

Metsämaan kantasienien puhdasviljely

Peitsa Mikola

Metsäntutkimuslaitos, Helsinki

Johdanto

Maassa elävien makrosienien toiminnasta ja ekologisesta merkityksestä on vaikea tehdä varmoja johtopäätöksiä pelkästään kenttätutkimusten perusteella. Itiömät ilmestyvät näkyviin tietyssä aikana vuodesta muutamiksi päiviksi tai viikoiksi, mutta muun osan vuotta sienet ovat näkymättömissä mikroskooppisina rihmastoina, joiden lajia on useimmiten mahdollon määrittää ja siten myös selvittää eri lajien ominaisuuksia. Metsämaassa elävä lajisto on toiminnaltaan hyvin monenlaista, kuten tähänastiset tutkimukset ovat osoittaneet. Niinpä monet lajit muodostavat puiden kanssa mykorrhizojen, toiset ovat humuksen muodostajia hajottamalla karikkeiden selluloosaa ja ligniiniä, muutamat lajit tunkeutuvat maasta käsin puiden juuristoihin vaaralliseksi loisiksi jne. Eri lajien osuuden selvittäminen maan monipuolisessa sienitoiminnassa vaatii puhdasviljelmillä suoritettavia kokeita, ja niitä varten on kyettävä eristämään ja viljelemään haluttuja sienilajeja.

Maasta eristetyn rihmastoin lajin määrittäminen onnistuu vain harvoissa tapauksissa. Lajiltaan tunnettuja puhdasviljelmiä saadaan lähtemällä joko itiöistä tai itiöemästä steriilisti otetusta rihmastokappaleesta, joka sopivalla ravintoalustalla rupeaa kasvamaan.

Koprofiilisten ja ksylofiilisten kantasienien itiöt itävät yleensä hyvin nopeasti, ja niistä on helppo saada itiöviljelmiä (kts. esim. Brefeld 1908, Bavendamm 1936). Sen sijaan metsämaassa elävistä sienistä vain muutamien saprofyyttisten lajien (*Marasmius*, *Mycena*) kasvattaminen itiöistä onnistuu vaikeuksitta (Lindeberg 1944, Fries 1949), ja useimpien, etenkin mykorrhizasienien kuuluvien, itiöitä ei toistaiseksi ole lainkaan saatu itämään agar-alustalla (Melin 1936), tai se on onnistunut vain erikoisten aktivaattorien avulla (Fries 1943). Sen vuoksi on useimmissa maan kantasieniä koskeissa fysiologisissa kokeissa käytetty itiöemän sisäsolukosta kasvatettuja puhdasviljelmäkantoja. Tällä menetelmällä on sekin etu, että siten saadaan varmasti samoja kantoja, joita luonnossakin esiintyy.

Sienien puhdasviljelmien kasvattamisen itiöemien solukosta on kehittänyt Brefeld (1908). Tämä menetelmä, josta Duggar (1905) käytti nimitystä »tissue-culture method», saavutti käytännöllistä merkitystä kaupallisia herkkusieniviljelmiä varten sopivien kantojen hankkimisessa. Viljelty herkkusieni (*Psalliota hortensis*) onkin tällä tavoin helppo eristää ja kasvattaa, samoin kuin monet muut, etupäässä koprofiiliset tai ksylofiiliset lajit. Sen sijaan monien metsämaan sienien

osalta yritykset aluksi epäonnistuivat, esim. suvut *Boletus*, *Amanita*, *Lactarius*, *Russula* ja *Cortinarius* mainitaan sellaisina sieninä, joita ei esitettyllä tavalla saatu kasvamaan. Monien tällaisten vaikeammin viljeltävien sienien kasvattaminen itiöemistä onnistui ensi kerran Melinille, joka on laajassa mitassa käyttänyt mentelmää puiden mykoritsasymbiontteja etsiessään (Melin 1922—1925).

Melinin ja hänen oppilaittensa tutkimukset ovat koskeneet pääasiassa metsämaassa eläviä sieniä, osittain humus-saprofyyttejä, osittain puiden mykoritsasieniä. Niinpä Lindberg (1944) onnistui itiöemistä eristämään 15 eri *Marasmius*-lajia sekä useita kymmeniä muita karikkeiden hajoitusta suorittavia sieniä (Lindberg 1946). Laajimpia eristyskokeita suoritti Modess (1941) pyrkien kasvattamaan erityisesti mykoritsain muodostajiksi epäiltyjä ja samalla vaikeimmin viljeltäviä sieniä. Modess kokeili kaikkiaan 140 kantasienilajia, joista hän pystyi eristämään 61 lajia.

Melin käytti varhaisemmissa eristyskokeissaan ravintoalustana mallasuutetta, mallasuute-liivatetta tai -agaria. Modess (1941, s. 16) kokeili erilaisia ravintoalustoja ja totesi parhaaksi seuraavan muunnelman Hagemin (1910) ravintoliuksesta:

KH_2PO_4	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NH_4Cl	0.5 g
FeCl_3 (1% liuos)	0.5 ml
Glukoosia	5 g
Mallasuutetta	5 g
H_2O	1000 ml

Tätä liuosta, josta seuraavassa käytetään nimitystä Hagem-liuos, joko sellaisenaan taikka lisättynä siihen 1.5 % agaria (Hagemagar), on viime aikoina yleisimmin käytetty metsämaan kantasienien eristämiseen ja kantaviljelmien säilyttämiseen (esim. Norrans 1949, 1950). Agar-alusta on sienien kasvattamisessa liuosta käytännöllisempi mm. siitä syystä, että liuosviljelämä yleensä tuhoutuu infektoituessaan ulkoa päin, mutta agarilla saadaan kasvatettava sieni usein pelastetuksi puhtaana infektoituneestakin maljasta. Kuitenkin, kuten Modess (1941, s. 17) mainitsee, muutamia vaikeasti kasvatettavia sieniä, mm. *Amanita*-, *Lactarius*- ja *Russula*-lajeja, on saatu aloittamaan kasvunsa e.m. liuoksessa,

mutta ei agarilla. Useimmat näin eristetyt sienet ovat jatkaneet kasvuaan liuoksesta agarille siirrettyinä, mutta muutamat lajit eivät ole suostuneet kasvamaan agarilla lainkaan.

Modess (l.c., s. 15) on myös todennut, että sienien eristäminen onnistuu parhaiten, jos solukkokappale otetaan lakin ja jalan yhtymäkohdasta. Erittäin tärkeä seikka myös on, että eristämiseen käytetään nuoria, kasvavia itiöemiä. On turha yrittää kasvattaa sieniä vanhoista, kasvunsa lopettaneista itiöemistä, jotka sitäpaitsi usein ovat bakteerien infektoimia.

Suoritettuja kokeita

Kirjoittaja on 10 vuoden aikana (1945—54, pääasiassa vuosina 1948, -52 ja -54)¹ kokeillut tavallisten metsämaassa kasvavien kantasienien puhdasviljelyä itiöemistä. Kokeet ovat koskeneet erilaisiin ekologisiin ryhmiin kuuluvia lajeja, kuten tunnettuja ja todennäköisiä mykoritsasieniä, humus-saprofyyttejä ja joitakin kannoissa kasvavia ksylofiilisiä lajeja, yhteensä noin 150 sienilajia. Ne ovat suurimmaksi osaksi samoja lajeja, joiden kasvattamista Melin, Modess ja muut ovat kokeilleet, mutta joukossa on myös ennen kokeilemattomia lajeja, ja kokeet antavat lisävalaistusta ennen kokeiltujen sienien kasvattamisesta.

Kokeissa käytettiin hyväksi Modessin kokemuksia, ts. solukkokappale otettiin yleensä lakin keskeltä, lakin ja jalan yhtymäkohdasta (joissakin tapauksissa lisäksi lakin reunasta ja jalasta). Ravintoalustana, johon sienikappale sijoitettiin, käytettiin autoklaavissa steriloitua Hagem-liuosta tai -agaria, useimmiten molempia rinnan. Alkuaikoina (1945—46) kokeiltiin myös 2.5 % mallasuutetta ja -agaria, mutta Hagem-liuos osoitautui selvästi paremmaksi, kuten Modessinkin kokeissa.

Seuraavassa on luettelo kokeilluista sienilajeista. Luetteloon on merkitty + niiden sienien kohdalle, joista saatiin puhdasviljelämä, sekä —, jos yritykset ovat epäonnistuneet. Milloin ei erikseen ole huomautettu, on sieni alkanut kasvaa sekä liuoksessa että agarilla.

¹ Vuoden 1954 kokeissa avusti yliopp. Veikko Hintikka.

<i>Dacryomycetes</i>			<i>Cortinarius armillatus</i> Fr. + ³	<i>L. pyrogalus</i> (Bull.) —
<i>Calocera viscosa</i> (Pers.) —			<i>C. bolaris</i> (Pers.) —	<i>L. repraesentaneus</i> Britz. —
<i>Hymenomycetes</i>			<i>C. brunneus</i> (Pers.) —	<i>L. rufus</i> (Scop.) + ²
<i>Amanita mappa</i> (Batsch) (+) ¹			<i>C. camphoratus</i> Fr. —	<i>L. subdulcis</i> (Pers.) + ²
<i>A. muscaria</i> (L.) +			<i>C. cinnamomeus</i> (L.) —	<i>L. torminosus</i> (Schaeff.) +
<i>A. pantherina</i> (DC) (+) ¹			<i>C. collinitus</i> (Pers.) —	<i>L. trivialis</i> Fr. +
<i>A. porphyria</i> (A. & S.) +			<i>C. elatior</i> Fr. —	<i>L. turpis</i> (Weinm.) + ²
<i>A. rubescens</i> (Pers.) +			<i>C. gentilis</i> Fr. —	<i>L. uvidus</i> Fr. (+) ¹
<i>A. vaginata</i> (Bull.) —			<i>C. pholideus</i> Fr. —	<i>L. vellereus</i> Fr. —
<i>A. virosa</i> Fr. —			<i>C. sanguineus</i> (Wulf.) —	<i>L. vietus</i> Fr. + ²
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) +			<i>C. semisanguineus</i> Fr. +	<i>Lepiota naucina</i> Fr. +
<i>Boletus badius</i> Fr. +			<i>C. traganus</i> Fr. —	<i>L. rhacodes</i> (Vitt.) +
<i>B. bovinus</i> Fr. +			<i>C. violaceus</i> (L.) —	<i>Limacium (Hygrophorus)</i>
<i>B. edulis</i> Bull. +			<i>Cystoderma (Lepiota)</i>	<i>eburneum</i> (Bull.) +
<i>B. elegans</i> Schum. +			<i>amianthinum</i> (Scop.) +	<i>L. erubescens</i> (Fr.) —
<i>B. felleus</i> Bull. +			<i>C. carcharias</i> (Pers.) +	<i>L. hypothecum</i> (Fr.) —
<i>B. luteus</i> L. + ²			<i>C. granulorum</i> (Batsch) +	<i>L. olivaceo-album</i> (Fr.) —
<i>B. piperatus</i> Bull. + ³			<i>Flammula penetrans</i> Fr. +	<i>L. pustulatum</i> (Pers.) —
<i>B. rufus</i> Schaeff. +			<i>Galera hypnorum</i> (Schr.) (+) ⁴	<i>Marasmius androsaceus</i>
<i>B. sanguineus</i> With. + ²			<i>Gomphidius glutinosus</i>	(L.) +
<i>B. scaber</i> Bull. +			Schaeff. (+) ¹	<i>M. epiphyllus</i> Fr. +
<i>B. subtomentosus</i> Fr. +			<i>G. viscidus</i> L. (+) ⁴	<i>M. perforans</i> (Hoffm.) +
<i>B. variegatus</i> Swartz +			<i>Hydnum aurantiacum</i>	<i>Mycena aurantiummarginata</i>
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr. (+)			A. & S. (+) ⁴	(Fr.) —
<i>C. tubaeformis</i> Fr. —			<i>H. imbricatum</i> L. —	<i>M. cinerella</i> Karst. —
<i>C. umbonatus</i> Gmel. +			<i>H. repandum</i> L. (+) ⁴	<i>M. epipterygia</i> (Scop.) + ³
<i>Clavaria fistulosa</i> Fr. —			<i>H. rufescens</i> Pers. +	<i>M. galerigulata</i> (Scop.) —
<i>C. flava</i> Schaeff. (+) ⁴			<i>Hygrocybe (Hygrophorus)</i>	<i>M. galopus</i> (Pers.) +
<i>C. ligula</i> Schaeff. +			<i>laeta</i> (Pers.) +	<i>M. lactea</i> (Pers.) +
<i>Clitocybe candicans</i>			<i>H. miniata</i> Fr. —	<i>M. lineata</i> Fr. +
(Pers.) (+) ⁴			<i>H. nitrata</i> (Pers.) —	<i>M. metata</i> Fr. +
<i>C. cerussata</i> Fr. +			<i>Hypholoma candolleianum</i>	<i>M. pura</i> (Pers.) + ²
<i>C. clavipes</i> (Pers.) +			Fr. —	<i>M. rosella</i> Fr. + ²
<i>C. fumosa</i> (Pers.) +			<i>H. capnoides</i> Fr. —	<i>M. sanguinolenta</i>
<i>C. gilva</i> (Pers.) +			<i>H. fasciculare</i> (Huds.) +	(A. & S.) +
<i>C. infundibuliformis</i>			<i>H. sublateralitium</i> (Schaeff.) +	<i>M. vulgaris</i> (Pers.) +
(Schaeff.) +			<i>Inocybe geophylla</i> Sow. —	<i>Omphalia campanella</i>
<i>C. inversa</i> (Scop.) + ²			<i>Laccaria (Clitocybe)</i>	(Batsch) (+) ⁴
<i>C. metachroa</i> Fr. —			<i>laccata</i> (Scop.) +	<i>Paxillus atrotomentosus</i>
<i>C. odora</i> (Bull.) +			<i>Lactarius camphoratus</i>	(Batsch) —
<i>Clitopilus prunulus</i>			(Bull.) —	<i>P. involutus</i> (Batsch) +
(Scop.) +			<i>L. deliciosus</i> (L.) +	<i>Pholiota confragosa</i> Fr. —
<i>Collybia butyracea</i> (Bull.) +			<i>L. flexuosus</i> Fr. + ³	<i>P. mutabilis</i> Schaeff. +
<i>C. confluens</i> (Pers.) +			<i>L. fuliginosus</i> Fr. +	<i>Polyporus ovinus</i>
<i>C. dryophila</i> (Bull.) +			<i>L. glyciosmus</i> Fr. —	(Schaeff.) —
<i>C. maculata</i> (A. & S.) —			<i>L. helvus</i> Fr. —	<i>Psalliota augusta</i> Ricken +
<i>C. platyphylla</i> Fr. —			<i>L. lignyotus</i> Fr. —	<i>P. silvicola</i> + ²
<i>C. rancida</i> Fr. +			<i>L. mammosus</i> Fr. —	<i>Rhodophyllus cetratus</i> (Fr.) —
<i>C. tenacella</i> (Pers.) +			<i>L. mitissimus</i> Fr. —	<i>Rozites (Pholiota) caperata</i>
			<i>L. piperatus</i> (Scop.) —	Pers. —

¹ Sieni alkoi kasvaa luoksessa, mutta kasvu pysähtyi agarille siirrettynä.

² Alkoi kasvaa vain luoksessa, mutta kasvu jatkui agarille siirrettynä.

³ Alkoi kasvaa agarilla, mutta ei luoksessa.

⁴ Sienirihmasto alkoi kasvaa, mutta sienestä tuli kasvualustaan myös bakteeri-infektio, josta sientä ei saatu eristetyksi.

<i>Russula aeruginea</i> Fr.	—	<i>S. albonitens</i> Fr.	+	<i>T. rutilans</i> (Schaeff.)	—
<i>R. claroflava</i> Grove	—	<i>S. depilata</i> Fr.	+	<i>T. saponaceum</i> Fr.	—
<i>R. consobrina</i> Fr.	+ ²	<i>Tricholoma album</i>		<i>T. vaccinum</i> (Pers.)	+
<i>R. emetica</i> (Pers.)	—	(Schaeff.)	—	<i>T. virgatum</i> Fr.	+ ²
<i>R. foetens</i> (Pers.)	—	<i>T. decorum</i> Fr.	—		
<i>R. integra</i> Fr.	—	<i>T. equestre</i> (L.)	(+) ¹	<i>Gasteromycetes</i>	
<i>R. paludosa</i> Britz.	—	<i>T. inamoenum</i> Fr.	+ ²	<i>Lycoperdon gemmatum</i>	
<i>Stropharia aeruginosa</i>		<i>T. nudum</i> (Bull.)	+	Batsch	
(Curt.)	+	<i>T. pessundatum</i> Fr.	+	<i>L. nigrescens</i> Pers.	
				+	

Ne muutamat kokeet, mitä kirjoittaja on suorittanut puissa kasvavien kääpäsiementen viljelemiseksi itiöemistä (*Polyporus betulinus* (Bull.), *Fomes annosus* Fr., *F. unguatus* Schaeff. ja *Trametes cinnabarina* Jacq.), ovat järjestään johtaneet positiiviseen tulokseen, mikäli itiöemä ei ole sisästä ollut bakteerien infektoima.

Muutamia edellä luetelluista sienistä on kokeiltu vain kerran tai pari, muutamia taas vuosien mittaan jopa kymmenkunta kertaa. Monen lajin eristäminen onnistui useista yrityksistä huolimatta vain kerran ja vain harvojen jokaisella yrittämällä. Kokeen tulos saattaa riippua satunnaisista tekijöistä, kuten itiöemän iästä ja koosta, eikä siis muutamien harvojen kokeiden perusteella voida varmuudella sanoa, ettei jokin sieni ole viljeltävissä, mutta milloin sama tulos toistuu kerta kerralta, osoittaa se sienen yleistä suhtautumista viljely-yrityksiin. Tässä mielessä on syytä tarkastella saatuja tuloksia ja verrata niitä aikaisempiin, etupäässä *Modessin*, kokeiden tuloksiin.

Modess (1941, s. 18) jakaa sienet, joita ei saatu eristetyiksi, seuraaviin kolmeen ryhmään: I. Siirrostuskappaleesta alkaa kasvaa sienihyöntejä, jotka voivat saavuttaa 0.5—1 mm:n pituuden, mutta sitten kasvu auttamattomasti pysähtyy. II. Sienen itiöemä on säännöllisesti bakteerien infektoima, jotka samentavat ravintoliuoksen ja estävät sienen mahdollisen kasvun. III. Ravintoalusta säilyy steriilinä, mutta sieni ei osoita mitään kasvun merkkejä.

Tätä jakoa käyttämällä voidaan I ryhmään kuuluviksi lukea *Amanita mappa* ja *A. pantherina*, joiden kasvu pysähtyi niitä liuoksesta agarille siirrettäessä, sekä *Gomphidius glutinosus* ja *Tricholoma equestre*. Myös *Polyporus ovinus*, *Lactarius widius*, *Cortinarius brunneus* ja *C. collinitus* osoittivat kukin yhdessä kokeessa

vähäistä kasvua, joka pysähtyi miltei alkuunsa. *Russula consobrina* kasvoi agarilla vielä jonkin aikaa, mutta kuoli parin siirrostuksen jälkeen.

Ryhmään II kuuluivat mm. suvut *Cantharellus* ja *Hydnum*, kuten *Modessin* kokeissa. Kuitenkin saattaa tällaisestakin sienestä joskus sattumalta saada bakteerittoman solukkokappaleen. Sellainen tapaus sattui *Hydnum rufescensin* kohdalla kerran, jolloin saatiin puhdasviljelmä, sekä kerran *Cantharellus cibariuksen* kohdalla, jolloin kanta ulkoa tulleen infektion vuoksi kuitenkin menetettiin. *D oak* (1934) on onnistunut tämän lajin puhdasviljelyssä. Edelleen tähän ryhmään kuuluvia sieniä ovat *Calocera viscosa* ja *Clavaria fistulosa*, ja sangen yleisesti bakteerien infektoimia ovat mm. hygrofaniit *Clitocybe*- ja *Cortinarius*-lajit. Eräissä tapauksissa on sieni alkanut kasvaa bakteereista huolimatta, mutta ei ole saatu eristetyksi seuralaisestaan.

Joissakin tapauksissa on sienen puhdistaminen bakteerista onnistunut agar-alustalla, jolla ilmahyönteet ovat tavallisesti puhtaat bakteerista. Tällä tavalla saatiin ainoat puhdasviljelmät seuraavista sienistä: *Cantharellus umbonatus*, *Clitopilus prunulus* ja *Limacium eburneum*. Samalla tavalla eristettiin bakteerien infektoimista itiöemistä *Cystoderma amianthina*, *C. carcharias*, *Marasmius perforans*, *Pholiota mutabilis* ja *Stropharia depilata*, joista saatiin myös toisia kantoja bakteerittomista itiöemistä.

Toistuneissa kokeissa pysyivät puhtaina bakteereista osoittamatta minkäänlaisia kasvun oireita mm. *Cortinarius camphoratus* ja *C. traganus*, joiden viljely onnistui *Meliniille* (1925), sekä *Rozites caperata*, jonka *Modess* luki I ryhmään kuuluvaksi. Monet muut *Cortinarius*-, *Lactarius*-, *Limacium*- ja *Russula*-lajit kuuluvat samaan ryhmään.

¹ Sieni alkoi kasvaa liuoksessa, mutta kasvu pysähtyi agarille siirrettynä.

² Alkoi kasvaa vain liuoksessa, mutta kasvu jatkui agarille siirrettynä.

Syyt siihen, että tiettyjen sienien kasvataminen on joillekin tutkijoille onnistunut, toisille ei, voivat olla monenlaisia. Eräs sellainen on, miten sienien hapon tarve on tyydytetty. Kirjoittaja on onnistunut parhaiten silloin, kun solukkokappale on sijoitettu ravintoliuokseen niin, että osa siitä on pinnan yläpuolella. Alkukokeilujen jälkeen käytettiin koeastioina aina petrimaljoja, joiden pohjalla ravintoliuos tai -agar oli noin 2 mm vahvana kerroksena. Tällaisissa oloissa esim. *Paxillus involutus* rupesi aina nopeasti kasvamaan, mutta ei koskaan, jos solukkokappale oli kokonaan nesteeseen peitossa. Muutamat lajit taas rupesivat upoksissakin kasvamaan melko helposti. (Vrt. M o d e s s 1941, ss. 24—30.)

Yleensä sieni rupesi sitä helpommin kasvamaan, mitä isompi oli ravintoalustalle pantu solukkokappale. Toisaalta kuitenkin pieni kappale on useammin puhdas bakteereista kuin iso. Pienistä itiöemistä (esim. *Marasmius*, *Mycena* ym.) on vaikea tai miltei mahdoton saada sisäsolkkoa niin, ettei bakteerien tai homeitiöiden infektoimaa pintaa tulisi mukaan. Sen vuoksi on pinnan sterilointi usein tarpeen. Lindeberg (1944) steriloi *Marasmius*-lajien rustomaisia jalkoja pitämällä niitä 2—3 sek. 0.1% :ssa sublimaattiliuoksessa ja huuhtelemalla sen jälkeen kolmasti vedellä. Yliopp. Hintikka kokeili *Marasmius*-lajien jalkojen sterilointia kloorikalkilla seuraavasti (Melin 1936, s. 1057): 10 g kloorikalkkia liuotetaan 140 ml:aan vettä ja sienien varren kappaleita pidetään liuoksessa noin 5 sek, minkä jälkeen ne siirretään agar-alustalle. Tällä tavoin saatiin puhdasviljelmät em. kolmesta *Marasmius*-lajista. Sen sijaan kokeillut *Mycena*-lajit eivät ruvenneet kasvamaan kloorikalkilla steriloiduista jalan kappaleista.

Syytä siihen, että tietty sieni ei ravintoalustalla rupea lainkaan kasvamaan tai kasvaa hyvin hitaasti, pidetään käytetyn ravintoalustan sopimattomuutta, ts. siitä puuttuu joitakin sienien kasvulle välttämättömiä aineita tai se sisältää kasvua ehkäiseviä aineita. Lukuksia kokeita onkin tehty eri sienien kasvutekijävaatimusten selvittämiseksi (kts. esim. Melin 1954). M o d e s s (1941, s. 21—24) totesi, että *Amanita muscaria* itiöemästä puristettu uute voimakkaasti edistää tämän hidaskasvuisen ja melko vaikeasti viljeltävän sienien kasvua. *Amanita muscaria*-uute ei kuitenkaan vaikuttanut sellaisiin sie-

niin, jotka eivät ruvenneet tavallisessa Hagem-liuoksessa kasvamaan, ei myöskään samojen lajien itiöemistä tehty uute. Samoin Melin ja Norkrans (1948) totesivat, että monien eri sienien itiöemät sisältävät *Lactarius deliciosus* kasvaa edistävää aineita, ja viimeksi ovat Melin ja Das (1954) osoittaneet, että kasvien juuret erittävät jotakin ainetta, joka edistää sienien kasvua ja on joillekin lajeille (*Russula xerampelina*) suorastaan välttämätön.

Edellä olevaa samoin kuin M o d e s s in esittämää luetteloa tarkastellessa voi panna merkille, että eri sienilajien viljelyshelpous tai -vaikeus on yhteydessä niiden sukulaissuhteiden ja ekologisten ominaisuuksien kanssa, mutta ei kuitenkaan aivan johdonmukaisesti.

Metsämaan sienistä ovat ksylofiiliset lajit helpoimmin viljeltäviä ja puhdasviljelmänä nopeakasvuisia (*Flammula penetrans*, *Hypholoma fasciculare*, *H. sublateralium*, *Pholiota mutabilis*), mutta niidenkin joukossa on lajeja, joita useista yrityksistä huolimatta ei ole saatu kasvamaan, esim. *Tricholoma rutilans* (jota on epäilty loiseksi, jonka itiöemä ilmestyy näkyviin vasta puun kuoltua; Ingelström 1940).

Melko helppoja viljellä ovat myös monet karikkeita hajoittavat saprofyttiset sienet (esim. *Clitocybe*, *Lepiota*, *Marasmius*, *Mycena*). Mikäli niiden kohdalla eristysyritykset ovat epäonnistuneet, lienee siihen useammin ollut syynä teknillisiä vaikeuksia, kuten itiöemien pieni koko ja bakteeri-infektio, kuin sienien kyvyttömyys kasvaa käytetyllä alustalla.

Myös puiden mykoritsasienien joukossa on muutamia helposti eristettäviä ja nopeakasvuisia lajeja, esim. *Boletus bovinus* ja *B. variegatus*. Kuitenkin monet lajit, joiden viljely on tuottanut vaikeuksia, ovat osoittautuneet puiden mykoritsasymbionteiksi (esim. suvuissa *Amanita*, *Lactarius* ja *Russula*). Kun metsissä kasvavat kantasienet yleensä ovat vaikeammin kasvatettavia kuin niityillä kasvavat lajit, on arveltu, että metsissä kasvavat lajit, joiden eristäminen ei tähän mennessä ole onnistunut, ainakin pääosaltaan olisivat mykoritsoja muodostavia (esim. Melin 1925 a). Tällaisia sieniä on sängen runsaasti, esim. suurissa *Cortinarius*- ja *Russula*-suvuissa, joiden lajit miltei järjestään ovat metsissä kasvavia, puhdasviljely on toistaiseksi onnistunut vain melko harvoissa tapauksissa. Kuitenkaan pelkkä viljelyvaikeus

ei oikeuta päättelemään tiettyä lajia mykorrhitsain muodostajaksi. Esim. *Hygrophorus*-ryhmässä, jonka lajit ovat kaikki vaikeita eristää, *Singerin* (1953) mukaan vain *Limacium*-suku muodostaa mykoritsoja, kun taas *Hygrocybe* ja *Camarophyllus* ovat saprofyyttisiä.

Toisilleen lähisukuiset sienet suhtautuvat puhdasviljely-yrityksiin yleensä jokseenkin samalla tavoin. Niinpä *Amanita*-lajit eivät ole ruvenneet ollenkaan kasvamaan (*A. vaginata* ja *A. virosa*) tai ovat kasvaneet hitaasti ja vaikeasti. Kuitenkin samankin suvun lajit saattavat poiketa jyrkästi toisistaan. Paras esimerkki tässä suhteessa on *Tricholoma*, jota on myös perusteellisesti tutkittu (*Norkrans* 1949, 1950) ja johon kuuluu sekä erittäin helposti kasvatettavia ja nopeakasvuisia lajeja (esim. *T. nudum*) että vaikeasti kasvatettavia (esim. *T. virgatum*, *T. equestre*; kts. *Norkrans* 1949) ja myös lajeja, joita tähän mennessä ei ole lainkaan saatu kasvamaan. Samoin *Collybia*-suku sisältää helposti viljeltäviä, nopeakasvuisia ja voimakkaasti karikkeita hajoittavia lajeja (*Lindeberg* 1946, *Mikola* 1954) ja toisia, joiden eristäminen ei toistaiseksi ole onnistunut. Sienien kasvutapa puhdasviljelmänä, samoin kuin kyky mykorrhitsain muodostamiseen, on viime aikoina otettu avuksi sienien luokittelussa, ja osittain niihin perustuen on mm. vanha *Tricholoma*-suku jaettu useaksi suvuksi ja siirretty joitakin lajeja suvusta toiseen (*Singer* 1953).

Rihmastokuvauksia

Eri sienilajien rihmastot poikkeavat toisistaan suuresti värin, kasvutavan ja -nopeuden, hyyfien paksuuden ja rakenteen, erilaisten itiömuotojen esiintymisen ym. puolesta. Jotkin ominaisuudet ovat tietyille lajille ominaisia, mutta samankin sienilajin eri eristyskannat saattavat melkoisesti poiketa toisistaan, ja jotkin ominaisuudet muuttuvat kannan vanhetessa. Yleensä sienien kasvunopeus kannan vanhetessa hidastuu, mutta muutamat sienet, joiden kasvu aluksi on hyvin hidasta, vähitellen ikäänkuin »tuttuvat» outoon ravintoalustaan ja niiden kasvu paranee. Joillakin sienillä taas on tapahtunut äkillinen kasvunopeuden paraneminen. Muutamien sienien nuoret kannat muodostivat runsaasti tuuhteata ilmarihmastoa, mutta vanhat kannat kasvoivat pääasiassa submer-

sisesti. Sinkiläin muodostus näyttää yleisesti kannan vanhetessa jonkin verran vähenevän. Lisäksi samankin sienien kasvutapa ja rihmain ulkonäkö saattaa suuresti vaihdella ravintoalustan ym. kasvuolosuhteiden mukaan.

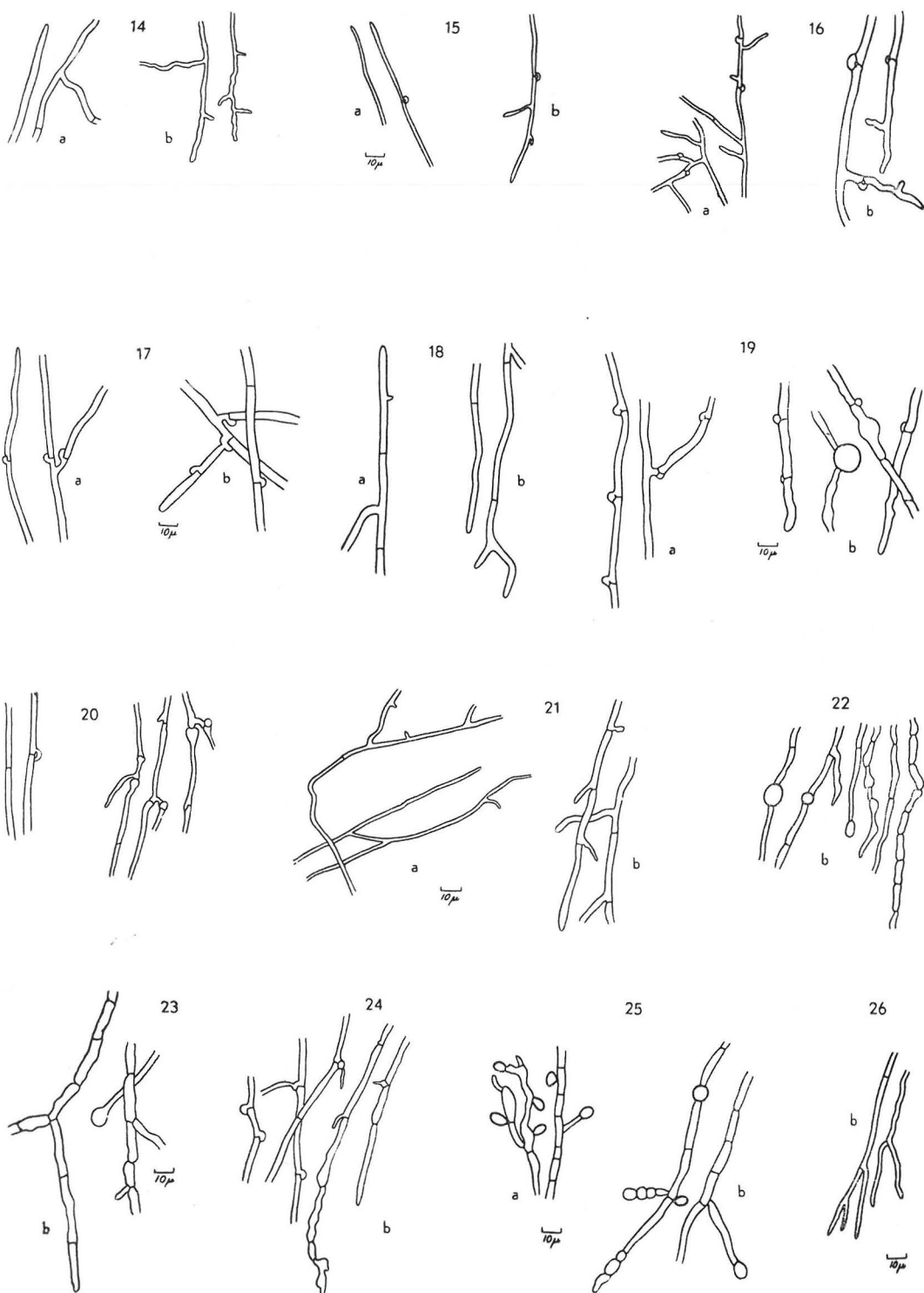
Rihmastokuvauksiin on siis suhtauduttava tietyin varauksin, mutta silti niillä on oma merkityksensä esim. tuntemattoman sienien lajin määrittystä silmällä pitäen. Tunnettujen ja tuntemattomien rihmastojen vertailun avulla on esim. puutavaran lahon aiheuttaja pystytty monessa tapauksessa määrittämään (*Nobles* 1953). Sen vuoksi kuvataan seuraavassa muutamia rihmastoja viittaamalla samalla *Melinin* (1923 a), *Modessin* (1941), *Lindebergin* (1944), *Norkransin* (1950) ym. kuvauksiin. Uposrihmat on kuvattu Hagem-liuoksessa, ilmarihmat Hagem-agarilla kasvavista viljelmistä.

Amanita-lajien rihmastot ovat suuresti toistensa kaltaisia. Ilmarihmasto on lumivalkea, rihmat tasapaksuja, melko runsaasti haaroitettuja. Sinkilät puuttuvat sekä ilma- että uposrihmoista. Uposrihmoissa, jotka ovat jonkin verran ilmarihmoja paksumpia, solujen muoto on *A. muscaria*lla ja *A. porphyria*lla epäsäännöllinen ja rihmastossa on yleisesti klamydosporeja. *A. rubescens*illa uposrihmatkin ovat melko tasapaksuja ja klamydosporeja on vähän.

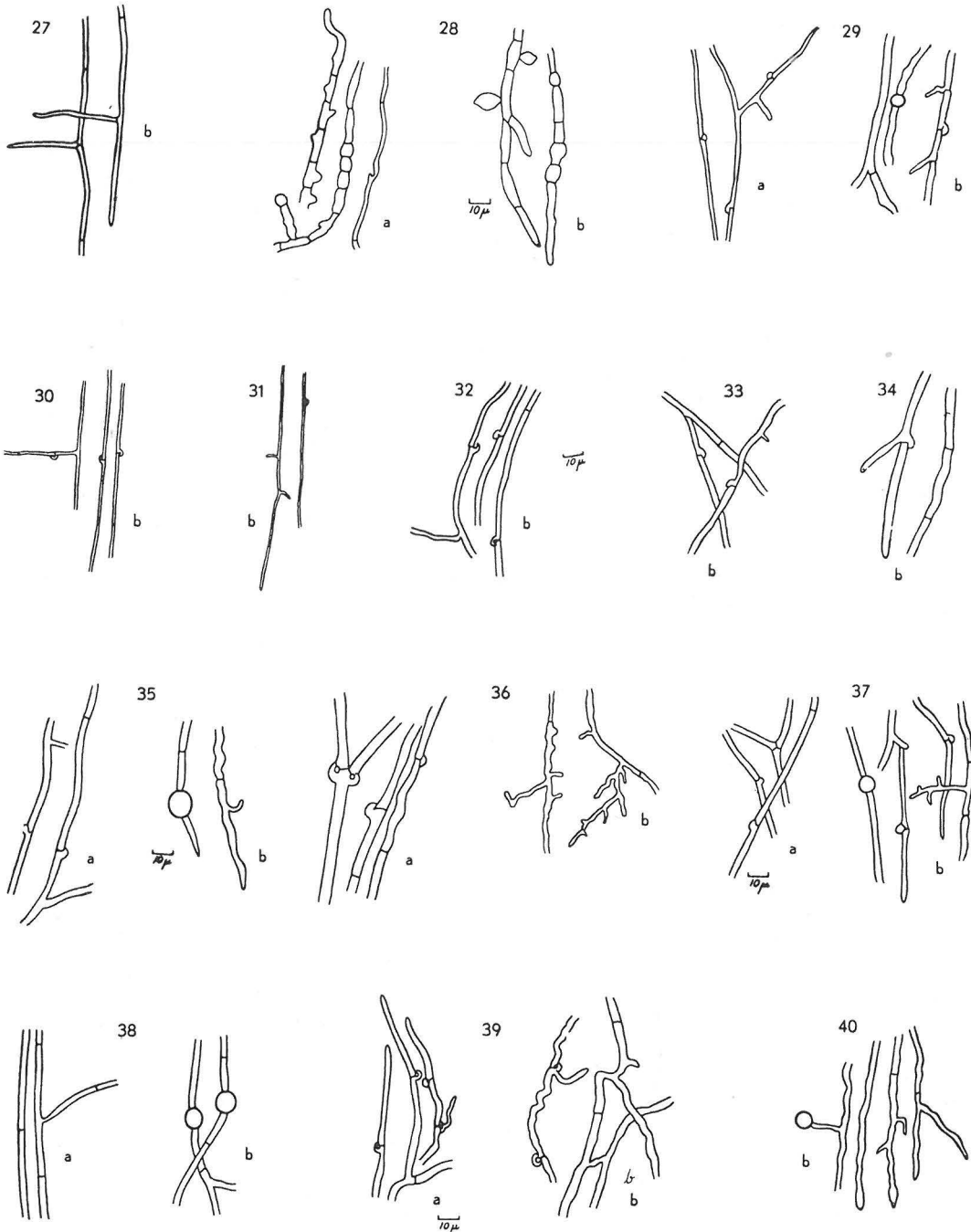
Boletus-lajien rihmastot olivat jokseenkin samanlaisia kuin *Melinin* (1923 a) ja *Modessin* (1941) kuvaamat. Sinkilät ovat *Boletuksilla* harvinaisia, niitä tavattiin harvakeen vain yhdessä *B. variegatus*-kannassa. Ilmarihmastoa on runsaasti, se on joko lumivalkea (*B. badius*, *B. felleus*, *B. luteus*, *B. rufus*, *B. scaber*, *B. subtomentosus*) tai aluksi vaalean, vanhemmiten tumman ruskea (*B. bovinus*, *B. edulis*, *B. elegans*, *B. piperatus*, *B. sanguineus*, *B. variegatus*). *B. scaber* muuttuu vanhana vihertäväksi. Ruskearihmastoiset lajit erittävät myös kasvualustaansa ruskeata väriä. Runsaasti klamydosporeja muodostivat rihmastossaan *B. badius*, *B. bovinus* ja *B. variegatus*. Erikoinen on *B. piperatus* kasvatapa: aluksi se kasvaa agarilla hyvin hitaasti muodostaen pääasiassa uposrihmastoa; parin viikon kulluttua se alkaa kasvattaa löyhää nopeakasvuista ruskeata ilmarihmastoa (vrt. *Modess* 1941, s. 35). *B. piperatus*ella ja muutamilla muilla lajeilla (*B. edulis*, *B. rufus*, *B. sanguineus*, *B. scaber*) kolonia kehittyy agarilla hyvin tiiviiksi ja niin kovaksi, että siitä on vaikea irroittaa kappaletta siirrostusta varten.



Kuvat 1—13. — Figs. 1—13. — 1. *Amanita porphyria*. — 2. *A. rubescens*. — 3. *Boletus badius* — 4. *B. edulis*. — 5. *B. elegans*. — 6. *B. felleus*. — 7. *B. subtomentosus*. — 8. *B. variegatus*. — 9. *Clavaria ligula*. — 10. *Clitocybe lavipes*. — 11. *C. fumosa*. — 12. *C. inversa*. — 13. *C. odora*. — a. Ilmarihmoja — Aerial hyphae. — b. Upos-rihmoja — Submerged hyphae.



Kuvat 14–26. — Figs. 14–26. — 14. *Clitopilus prunulus*. — 15. *Collybia butyracea*. — 16. *C. confluens*. — 17. *C. dryophila*. — 18. *C. rancida*. — 19. *Cystoderma carcharias*. — 20. *C. granulosum*. — 21. *Cortinarius semisanguineus*. — 22. *Gomphidius viscidus*. — 23. *Hygrocybe laeta*. — 24. *Limacium eburneum*. — 25. *Laccaria laccata*. — 26. *Lactarius deliciosus*. — a. Ilmarihmoja — Aerial hyphae. — b. Uposrihmoja — Submerged hyphae.



Kuvat 27–40. — Figs. 27–40. — 27. *Lactarius rufus*. — 28. *Mycena epipterygia*. — 29. *M. galopus*. — 30. *M. lactea*. — 31. *M. pura*. — 32. *M. rosella*. — 33. *M. sanguinolenta*. — 34. *M. vulgaris*. — 35. *Lepiota rhacodes*. — 36. *Paxillus involutus*. — 37. *Stropharia albonitens* (nuori kanta — young strain). — 38. *S. aeruginosa* (vanha kanta — old strain). — 39. *S. depilata* (nuori kanta — young strain). — 40. *S. depilata* (vanha kanta — old strain). — a. Ilmarihmoja — Aerial hyphae. — b. Uposihmoja — Submerged hyphae.

Clavaria ligula kasvaa upoksissa muodostamatta ilmarihmoja juuri lainkaan. Uposrihmat ovat tasapaksuja, runsaasti haarovia. Sinkilöitä on harvassa.

Clitocybe-lajeilla on yleensä runsaasti sinkilöitä. Muutamilla lajeilla (*C. clavipes*, *C. fumosa*, *C. odora*) on harvaa höyrymäistä ilmarihmastoa; toisilla (*C. inversa*, *C. infundibuliformis*) ei ole ilmarihmastoa lainkaan. Rihmaston väri on vaalean ruskea tai valkea (*C. odora*). Klamydosporeja tavattiin *C. inversan* uposrihmastossa sekä *C. odoralla* usein ilmarihmojen päissä.

Clitopilus prunulus muodostaa lumivalkeata ilma- ja uposrihmastoa ilman sinkilöitä ja klamydosporeja.

Collybia-lajien rihmastot poikkeavat melkoisesti toisistaan. *C. dryophila* muodostaa runsaan vaalean ruskean ilmarihmaston, jossa rihmat yhtyvät säikeiksi. Muut lajit kasvavat pääasiassa upoksissa muodostaen vain vähän ilmarihmastoa. *C. butyracean*, *C. confluentis* ja *C. dryophilan* ilma- ja uposrihmoissa on paljon sinkilöitä, jotka *C. rancidalt* ja *C. tenacellalt* näyttävät puuttuvan. Klamydosporit puuttuvat.

Eristetyistä *Cortinarius*-rihmastoista sekä sinkilät että klamydosporit puuttuvat. *C. armillatus* muodosti melkoisesti valkeata ilmarihmastoa, *C. semisanguineus* kasvoi melkein pelkästään upoksissa.

Cystoderma-lajien rihmastot ovat melkoisesti toistensa kaltaisia. Sekä ilma- että uposrihmoissa on sinkilöitä. Uposrihmaston solut ovat muodoltaan epäsäännöllisiä, ja joskus esiintyy klamydosporeja. *C. carcharias* on valkea, *C. amianthinum* ja *C. granulosum* kellertäviä.

Gomphidius viscidus, *Hygrocybe laeta* ja *Lima-cium eburneum* kasvoivat melkein pelkästään upoksissa. Uposrihmastojen solut olivat muodoltaan epäsäännöllisiä, ja vain *Limacium*illa oli sinkilöitä.

Hypholoma-lajien ilma- ja uposrihmastot olivat lumivalkeita, rihmat sangen ohuita, 1–2 μ . Sinkilät puuttuvat; klamydosporeja esiintyy jonkin verran.

Laccaria laccata muodosti lyhyen harmaan ruskean ilmarihmaston, joka vanhemmiten muuttuu melkein mustaksi. Sekä ilma- että uposrihmat muodostavat runsaasti kuromia. Sinkilät puuttuvat. Kaikki kolme eristettyä *Laccaria*-kantaa olivat samanlaisia.

Kaikkien *Lactarius*-lajien rihmastot ovat suuresti toistensa kaltaisia. Rihmasto kasvaa melkein kokonaan upoksissa; vain siirrostus-

kappaleesta lähtee lyhyitä ilmarihmoja. Uposrihmat ovat miltei värittömiä, ohuita, tasapaksuja. Sinkilät ja klamydosporit puuttuvat. Vanhan *Lactarius deliciosus*-kolonian pinta muuttuu voimakkaan vihreäksi, ja siitä nousevat ilmarihmat ovat yhtyneet paksuiksi kimpuiksi.

Marasmius-lajien rihmastot vastasivat täysin *Lindebergin* (1944) kuvauksia. Sangen omalaatuinen on *M. androsaceuksen* kasvutapa. Ilmarihmasto, joka aluksi on lumivalkea, muodostaa vanhemmiten kolonian pinnalle ruskean violetin kalvon, josta lähtee mustia rihmastosäikeitä, jollaisia *M. androsaceus* luonnossakin muodostaa.

Eristetyt *Mycena*-lajit poikkesivat suuresti toisistaan sekä kasvutavan että rihmaston ulkonäön puolesta. Niinpä *M. epipterygia* oli sangen nopeakasvuinen muodostaen hyvin harvaa ilma- ja uposrihmastoa, jossa solujen muoto on vaihteleva, mutta sinkilät puuttuvat. Nuori kanta eritti ravintoalustaan keltaista väriä, mutta vanhalta kannalta tämä ominaisuus hävisi. Useimmilla muilla lajeilla oli rihmastoissaan sinkilöitä. Rihmaston väri on valkea tai vaalean punertava (*M. pura*, *M. lineata*, *M. rosella*). Ilmarihmastoa useimmat *Mycenat* muodostivat sangen vähän tai ei lainkaan.

Paxillus involutus kasvaa puhdasviljelmänä nopeasti muodostaen tuuhean kellanruskean ilmarihmaston ja uposrihmastoa sangen vähän. Ilmarihmat ovat paksuja ja suoria, ja niissä on paljon sinkilöitä. Uposrihmat ovat paljon ohuempia, paksuudeltaan vaihtelevia ja vailla sinkilöitä. Klamydosporit puuttuvat.

Stropharia-lajit muodostivat hyvin runsaan valkean ilmarihmaston, mutta kannan vanhetessa kasvutapa muuttui yhä enemmän submersiseksi. Nuorilla kannoilla oli sinkilöitä sekä ilma- että uposrihmastoissa, mutta vanhat kannat kasvoivat ilman sinkilöitä. Sen sijaan klamydosporien muodostus uposrihmastossa näytti lisääntyvän vanhoissa kannoissa.

Yhdistelmä

1. Selostetaan kantasieniä itiöemistä eristettäessä käytetty menetelmä (»tissue-culture method»). 2. On kokeiltu noin 150 sienilajin eristämistä Hagem-agarilla ja Hagemliuoksessa. Noin 80 lajia on saatu kasvamaan puhdastaan. 3. Muutamien eristettyjen sienilajien kasvutapa ja rihmaston ulkonäkö on kuvattu.

Kirjallisuutta

- Brefeld, O. 1908. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. XIV. Die Kultur der Pilze. — Münster i.W.
- Bavendam, W. 1936. Erkennen, Nachweis und Kultur der Holzverfärbenden und Holzersetzenen Pilze. — Handb. d. biol. Arbeitsmeth. XII:2.
- Doak, K. D. 1934. Fungi that produce ectotrophic mycorrhizae of conifers. — Phytopathology 24.
- Duggar, B. M. 1905. The principles of mushroom growing and mushroom spawn-making. — U.S. Dept. Agr., Bur. Plant Ind., Bull. 85.
- Fries, N. 1943. Untersuchungen über Sporenkeimung und Myzelentwicklung bodenbewohnender Hymenomyceten. — Symb. Bot. Upsal. 6:4.
- » 1949. Culture studies in the genus *Mycena*. — Sv. Bot. Tidskr. 43.
- Hagem, O. 1910. Untersuchungen über norwegische Mucorineen. II. — Vidensk. Selsk. Skrift. I.
- Ingelström, E. 1940. Svampflora. — Stockholm.
- Lindeberg, G. 1944. Über die Physiologie ligninabbauender Bodenhyphenomyceten. — Symb. Bot. Upsal. 8:2.
- » 1946. On the decomposition of lignin and cellulose in litter caused by soil-inhabiting Hymenomycetes. — Arch. f. Bot. 33A:10.
- Melin, E. 1922 a. *Boletus*-Arten als Mykorrhizapilze der Waldbäume. — Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 40.
- » 1922 b. Untersuchungen über die *Larix*-Mykorrhiza. I. Synthese der Mykorrhiza in Reinkultur. — Sv. Bot. Tidskr. 16.
- » 1923 a. Experimentelle Untersuchungen über die Birken- und Espenmykorrhizen und ihre Pilzsymbioten. — Sv. Bot. Tidskr. 17.
- » 1923 b. Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mykorrhizen von *Pinus silvestris* L. und *Picea abies* (L.) Karst. — Mykol. Unters. u. Ber. 2.
- Melin, E. 1924. Zur Kenntnis der Mykorrhizapilze von *Pinus montana* Will. — Bot. Not.
- » 1925 a. Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorrhiza. — Jena.
- » 1925 b. Untersuchungen über die *Larix*-Mykorrhiza. II. Zur weitere Kenntnis der Pilzsymbioten. — Sv. Bot. Tidskr. 19.
- » 1936. Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. — Handb. d. biol. Arbeitsmeth. XI:4.
- » 1954. Growth factor requirements of mycorrhizal fungi of forest trees. — Sv. Bot. Tidskr. 48.
- Melin, E. & Das, V. S. R. 1954. Influence of root-metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. — Phys. Plant. 7.
- Melin, E. & Norkrans, B. 1948. Amino acids and the growth of *Lactarius deliciosus* (L.) Fr. — Phys. Plant. 1.
- Mikola, P. 1954. Metsämaan kantasienien kyvystä hajottaa neulas- ja lehtikarikkeita. — Metsäntutkimusl. julk. 42:7.
- Modess, O. 1941. Zur Kenntnis der Mykorrhizabildner von Kiefer und Fichte. — Symb. Bot. Upsal. 5:1.
- Nobles, M. K. 1953. Cultural identification of fungi causing decay in coniferous trees of British Columbia. — Proc. 7th Int. Bot. Congr., Stockholm 1950.
- Norkrans, B. 1949. Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. — Sv. Bot. Tidskr. 43.
- » 1950. Studies in growth and cellulytic enzymes of *Tricholoma* with special reference to mycorrhiza formation. — Symb. Bot. Upsal. 11:1.
- Singer, R. 1953. Antibiotic activity and formation of ectotrophic mycorrhiza in relation to natural affinity in the classification of the Basidiomycetes. — Proc. 7th Int. Bot. Congr., Stockholm 1950.

Summary

Growing forest soil Basidiomycetes in pure culture

1. Introduction. As is well-known, spores of most forest soil *Basidiomycetes* do not germinate easily on synthetic media. Therefore, pure cultures for physiological experiments are usually obtained from sporophores by the »tissue-culture method» of D u g g a r (1905) and B r e f e l d (1908). In general, coprophilous and xylophilous fungi are cultivated easily, but growing of humus-inhabiting species and mycorrhiza-formers, in particular, has encountered considerable difficulties. M e l i n (1922—25) was the first to grow representatives of the following genera in pure culture: *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Lactarius*, and *Russula*. More recently several authors, e.g. M o d e s s (1941) and L i n d e b e r g (1944, 1946), have reported on their experiments with pure cultures of soil-inhabiting *Basidiomycetes*.

2. Experimental. In the pure culture experiments that the present author has carried on in recent years, the tissue-culture method was used as improved by M o d e s s. The cultural medium used was s.c. Hagem solution, the composition of which is given on p. 6, as such or with 1.5 per cent of agar (Hagem agar). 150 species of fungi were tested, the list of which is given on pp. 7—8. A positive result is indicated by +, a negative one by —. Accordingly, pure cultures of some 80 species were obtained. Most fungi started growth both on agar and in liquid medium. In some cases (indicated by +²), however, the fungus started growth in liquid only but the growth continued when mycelium was transferred onto an agar slant. Some of the fungi that did not

yield pure cultures (indicated by +¹) started a weak growth but the mycelium died soon. The sporophores of certain fungi are almost invariably infected by bacteria, e.g. species of *Hydnum* and *Cantharellus*, and thus the substrate always gets the infection, too. In some cases even pure cultures of such fungi were obtained (e.g. *Cantharellus umbonatus* and *Limacium eburneum*) by transferring aerial hyphae, that usually are free of bacteria, to new substrate.

The above results agree well with previous studies, e.g. those of M o d e s s. Saprophytic species, in general, are more easily cultivated than mycorrhiza-formers, although there are striking exceptions too. We have still a great number of common fungi in forest soil that have not been able to grow in pure culture, and their physiological properties have not been studied experimentally. All of them are often assumed to be mycorrhizal, but such a generalisation is not fully justified. The ability to grow on synthetic media, as well as mycorrhizal habit, are taken into consideration in the taxonomy of fungi (S i n g e r 1953).

3. The mycelia of some isolated strains are described (Figs. 1—40). In general, the appearance and the growing habit of mycelium, as well as the presence or absence of clamp connections and chlamydospores, are characteristic to each species. However, strains of the same species may differ slightly from each other, and considerable changes may take place in a strain during prolonged cultivation (cf. *Stropharia depilata*, Figs. 39 and 40).