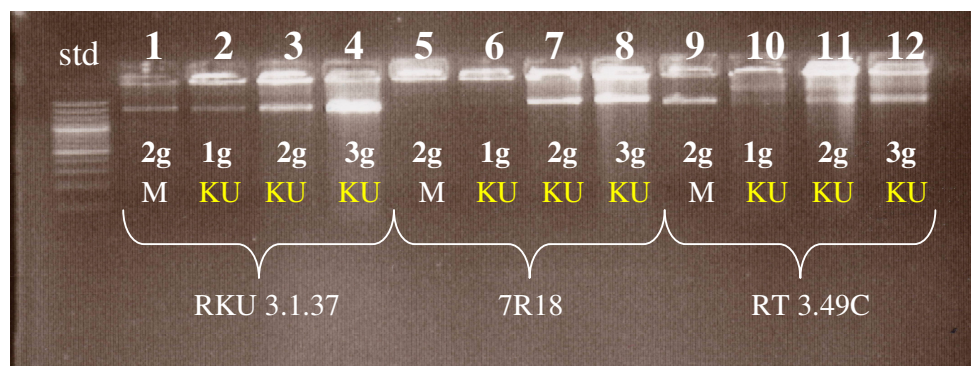
Kanta	Kuusenneulasuute-MOS-agar saanto, g	MOS-agar saanto, g	Kasvun muutos +/- g verrattuna MOS-agarin saantoon	Kasvun muutos +/- %, verrattuna MOS-agarin saantoon
RKU 3.1.37	8.53	7.52	1,01	13,43
7R18	12.03	6.62	5,41	81,65
RT 3.49C	16.36	9.75	6,61	67,76

Kuusenneulasuute-MOS-agarin kokonaissaanto oli kääpäkannasta riippuen 1,0 - 6,6 g suurempi kuin MOS-maljojen saanto ja kasvun lisäys oli 13 - 82 % ks. taulukko 4.

Juurikäpärilmaston saantoa saatiin siten lisättyä jopa huomattavasti (+82 %) käytettäessä kuusenneulasuute-MOS-agaria kasvumaljana.

Kuvasta 11 on nähtävissä kuusenneulasuute-MOS-agar-elektroforeesiajon näytejärjestys, näytepaino, kasvumaljan laatu ja juurikäpäkanta sekä elektroforeesiajon tulokset. Kasvumaljan laatu on merkitty lyhenteellä M (MOS-agar) tai KU (kuusenneulasuute-MOS-agar).

Kaivo	Kanta	Kasvumalja	Näytepaino, g
standardi			
1	RKU 3.1.37	MOS-agar	2,024
2	RKU 3.1.37	Kuusenneulasuute-MOS-agar	1,014
3	RKU 3.1.37	Kuusenneulasuute-MOS-agar	2,023
4	RKU 3.1.37	Kuusenneulasuute-MOS-agar	3,046
5	7R18	MOS-agar	2,060
6	7R18	Kuusenneulasuute-MOS-agar	1,058
7	7R18	Kuusenneulasuute-MOS-agar	2,093
8	7R18	Kuusenneulasuute-MOS-agar	3,009
9	RT 3.49C	MOS-agar	2,036
10	RT 3.49C	Kuusenneulasuute-MOS-agar	1,035
11	RT 3.49C	Kuusenneulasuute-MOS-agar	2,096
12	RT 3.49C	Kuusenneulasuute-MOS-agar	3,040



Kuva 11. Kuusenneulasuute-MOS-agar-geielektroforeesiajon tulokset ja näytejärjestys näytepainoineen.

Kuvan 11 kuusenneulasuute-MOS-agar-elektroforeesiajon tuloksista on nähtävissä, että juurikkääpäkannan RKU 3.1.37 kuusenneulasuute-MOS-agarin näytemäärän 1 g omaava juova 2 on saman vahvuinen MOS-agar-juovan 1 kanssa, jonka näytemäärä on 2 g. Viruspitoisuus on siten lisääntynyt.

Samoin kuusenneulasuute-MOS-agarin juova 3 on vahvempi kuin MOS-agarin juova 1, joissa molemmissa on käytetty 2 g näytettä. Kuusenneulasuute-MOS-agarin juova 4, jonka näytemäärä on 3 g, on huomattavan voimakas. Viruksen määrä on näin ollen lisääntynyt kaikissa kannan RKU 3.1.37 kuusenneulasuute-MOS-agarin näytteissä verrattuna MOS-agarin juovaan. Kokostandardiin verrattuna saanto on juovissa 1 ja 2 arviolta 18 ng ja juovassa 3 arviolta 50 ng. Juovan 4 pitoisuus on arviolta 150 ng. Tämä osoittaa, että viruspitoisuus on lisääntynyt.

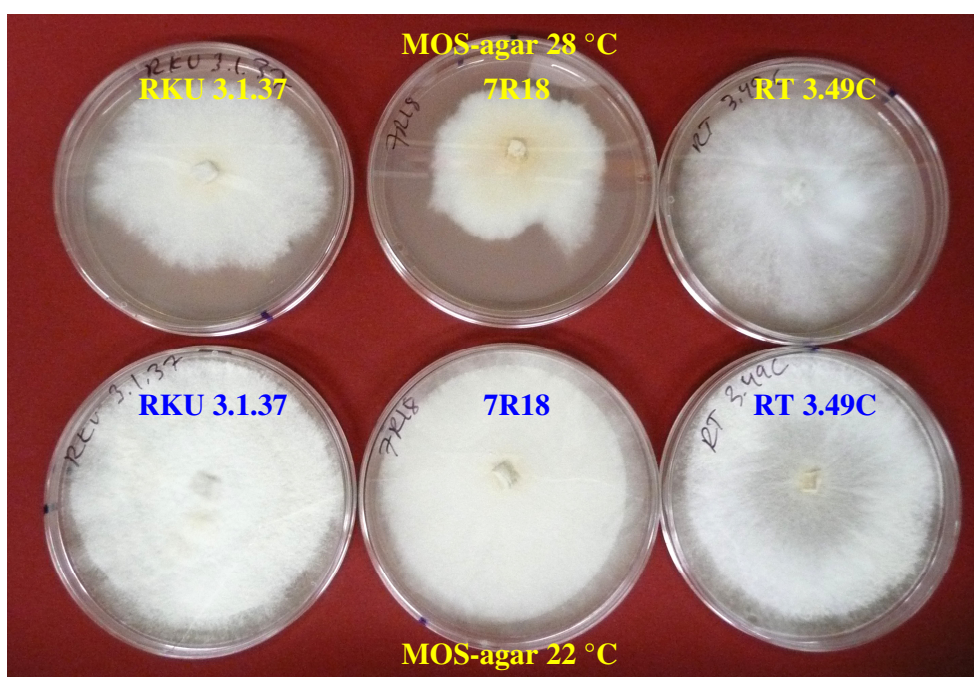
Kannan 7R18 kohdalla näytteitä 5 ja 6 pipetoitaessa huomattiin, etteivät geelin kaivot olleet täysin symmetriset. Geeliä valmistettaessa tai käsiteltäessä on tapahtunut virhe, joka on tukkinut osan kaivoa. Tämä on voinut alentaa näytemäärää kaivoissa 5 ja 6 ja vaikuttaa tuloksiin niitä heikentävästi.

Vertailuun käytettävän MOS-agar-juovan voidaan kuitenkin olettaa noudattelevan toisten elektroforeesiajojen MOS-agar-kannan 7R18 juovien vahvuutta, kuten esim. kuvissa 7, 9 ja 13. Kuvassa 11 kannan 7R18 kuusenneulasuute-MOS-agarin juovissa 7 ja 8 näytemäärien 2 g ja 3 g kohdalla havaitaan viruspitoisuuden lisääntymistä, kun niitä verrataan kannan 7R18 MOS-agar-juovaan kuvissa 7, 9 ja 13. Kokostandardiin verrattaessa juovan 7 pitoisuudeksi arvioidaan 50 ng ja juovan 8 pitoisuudeksi 80 ng.

Kuvan 11 kannan RT 3.49C kuusenneulasuute-MOS-agar-juova 10, jonka näytemäärä on 1 g, on heikko. Kuusenneulasuute-MOS-agarin juova 11 arvioidaan saman vahvuiseksi kuin MOS-agarin juova 9, joiden molempien näytemäärät ovat 2 g. Kokostandardiin verrattuna juovan 9 pitoisuus on arviolta 50 ng, juovan 11 arviolta 40 ng ja juovan 12 pitoisuus arviolta 60 ng. Viruspitoisuuden ei arvioida lisääntyneen kannan RT 3.49C kohdalla.

4.1.4 MOS-agar 28 °C

Kasvatettaessa MOS-agarilla 14 päivää 28 °C:ssa tavallisesti kasvatukseen käytetyn 22 °C:n sijaan havaittiin, että rihmaston kasvu heikkeni kaikilla juurikäpäkannoilla. Kuvasta 12 on nähtävissä, että kantojen RKU 3.1.37 ja 7R18 rihmaston kasvu MOS-agarilla 28 °C:ssa on selvästi heikompaa kuin 22 °C:ssa kasvatettuna. Myös kannan RT 3.49C rihmaston kasvu on heikompaa 28 °C:ssa kasvatettuna kuin 22 °C:ssa kasvatettuna.



Kuva 12. Kuusenjuurikäpäkantojen RKU 3.1.37, 7R18 ja RT 3.49C MOS-agar-kasvumaljakoe (28 °C). Ylärivillä MOS-agarilla 28 °C:ssa kasvatettujen rihmastojen kasvu on niukempaa kuin vastaavasti samojen kantojen kasvusto alarivillä olevilla 22 °C:ssa kasvatetuilla MOS-maljoilla. Kasvatus 28 °C:ssa ei lisää rihmaston saantoa.

Taulukossa 5 on rihmaston yhteissaanto kullekin kuusenjuurikäpäkannalle. Rihmaston näytelmäärän alenema oli noin 38–68 % verrattuna MOS-maljojen saantoon.

Heikentynyt rihmaston kasvu osoittaa, ettei korkeammassa lämpötilassa kasvatus lisää rihmaston kasvun saantoa.

Taulukko 5. Rihmaston yhteissaanto MOS-agar-kasvumaljakokeen (28 °C) 14 maljasta sekä kasvun muutos grammaa ja % verrattuna MOS-agarin saantoon.

Kanta	MOS-agar 28°C saanto, g	MOS-agar saanto, g	Kasvun muutos +/- g verrattuna MOS- agarin saantoon	Kasvun muutos +/- %, verrattuna MOS-agarin saantoon
RKU 3.1.37	3.49	7.52	-4.03	-53.59
7R18	4.09	6.62	-2.53	-38.22
RT 3.49C	3.17	9.75	-6.58	-67.49

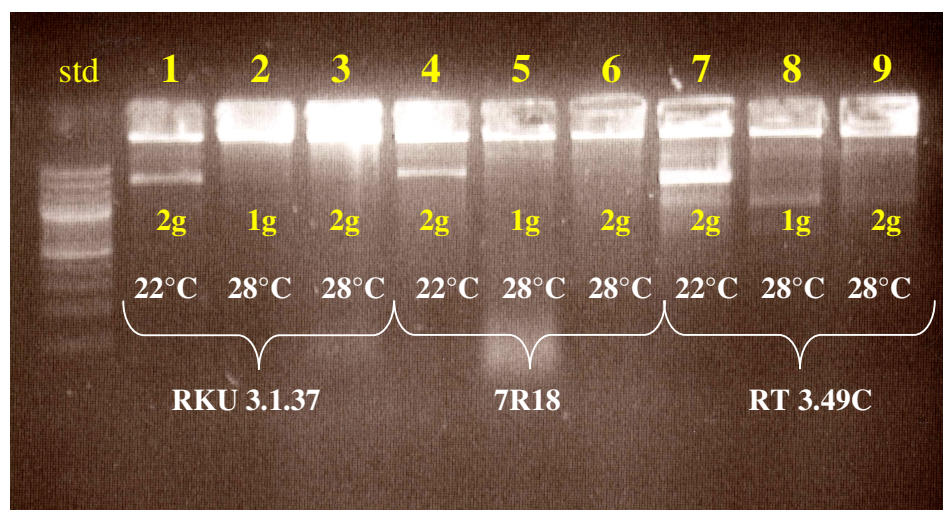
Heikentynyt rihmaston kasvu alensi näytemäärää niin, ettei suunniteltua koesarjaa saatu tehtyä. Koesarjasta jätettiin pois MOS-agar 28 °C näytemäärä 3 g, koska 1 g:n ja 2 g:n näytemäärien vertaaminen MOS-agarin 2 g:n näytteeseen oli viruspitoisuuden kannalta merkittävämpää.

Kuvasta 13 on nähtävissä kuusenneulasuute-MOS-agar-elektroforeesiajon näytejärjestys, näytepaino, kasvatuslämpötila ja juurikäpäkanta sekä elektroforeesiajon tulokset.

Kuvan 13 MOS-agar-kasvumaljakokeen (28 °C) elektroforeesiajon tuloksista on nähtävissä, ettei 28 °C:ssa kasvattaminen vaikuttanut suotuisasti viruspitoisuuteen, joka putosi alle elektroforeettisen havaitsemistason. Ainoastaan 22 °C:ssa kasvatettujen rihmastojen elektroforeesiajon juovat 1, 4 ja 7 ovat luettavissa. Kannan RKU 3.1.37 juovat 2 ja 3, kannan 7R18 juovat 5 ja 6 sekä kannan RT 3.49C juovat 8 ja 9 ovat tyhjä. Viruspitoisuus on alentunut merkittävästi alle havaintokynnyksen, tai virus on kadonnut kääpärihmastoista kokonaan.

Koska kääpäkantojen rihmaston kasvu heikkeni merkittävästi ja viruspitoisuus aleni huomattavasti, voidaan todeta, ettei MOS-agarilla 28 °C:ssa kasvatettaessa saada aikaan hyötyä rihmaston kasvun tai viruspitoisuuden määrään.

Kaivo	Kanta	Kasvumalja	Näytepaino, g
standardi			
1	RKU 3.1.37	MOS-agar	2,004
2	RKU 3.1.37	MOS-agar 28 °C	1,016
3	RKU 3.1.37	MOS-agar 28 °C	2,002
4	7R18	MOS-agar	2,021
5	7R18	MOS-agar 28 °C	1,033
6	7R18	MOS-agar 28 °C	2,091
7	RT 3.49C	MOS-agar	2,058
8	RT 3.49C	MOS-agar 28 °C	1,049
9	RT 3.49C	MOS-agar 28 °C	2,022



Kuva 13. MOS-agar-kasvumaljakokeen (28 °C) elektroforeesiajon tulokset ja näytejärjestys. Ainostaan 22 °C:ssa kasvatetun MOS-agarin juovat 1, 4 ja 7 ovat luettavissa. 28 °C:ssa kasvatus on vähentänyt viruksen määrää erittäin merkittävästi tai poistanut viruksen kokonaan.

Viruksen mahdollisella katoamisella 28 °C:ssa kasvatettaessa on kuitenkin tutkimuksellista merkitystä. Mikäli korkeammassa lämpötilassa kasvattamalla virus saadaan poistettua sienirihmastosta, voidaan tutkia samaa juurikäpäkantaa viruksen kanssa ja ilman virusta. Tällöin voidaan nähdä, vaikuttaako viruksen läsnäolo sienikannan kasvuun.

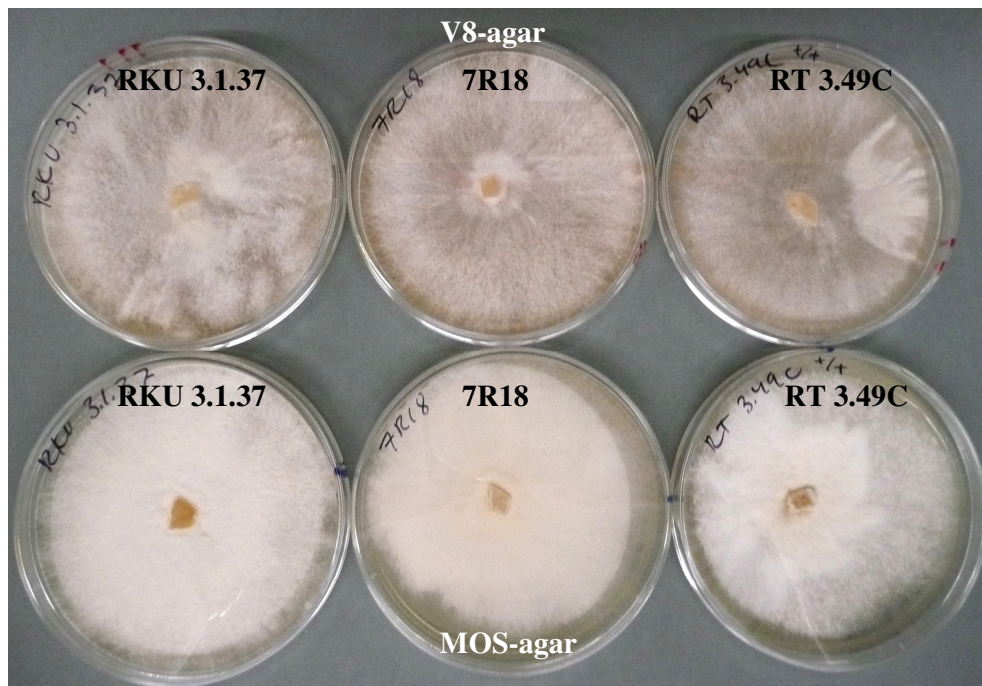
Virusten häviäminen juurikäpäkannoista voitaisiin todentaa kasvattamalla siirrosteita 28 °C:n lämpötilassa kasvatetuista rihmastoista edelleen normaalissa 22 °C:n kasvatuslämpötilassa ja suorittamalla kaksoisjuoste-RNA:n eristys.

Valkosen ja Tapion mukaan (39, s. 62) mukaan kasvin virus voidaan hävittää lämpöterapialla tai kemiallisella käsittelyllä tartunnan saaneesta kasvista.

Jatkotutkimusten mukaan samat juurikäävän virukset on saatu häviämään kasvattamalla 30 °C:ssa ja siirrostamalla tästä 20 °C:n kasvatukseen ja eristämällä kaksoisjuoste-RNA [37].

4.1.5 V8-agar

V8-agarin valmistuksessa käytettiin vihannemehua. Kuvasta 14 voidaan nähdä, että juurikäpärihmastojen kasvu oli V8-agar-maljoissa 14 päivän kasvatuksen jälkeen harvempaa kuin MOS-agar-maljoissa. Taulukossa 6 on esitettyä rihmaston yhteissaanto kullekin kuusenjuurikäpäkannalle sekä vertailuun käytettävän MOS-agarin saannot.



Kuva 14. Kuusenjuurikäpäkantojen RKU 3.1.37, 7R18 ja RT 3.49C V8-agar-kasvumaljakoe. Kuvan ylärivillä olevien V8-agarilla kasvatettujen rihmastojen kasvu on harvempaa, kuin vastaavasti samojen kantojen kasvu kuvan alarivillä olevilla MOS-agar-maljoilla.

V8-agarilla juurikäpärihmaston kokonaissaanto oli käpäkannasta riippuen 1- 3,4 g pienempi kuin MOS-agar-maljojen saanto ja kasvun alenema oli 15... 35 %, verrattuna MOS-agarin saantoon, ks. taulukko 6.

Taulukko 6. Rihmaston yhteissaanto V8-agar kasvumaljakokeen 14 maljasta sekä kasvun muutos grammaa ja % verrattuna MOS-agarin saantoon.

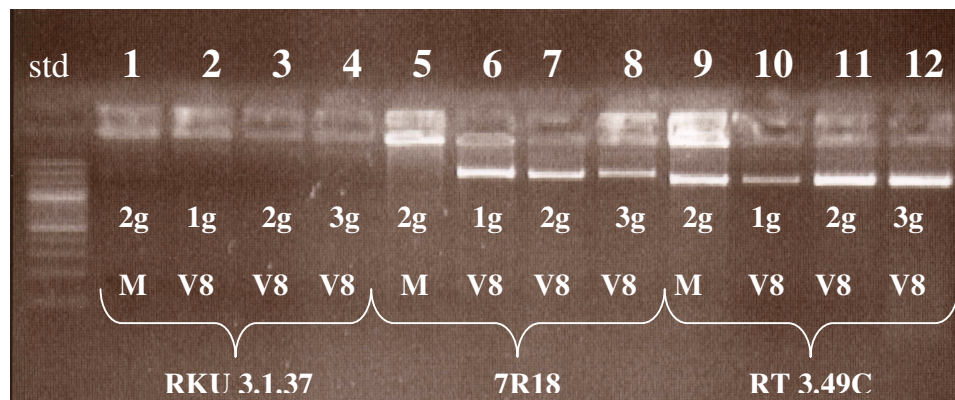
Kanta	V8-agar saanto, g	MOS-agar saanto, g	Kasvun muutos +/- g verrattuna MOS-agarin saantoon	Kasvun muutos +/- %, verrattuna MOS-agarin saantoon
RKU 3.1.37	6	7.52	-1.26	-16.76
7R18	5.63	6.62	-0.99	-14.95
RT 3.49C	6.40	9.75	-3.35	-34.40

Kuvasta 15 on nähtävissä V8-agar-elektroforeesijon näytejärjestys, näytepaino, kasvumaljan laatu ja juurikäpäkanta sekä elektroforeesijon tulokset. Kasvumaljan laatu on merkitty lyhenteellä M (MOS-agar) tai V8 (V8-agar).

V8-agarin geelielektroforeesijon tuloksista kuvassa 15 on nähtävissä että kannan RKU 3.1.37 kohdalla tuloksia ei ole luettavissa. Koska kannan RKU 3.1.37 sekä vertailuun käytettävän MOS-agarin että V8-agarin juovat eivät ole luettavissa, viruspitoisuuden heikentyminen ei johdu pelkästään V8-agarin käytöstä. Tämä voisi viitata väärän EtOH-konsentraation käyttöön, kun talteen kerättävän näytteen määrä voi vaihdella.

Viruspitoisuuden heikentyminen tai katoaminen voisi johtua myös siitä, että kaksoisjuoste-RNA:ta eristettäessä alhaisista viruspitoisuuksista kaksoisjuoste-RNA ei ehdi saostua -20 °C:ssa täydellisesti 20 min aikana. On myös esitetty että DNA:ta kannattaa saostaa vähintään 1 h ja mieluummin yön yli, jos DNA-liuos on hyvin laimea (< 0,1 µg/ml) tai DNA hyvin lyhyttä (< 100 bp) [26]. Tätä tietoa voisi soveltaa RNA:han ja tutkia onko saostusajalla vaikutusta RNA:n saostumisen tuloksiin. Tämä voitaisiin todeta suorittamalla kaksoisjuoste-RNA-eristys alhaisen saannon omaavista juurikäpäkannoista pienillä näytemäärillä ja käyttämällä lyhyttä 20 min saostusaikaa sekä pitkää (yli 1 h) saostusaikaa saantojen mahdollisten muutosten vertailemiseksi.

Kaivo	Kanta	Kasvumalja	Näytämäärä, g
standardi			
1	RKU 3.1.37	MOS-agar	2,035
2	RKU 3.1.37	V8-agar	1,021
3	RKU 3.1.37	V8-agar	2,031
4	RKU 3.1.37	V8-agar	3,033
5	7R18	MOS-agar	2,037
6	7R18	V8-agar	1,051
7	7R18	V8-agar	2,044
8	7R18	V8-agar	3,054
9	RT 3.49C	MOS-agar	2,070
10	RT 3.49C	V8-agar	1,059
11	RT 3.49C	V8-agar	2,032
12	RT 3.49C	V8-agar	3,087



Kuva 15. V8-agar-elektroforeesijon tulokset ja näytejärjestys. Juurikäpäkannan RKU 3.1.37 viruspitoisuutta sekä MOS- että V8-agarilla ei voida havaita. Syyinä voi olla liian lyhyt kaksoisjuoste-RNA:n saostusaika. Kantojen 7R18 ja RT 3.49C viruspitoisuuden arvioidaan lisääntyneen.

Aiemmissa kaksoisjuoste-RNA-eristyksissä geelielektroforeesijao suoritettiin seuraavana päivänä, jolloin kaksoisjuoste-RNA:n saostamiseen kului aikaa useita tunteja. Toisaalta myös kannan 7R18 ja RT 3.49C saostusaika on ollut sama, mutta juovat ovat selkeästi näkyvissä. Viruspitoisuuden katoaminen tai heikkeneminen alle havaitsemistason voinee johtua myös viruspitoisuuden heikkenemisestä rihmastossa, josta on tehty useita siirrostuksia.

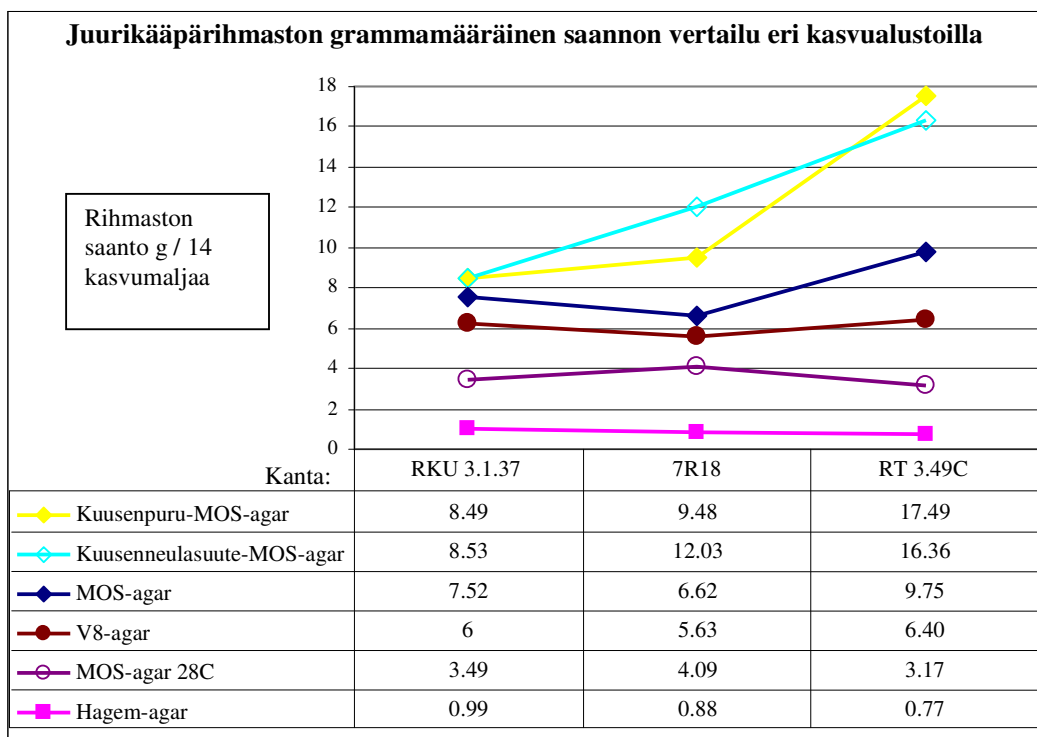
Kannan 7R18 kohdalla kuvassa 15 MOS-agar juova 5 ei ole luettavissa. Tämä voisi myös johtua liian lyhyestä kaksoisjuoste-RNA:n saostusajasta. V8-agar-juovien 6, 7 ja 8 viruspitoisuuden arvioidaan hieman lisääntyneen. Kannan RT 3.49C MOS-agar-juova 9

on hieman heikompi kuin V8-agarin juova 11, joiden molempien näytemäärä on 2 g. Viruspitoisuuden arvioidaan siten lisääntyneen kannan RT 3.49C kohdalla.

Kannan 7R18 juovan 6 viruspitoisuuden saanto on arviolta 160 ng, juovan 7 arviolta 130 ng ja juovan 8 arviolta 100 ng kokostandardiin verrattuna. Kannan RT 3.49C viruspitoisuuden saanto on juovalla 9 arviolta 180 ng, juovalla 10 arviolta 110 ng, juovalla 11 arviolta 200 ng ja juovalla 12 arviolta 210 ng.

Kasvumaljojen juurikäpärähmaston saannon grammamääräinen vertailu eri kasvualustoille

Kuvassa 16 on kasvumaljojen juurikäpärähmaston saannon grammamääräinen vertailu eri kasvualustoille. Siinä ei ole otettu huomioon sellofaanikalvon painon vaikutusta näytepainoihin.



Kuva 16. Kasvumaljojen rihmaston grammamääräinen saannon vertailu eri kasvualustoilla juurikäpäräkannoille RKU 3.1.37, 7R18 ja RT 3.49C.

Kuvasta 16 on nähtävissä, että juurikäpäkantojen välillä esiintyy vaihtelua rihmaston saannossa sekä kasvualustojen välillä, että eri käpäkantojen välillä.

Kuusenjuurikäpäkantojen rihmaston kasvussa näytti olevan sienikantakohtaisia eroja.

Korkein rihmaston grammamääräinen saanto oli kuitenkin kaikilla juurikäpäkannoilla kuusenpuru- ja kuusenneulasuute-MOS-agarilla. Heikoin tulos rihmaston painon saannon suhteen saatiin MOS-agarilla (28 °C) ja Hagem-agarilla.

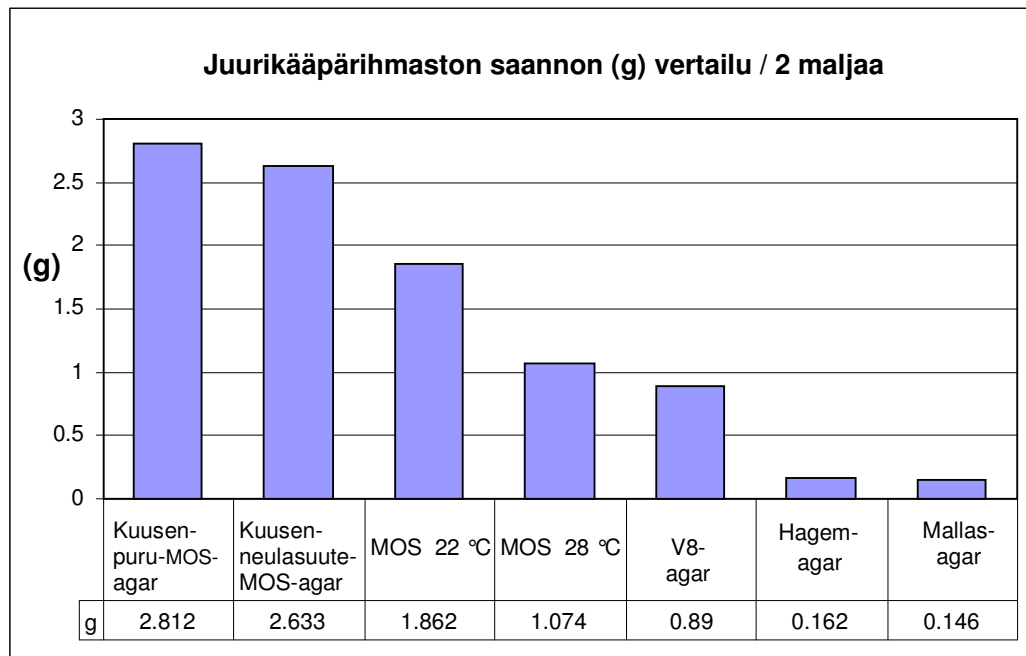
4.2 Kasvualustojen virussaannon vertailu

Koska juurikäpärihmaston grammamääräisten saantojen välillä oli merkittäviä eroja eri kasvualustojen välillä, verrattiin vielä virussaantoa eri kasvualustoilta. Virussaantoa vertailtiin tekemällä kaksoisjuoste-RNA-eristys kuusenjuurikäpäkannan RT 3.49C rihmastosta seuraavilta kasvualustoilta:

- kuusenneulasuute-MOS-agar
- kuusenpuru-MOS-agar
- mallas-agar
- Hagem-agar
- V8-agar
- MOS-agar 22 °C
- MOS-agar 28 °C.

Kasvatusaika oli 14 päivää. Juurikäpärihmastoa kaavittiin näytteeksi kahdelta maljalta jokaiselta kasvualustatyypiltä kaksoisjuoste-RNA-eristystä varten.

Kuvassa 17 on juurikäpärihmaston painomääräisen saannon vertailu kahdelta kasvumaljalta pylväsdiagrammina esitettynä. Erotus suurimman, kuusenpuru-MOS-agarin ja pienimmän, mallas-agarin rihmaston saannon välillä oli 2,66 g. Sopivan kasvualustan valinnalla voidaan siten lisätä juurikäpärihmaston saantoa merkittävästi. Korkeimmat rihmaston saannot olivat kuusenpuru-MOS-agarilla ja kuusenneulasuute-MOS-agarilla.

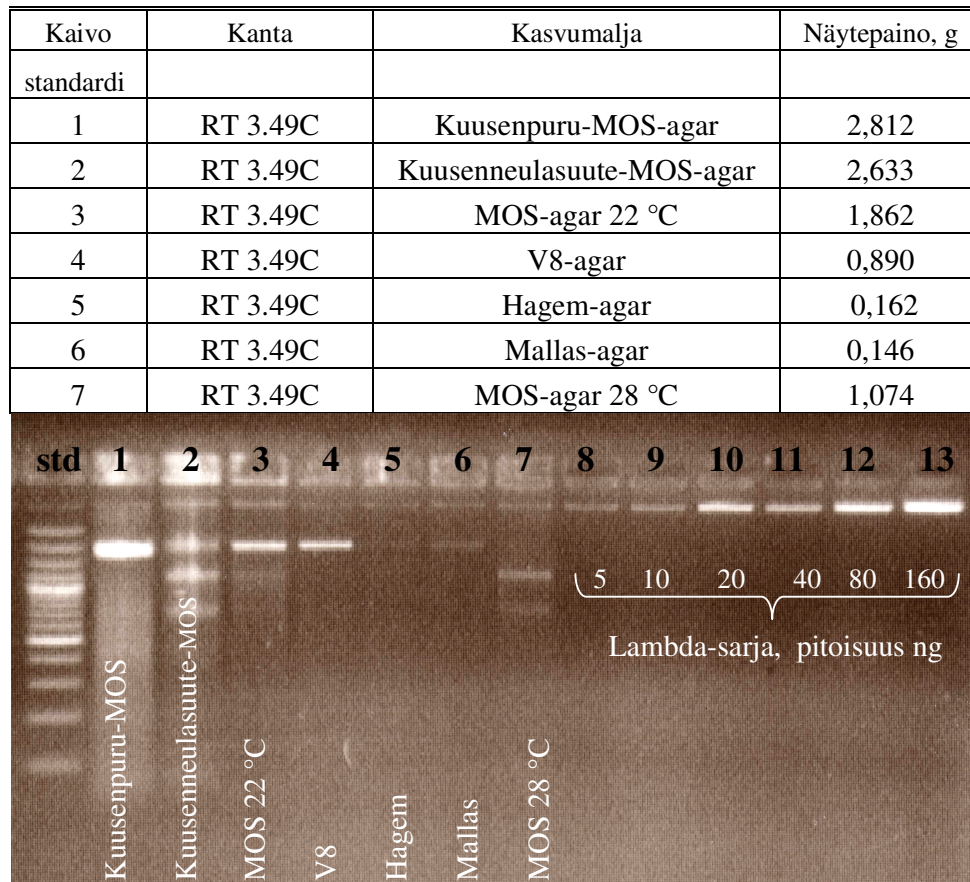


Kuva 17. Juurikäpärähmaston grammamääräisen saannon vertailu kahdesta kasvumaljasta eri kasvualustoilla.

Alhaisista viruspitoisuuksista myöhemmin suoritettavaa Lambda-sarjan vertailua varten valmistetusta 10 µl:n näytetilavuudesta otettiin näytteistä 1, 2, 3 ja 4 laimennokseen 2 µl näyteliuosta. Näistä näytteistä tehtiin laimennokset, jotta viruspitoisuutta voitaisiin arvioida tarkemmin. Näytteistä 5-7 ei tehty laimennoksia, koska ne olivat muutenkin detektion alarajoilla.

Korkeita viruspitoisuuksia arvioitaessa juovien vahvuutta voi olla vaikea arvioida, koska juovan intensiteetti ei välity täydellisesti elektroforeesiajon kuvaan. Siten laimeampien viruspitoisuuksien arviointi voi olla tarkempaa.

Kuvassa 18 on nähtävissä kasvumaljojen viruspitoisuuden vertailun geelielektroforeesiajon tulokset. Kuvassa 18 on myös lueteltu näytenpainot ja Lambda-sarjan osoittamat pitoisuudet juoville 8-13.



Kuva 18. Kasvualustojen viruspitoisuuden vertailun geelielektroforeesiajon tulokset. Näytteeksi kaavittiin kaksi maljaa rihmastoja kultakin kasvualustatyypiltä. Tehokkaimmin viruspitoisuus lisääntyi kuusenpuru-MOS-agarilla.

Kuvassa 18 voimakkaimmat juovat ovat näytteillä 1, 3 ja 4, kuusenpuru-MOS-agarilla, MOS-agarilla 22 °C:ssa ja V8-agarilla. Kokostandardiin verrattuna saanto on juovassa 1 arviolta 150 ng, juovassa 3 arviolta 52 ng ja juovassa 4 arviolta 48 ng. Lambda-sarjaan verrattuna saanto on arviolta 200 ng juovassa 1, 70 ng juovassa 3 ja 30 ng juovassa 4. Näytteen 2 juova voi mahdollisesti ilmaista ribosomaalista RNA:ta tai muuta epäpuhtautta joka on tullut mukaan kaksoisjuoste-RNA:n saostuksessa. Näytteen 2 virussaannoksi kokostandardiin verrattuna arvioidaan 18 ng ja Lambda-sarjaan verrattuna 20 ng.

Näytteen 3 MOS-agar (22 °C) -juova on hieman voimakkaampi näytteen 4 V8-agar-juovaa. Täten kuusenpuru-MOS-agarin virussaanto on korkein ja MOS-agarilla (22 °C) kasvatettaessa virussaanto on hieman parempi kuin V8-agarilla kasvatettaessa.

Heikoimmat tulokset kasvumaljojen viruspitoisuuden vertailusta saatiin näytteillä 5, 6 ja 7, Hagem-agarilla, mallas-agarilla ja MOS-agarilla (28 °C). Kokostandardiin verrattuna juovan 5 heikon pitoisuuden arvioidaan olevan 1 ng ja juovan 6 saannoksi arvioidaan 3 ng. Juovan 7 pitoisuus ei ole luettavissa, joten sen arvioidaan olevan 0 ng.

Lambda-sarjaan verrattaessa viruspitoisuudet olivat arviolta 1 ng juovassa 5, 2 ng juovassa 6 ja 0 ng juovassa 7. Huomionarvoista kuitenkin on, että jopa 0,146 g:n mallas-agar-näyte 6 saatiin detektoitua.

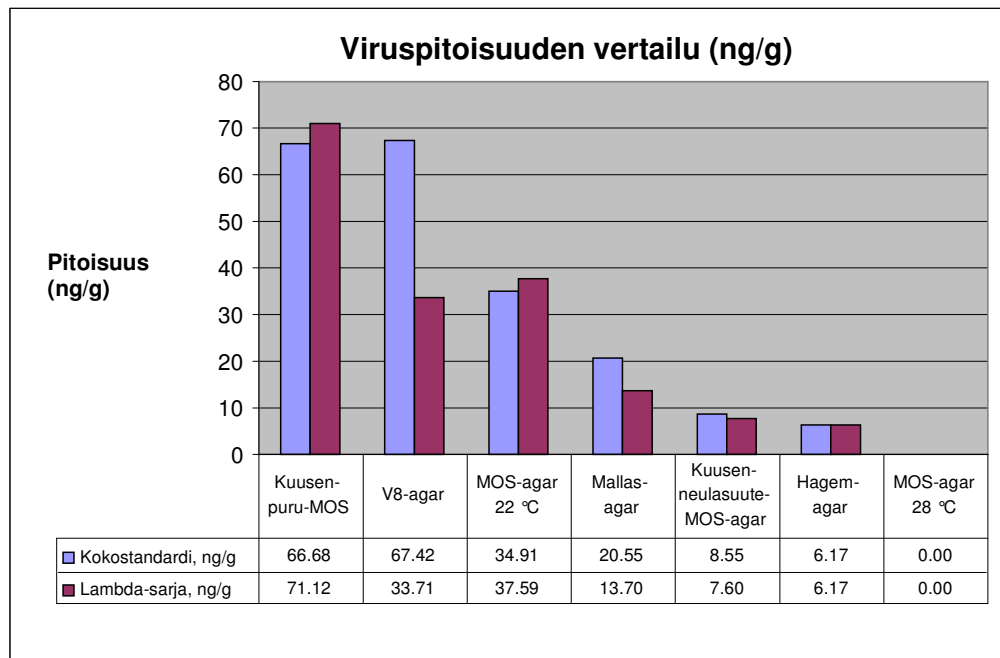
Viruspitoisuuden saantoa vertailtiin kuvassa 19 rihmaston näytepainon saannon suhteen. Viruspitoisuuden vertailussa (ng/g) käytettiin näytteille 5, 6 ja 7 laskukaavaa:

$$\text{arvioitu viruspitoisuus ng / rihmaston saanto g} \quad (1)$$

ja näytteille 1, 2, 3 ja 4, joista oli otettu 2 µl laimennoksiin Lambda-sarjan vertailuun alhaisilla pitoisuuksilla, laskukaavaa:

$$(\text{arvioitu viruspitoisuus ng} / 0,8) / \text{rihmaston saanto g} \quad (2)$$

Kuvassa 19 on esitetty pylväsdiagrammina viruspitoisuuden (ng) tulokset. Kuvasta 19 on nähtävissä että korkein viruspitoisuuden saanto oli kuusenpuru-MOS-agarilla 66,68 - 71,12 ng/g, V8-agarilla 33,71- 67,42 ng/g ja MOS-agarilla (22 °C) kasvatettaessa 34,91- 37,59 ng/g.



Kuva 19. Juurikäpävirususten pitoisuuden vertailu. Pitoisuuden arviointiin on käytetty kokostandardia ja Lambda-sarjaa.

Vaikka kuusenneulasuute-MOS-agarilla oli korkea rihmaston saanto, ks. kuva 17, sen viruspitoisuus oli kuitenkin heikko, ks. kuva 19. Tämä osoittaa, ettei viruspitoisuus lisäänty kaikissa tapauksissa vaikka rihmaston saanto kasvaisi.

Virussaannon vertailu näytteiden laimennoksista Lambda-sarjan avulla

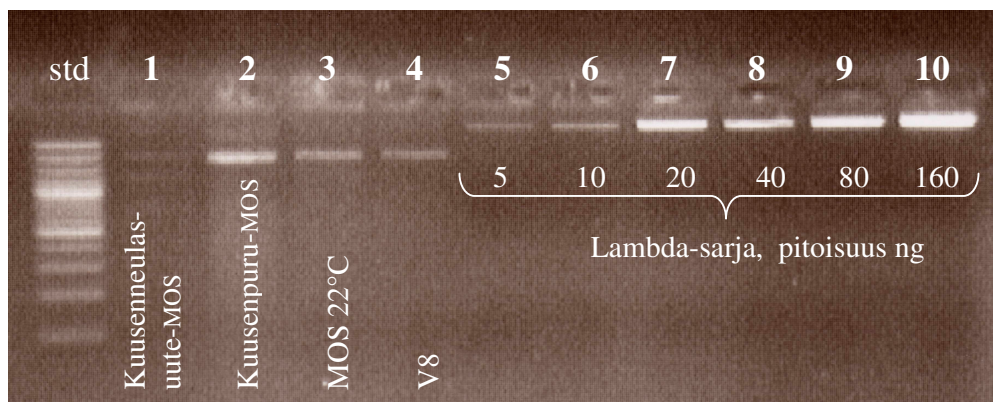
Viruspitoisuutta vertailtiin vielä näytteiden (1/5) laimennoksista eri kasvualustojen välillä. Laimeampien viruspitoisuuksien arviointi voi joissain tapauksissa olla luotettavampaa. Viruspitoisuuden vertailu näytteiden laimennoksista tehtiin seuraaville kasvualustatyypeille:

- kuusenneulasuute-MOS-agar
- kuusenpuru-MOS-agar
- MOS-agar 22 °C
- V8-agar.

10 µl:aan TD:tä liuotetusta näytteestä otettiin 2 µl näytettä laimennossarjaan. Siihen lisättiin 8 µl TD:tä geelielektroforeesiajon kaivoihin pipetoimista varten.

Laimennossarjan pitoisuutta vertailtiin Lambda-sarjan pitoisuutta kuvaaviin juoviin.

Kuvassa 20 on laimennossarjan geelielektroforeesiajon tulokset ja pitoisuuden vertailuun Lambda-sarja.



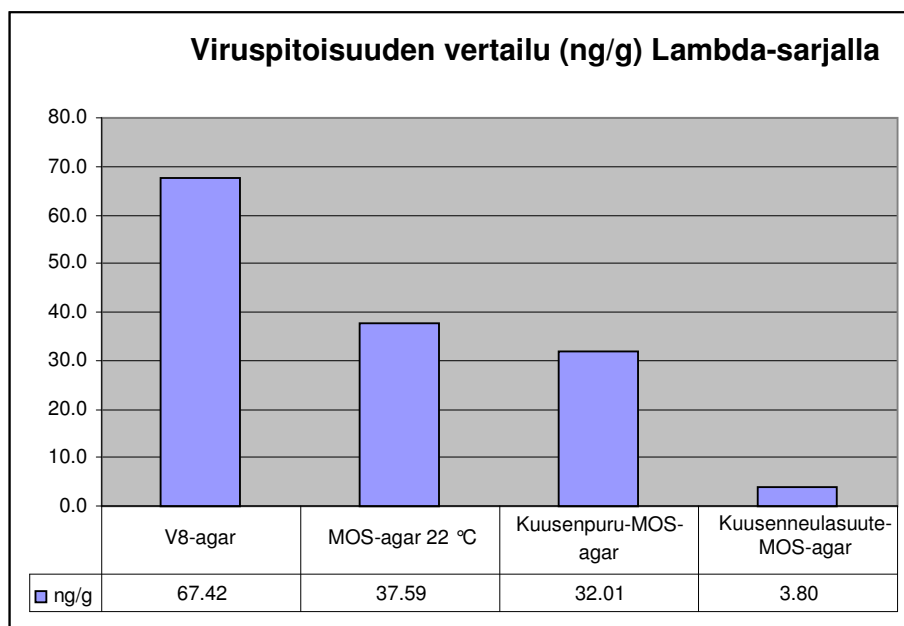
Kuva 20. Laimennossarjan geelielektroforeesiajon tulokset.

Kuvassa 20 kuusenneulasuute-MOS-agarin juova 1 sisältää arviolta 2 ng kaksoisjuoste-RNA:ta. Juova 1 saattaa ilmaista että saostuksessa on tullut mukaan jotakin epäpuhtautta. Kuusenpuru-MOS-agarin juovan 2 arvioidaan olevan pitoisuudeltaan 18 ng. MOS-agarin (22 °C) juovan 3 arvioidaan olevan pitoisuudeltaan 14 ng. V8-agarin juovan 4 arvioidaan olevan pitoisuudeltaan 12 ng.

Kuvassa 21 on Lambda-sarjan arvoihin perustuva virussaannon vertailu ng/g pylväsdiagrammina. Virussaannon laskemiseen käytettiin kaavaa:

$$(\text{arvioitu viruspitoisuus ng} / 0,2) / \text{rihmaston saanto g} \quad (3)$$

Kuvasta 21 on nähtävissä että suurin virussaanto oli V8-agarilla ja MOS-agarilla (22 °C). Aiemmissä tuloksissa korkein virussaanto oli kuusenpuru-MOS-agarilla Lambda-sarjalla arvioituna 71,12 ng/g, ks. kuva 19, kun se nyt oli 32,01 ng/g, ks. kuva 21. MOS-agarin (22 °C) ja kuusenneulasuute-MOS-agarin viruspitoisuudet vastaavat kuitenkin kuvassa 21 melko hyvin aiempia tuloksia ks. kuva 19.



Kuva 21. Virussaannon vertailu (ng/g) Lambda-sarjan juovien pitoisuuden vertailuun perustuen.

Taulukossa 7 on esitetty rihmaston paino / 1 ja 2 maljaa, arvioitu virussaanto ng, sekä laskettu virussaanto ng/g. Taulukossa 8 on taas esitetty, paljonko rihmasto tulisi käyttää virussaantoa 100 tai 200 ng varten. Lisäksi taulukossa 8 esitetään, kuinka monta kpl kasvumaljoja tarvittaisiin kyseisten viruspitoisuuksien saavuttamiseen.

Taulukko 7. Rihmaston paino / 1 ja 2 maljaa sekä arvioitu virussaanto ng ja laskettu virussaanto ng/g.

Kasvualusta	g / 2 maljaa	g/malja	Arvioitu virussaanto ng	ng /g
V8-agar	0.89	0.45	2	67.42
MOS-agar 22 °C	1.86	0.93	18	37.59
Kuusenpuru-MOS-agar	2.81	1.41	14	32.01
Neulasuute-MOS-agar	2.63	1.32	12	3.80

V8-agarilla saatiin korkein virussaanto 67,42 ng/g juurikäpärihmastosta ks. kuva 21. Tämä tarkoittaa sitä, että jatkotutkimuksiin sekvenssimäärytyksiä varten 100 - 200 ng:n virussaantoon tarvittaisiin 1,5 - 3 g rihmasto V8-agarilla kasvatettaessa, ks. taulukko 8. V8-kasvumaljojen rihmaston saanto oli kuitenkin suhteellisen heikkoa, joten sekvenssimäärytyksiin tarvittaisiin jopa 3,3 - 6,7 kpl V8- kasvumaljoja.

Taulukko 8, Rihmaston painon g määrä virussaantoa 100 - 200 ng kohti ja kasvumaljojen kpl määrä viruspitoisuutta 100 - 200 ng kohti.

Kasvu-alusta	Rihmaston paino g virussaantoon 100 ng (100ng/ (ng/g))	Rihmaston paino g virussaantoon 200 ng (200ng/ (ng/g))	Kasvumaljojen kpl määrä / 100 ng viruspitoisuuteen	Kasvumaljojen kpl määrä / 200 ng viruspitoisuuteen
V8-agar	1.5	3.0	3.3	6.7
MOS-agar 22 °C	2.7	5.3	2.9	5.7
Kuusenpuru-MOS-agar	3.1	6.2	2.2	4.4
Kuusen-neulasuute-MOS-agar	26.3	52.6	20.0	40.0

Kasvualustojen vertailuun käytetty MOS-agar antoi virussaannon tulokseksi 37,59 ng/g (ks. taulukko 7), joten sekvenssimääriytyksiin tarvittaisiin 2,7 - 5,3 g rihmastoaa ks. taulukko 8. Kasvumaljoja tarvittaisiin siten 2,9 - 5,7 kpl tämän näytemäärään saavuttamiseksi.

Voimakkaasti rihmaston kasvua lisänneen kuusenpuru-MOS-agarin virussaanto oli 32,01 ng/g ks. taulukko 7. Sekvenssimääriytyksiin rihmastoaa tarvittaisiin 3,1 - 6,2 g eli 2,2 - 4,4 kpl kasvumaljoja. Kuusenpuru-MOS-agarilla kasvatettaessa tarvitsisi siten vähiten kasvumaljoja 100 ja 200 ng:n viruspitoisuuden saavuttamiseen, ks. taulukko 8.

Taulukossa 7 neulasuute-MOS-agarin virussaanto oli ainoastaan 3,8 ng/g. Sekvenssimääriytyksiin tarvittaisiin siten 26,3 – 52,6 g rihmastoaa, eli 20 – 40 kpl kasvumaljoja ks. taulukko 8. Tämä kertoo neulasuute-MOS-agarin sopimattomuudesta juurikäpävirususten ja rihmaston määrän lisäämiseen.

Tulokset ovat suuntaa antavia, koska merkittävänä virhelähteenä voidaan pitää tilavuuden virhettä johtuen pienistä näytetilavuuksista. Kattavampi tulosten vertailu virussaannolle (ng/g) voitaisiin tehdä käyttämällä useampia näytteiden lähtöpainoja.

Pitoisuuden vertailuun käytettyjen kokostandardin ja Lambda-sarjan tuloksista Lambda-sarjan tulokset arvioitiin suuntaa antavammaksi, kuin kokostandardin tulokset. Lambda-sarjassa oli useampia eri pitoisuuden osoittavia juovia joihin verrata, kuin kokostandardissa. Tämän vuoksi kokostandardin antamat viruspitoisuuden arviot ovat varsin karkeita, kun ne Lambda-sarjan kohdalla ovat suuntaa antavia arvioita.

Juurikäpärähmaston viruspitoisuutta arvioitaessa saataisiin luotettavampia tuloksia, jos rihmaston näytepaino valittaisiin siten, että sen sisältämä viruspitoisuus olisi vertailuun käytettävän kokostandardin tai Lambda-sarjan osoittamien pitoisuuksien rajoissa. Tämä olisi kuitenkin mahdollista vasta viruspitoisuuden alustavan arvioinnin jälkeen.

5 Yhteenveto

Tämän työn kasvualustakokeet osoittivat, että kuusenjuurikäävän rihmaston kasvua voidaan useissa tapauksissa nopeuttaa ja lisätä käyttämällä sopivaa kasvualustaa. Saatiin myös selville, että juurikääpävirusen pitoisuutta voidaan lisätä käyttämällä sopivaa kasvualustatyyppejä. Epäsopiva kasvualusta tai -olosuhteet puolestaan heikentävät rihmaston kasvua ja alentavat viruksen pitoisuutta.

Lupaavimmat tulokset saatiin käytettäessä kuusenpurua ja V8-vihannesmehua, joissa oli suurimmat viruspitoisuuden saannot. Sekä rihmaston että viruspitoisuuden saannossa esiintyi kuitenkin vaihtelua eri kasvualustoilla juurikääpäkannasta riippuen.

Pienten näytemäärien, 1-3 g, takia kaksoisjuoste-RNA-eristys oli erittäin haastavaa. Tuloksista on nähtävissä, että näytteiden pitoisuuksissa voi esiintyä vaihtelua eristyksessä tapahtuvien virhetekijöiden vuoksi. Koska näytetilavuudet olivat pieniä, 2-10 µl, tilavuuden virhe voi olla merkittävä virhelähde tuloksissa.

Merkittävimpinä virhetekijöinä voidaan mainita agarin joutuminen näytteeseen, sellofaanikalvon painon vaikutus näytemäärään sitä vähentävästi ja itse eristystyössä tapahtuvat virhetekijät, kuten liian suuri EtOH-pitoisuuden käyttö pienillä näytemäärillä. Liian lyhyen kaksoisjuoste-RNA-saostusajan vaikutusta -20 °C:ssa pienistä viruspitoisuuksista eristettäessä olisi tärkeä tutkia jatkokokeilla: voiko se mahdollisesti vaikuttaa tuloksiin niitä heikentävästi.

Viruksen katoamisella 28 °C:ssa kasvatettaessa on tutkimuksellista merkitystä. Korkeammassa lämpötilassa kasvattamalla virus voidaan mahdollisesti saada poistettua sienirihmastosta, jolloin voidaan tutkia samaa juurikääpäkantaa viruksen kanssa ja ilman virusta. Tällöin voidaan nähdä, vaikuttaako viruksen läsnäolo sienikannan kasvuun. Kaksoisjuoste-RNA:n katoaminen 28 °C:ssa kasvatettaessa johti juurikääpärihmastojen kasvun siirtämisen huoneenlämpötilasta 20 °C:seen. Jatkotutkimuksissa virus oli saatu poistettua juurikääpärihmastosta 30 °C:n kasvatuksessa.

Jatkotutkimuksissa testatuista kasvualustoista voidaan mahdollisesti käyttää kuusenpuru-MOS-agaria tai V8-agaria alhaisen viruspitoisuuden omaaville juurikääpäkannoille korkeamman viruspitoisuuden saamiseksi sekvenssimäärittäystä varten. Myös uusia erilaisia kasvualustoja on testattu paremman viruspitoisuuden saamiseksi tämän opinnäytetyön tulosten valossa.

Lähteet

- 1 Abbas, H.K. ym. Mycotoxin Production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Mycopathologia* 147/ 1999, s. 97-104.
- 2 Asiegbu, F. O., Adomas, A. & Stenlid, J. Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.l. *Molecular Plant Pathology* 6 (4)/ 2005, s. 395-409.
- 3 Assessing the Incidence of Butt Rot in Norway Spruce in Southern Finland. (WWW-dokumentti.) Mattila, Ulla & Nuutinen, Tuula. *Silva Fennica*. <www.metla.fi/silvafennica/full/sf41/sf411029.pdf> 2007. Luettu 13.10.2008.
- 4 Biologinen kantokäsittelyaine Rotstop®. (WWW-dokumentti.) Verdera Oy. <www.verdera.fi/body_rotstop.html. Luettu 15.3.2008.
- 5 Gene Ruler™ DNA Ladders. (www-dokumentti.) Fermentas. <www.globalscience-online.co.nz/job/FermentasGeneRuler.pdf> Luettu 13.10.2008.
- 6 Ghabrial, S. A. Origin, Adaption and Evolutionary Pathways of Fungal Viruses. *Virus Genes* 16 (1)/ 1998, s. 119-131.
- 7 Heino, Jyrki & Vuento, Matti. Biokemian ja solubiologian perusteet. WSOY Oppimateriaalit Oy, 2007.
- 8 Holdenrieder, O. & Greig, B.J.W. Biological Methods of Control. *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*, s. 235-258, UK: CAB International, 1998.

- 9 Ihrmark, K. Double-stranded RNA Elements in the Root Rot Fungus *Heterobasidion annosum*. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, 2001.
- 10 Ihrmark, K., Zheng, J., Stenström, E. & Stenlid, J. Presence of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Forest Pathology*. 31/ 2001, s. 387-394.
- 11 Ihrmark, K., Johannesson, H., Stenström, E. & Stenlid, J. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology*. 36/ 2002, s. 147-154.
- 12 Ihrmark, Katarina, Stenström, Elna & Stenlid, Jan. Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*. 108 (2)/ 2004, s. 149-153.
- 13 Juurikäpää kuusella. Kuusen ja männyn lahovikaisuus ja sen torjunta. (www-dokumentti) <www.metla.fi/metinfo/metsienterveys/lahontorjunta/> Päivitetty 22.5.2006. Luettu 20.2.2008.
- 14 Kumi, J. & Lang, K.J. The susceptibility of various spruce species to *Rhizosphaera kalkhoffii* and some cultural characteristics of the fungus in vitro. *European Journal of Forest Pathology*. 9/ 1979, s. 35-46.
- 15 Kurkela, Timo. *Lophodermium seditiosum* Minter *et al.*-sienen esiintyminen männynkaristeen yhteydessä. *Folia Forestalia*. 393/ 1979, s. 2-10.
- 16 Kurkela, Timo. *Metsän taudit. Metsäpatologian perusteet*. Tampere: Otatieto Oy, 1994.
- 17 Kurkela, Timo. *Sienitaudit ja ravinnehäiriöt*. (WWW-dokumentti.) <www.kauhajoki.fi/metsiensoidenkirja/pilkotut/179-183.pdf >1999. Luettu 19.9.2008.

- 18 Kuusen tyvilaho (*Heterobasidion parviporum*). (WWW-dokumentti.)
<www.metla.fi/metinfo/metsienterveys/lajit_kansi/heanns-n.htm> Päivitetty
14.1.2005. Luettu 20.2.2008.
- 19 Kuusen tyvilaho. (WWW-dokumentti.) Kari Korhonen.
<www.metla.fi/metinfo/metsienterveys/lahontorjunta> Päivitetty 22.5.2006.
Luettu 25.10.2008.
- 20 MacDonald, William & Double, Mark. Hypovirulence: use and limitations as a
chestnut blight biological control. (WWW-dokumentti)
<[http://chestnut.cas.psu.edu/Meetings/NPS/proceedings/first_eds/10-
MacDonald%20Chestnut%20workshop%20manu.pdf](http://chestnut.cas.psu.edu/Meetings/NPS/proceedings/first_eds/10-MacDonald%20Chestnut%20workshop%20manu.pdf)> 2006. Luettu 19.9.2008.
- 21 Maijala, Pekka. *Heterobasidion annosum* and wood decay: Enzymology of
cellulose, hemicellulose, and lignin degradation. Doctoral Thesis. University of
Helsinki, Department of Biosciences, Division of Plant Physiology, 2000.
- 22 McCabe, Patricia M., Pfeiffer, Pierre & Van Alfen, Neal K. The influence of
dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. Trends in
microbiology. 7 (9)/ 1999, s. 377-381.
- 23 McClelland, Carol ym. Isolation and Characterization of the *Cryptococcus*
neoformans MATa Pheromone Gene. Genetics. 160/ 2002, s. 935-947.
- 24 Morris, T.J. & Dodds, J.A. Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA
from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. Phytopathology. 69/ 1979, s. 854-
858.
- 25 Müller M.M., Kantola, R. & Kitunen V. Combining sterol and fatty acid profiles
for the characterization of fungi. Mycological Research. 98 (6)/ 1994, s. 593-
603.

- 26 Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. (WWW-dokumentti.) EDU.fi
<www.edu.fi/oph/abc/dna/nhpuid1.html>. Luettu 21.2.2008.
- 27 Nukleiinihappojen geielektroforeesi. 2006. (WWW-dokumentti.) Solunetti.
<www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_geielektroforeesi/2/>
2006. Luettu 21.2.2008.
- 28 Nuss, Donald L. & Koltin, Yigal. Significance of dsRNA Genetic Elements in
Plant Pathogenic Fungi. *Phytopathology*. 28/ 1990, s. 37-58.
- 29 Semancik, J.S. Viroid purification and characterization. (WWW-dokumentti.) <
www.fao.org/docrep/T0601E/T0601E0m.htm> 1991. Luettu 23.9.2008.
- 30 Sivelä, Carita & Saarinen Tarja. Laborantin mikrobiologia. Helsinki: VAPK-
kustannus, 1992.
- 31 Suominen, Ilari & Ollikka, Pauli. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet.
Helsinki: Opetushallitus, 2003.
- 32 Tuomivirta, Tero. Analytical isolation of dsRNA from fungal pure cultures.
Työohje. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos, 2006.
- 33 Tuomivirta, Tero. Polyphyletic viruses of *Gremmeniella abienta* type A, a major
pathogenic fungus of coniferous trees. Doctoral Thesis. Vantaa: Finnish Forest
Research Institute, 2004.
- 34 Turpeenoja, Leena. Biokemiaa virtsa-aineesta lääkemaitoon. Vantaa:
Opetushallitus, 2005.
- 35 Uotila, Antti & Kankaanhuhta, Ville. Metsätuhojen tunnistus ja torjunta.
Hämeenlinna: Kustannusosakeyhtiö Metsälehti, 2003.

- 36 Uzunovic, Adam, Seifert, Keith A., Kim, Seong Hwan & Breuil, Colette. *Ophiostoma setosum*, a common sapwood staining fungus from western North America, a new species of the *Ophiostoma piceae* complex. *Mycological Research*. 104 (4)/ 2000, s. 486-494.
- 37 Vainio, E.J. Ecological impacts of *Phlebiopsis gigantea* biocontrol treatment against *Heterobasidion* spp. as revealed by fungal community profiling and population analyses. PhD thesis. University of Helsinki, Faculty of Biosciences. *Dissertationes Forestales* 63, 2008.
- 38 Vainio, Eeva. FT, tutkija, METLA, Vantaa. Keskustelu 10.10.2008
- 39 Valkonen, Jari, Bremer, Katri & Tapio, Eeva. *Kasvi sairastaa*. Helsinki: Yliopistopaino, 1996.
- 40 Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R. & Hutterman, A. *Heterobasidion annosum: biology, ecology, impact and control*. UK: CAB International, 1998.
- 41 Zhao, J & Kwan H.S. Characterization, Molecular Cloning, and Differential Expression Analysis of Laccase Genes from the Edible Mushroom *Lentinula edodes*. *Applied and environmental microbiology*. 65 (11)/ 1999, s. 4908-4913.