

KUUSENTAIMIEN MYKORRITSASIEN TUNNISTAMINEN KOLONISAATIOKOKEISSA

Tatu Uutela

Opinnäytetyö
Toukokuu 2013

Laboratorioalan koulutusohjelma
Tekniikan ja liikenteen ala



JYVÄSKYLÄN AMMATTIKORKEAKOULU
JAMK UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



KUVAILELULEHTI

Tekijä(t) UUTELA, Tatu	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 27.05.2013
	Sivumäärä 55	Julkaisun kieli Suomi
		Verkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi KUUSENTAIMIEN MYKORRITSASIENTEN TUNNISTAMINEN KOLONISAATIOKOKEISSA		
Koulutusohjelma Laboratorioala		
Työn ohjaaja(t) LEPPÄ-AHO, Jaakko, FT		
Toimeksiantaja(t) METSÄNTUTKIMUSLAITOS, PENNANEN, Taina FT		
Tiivistelmä <p>Opinnäytetyö tehtiin Metsäntutkimuslaitokselle. Opinnäytetyössä tunnistettiin kuusen juurista mykorritsoja eli symbioottisia juuristosieniä. Opinnäytetyö on osa tutkimusta, jossa selvitetään kuusen kasvun parantamista mykorritsoilla. Tutkimus pyrkii kehittämään teolliseen mittakaavaan soveltuvan tavan mykorritsojen kasvattamiseksi ja siirrostamiseksi.</p> <p>Opinnäytetyössä aineistona olivat koe-erän taimet, joihin siirrostettiin uudella kehitetyllä teollisella sovellutuksella juuristosieniä. Tarkoituksena oli selvittää, oliko mykorritsojen siirrostus onnistunut. Tämä selvitettiin etsimällä juurista sieniä mikroskoopilla. Mikroskopointitulokset varmistettiin DNA-menetelmillä, joihin kuului DNA:n eristys fenoli-kloroformi uutolla, DNA:n monistus polymeerasiketjureaktiolla, monistuksen tarkistus agarosigeelielektroforeesilla (AGE) ja sienilajien tunnistus denaturoivalla gradientti geelielektroforeesilla (DGGE).</p> <p>Siirrostus ei ollut onnistunut halutulla tavalla, sillä vain muutama sienilaji oli muodostanut mykorritsan. Näistä lajeista <i>Cadophora Finlandia</i> oli lupaavin. Se oli kolonisoitunut juurenkärjistä noin 20 %. Yleinen taimitarhamykorritsa <i>Thelephora Terrestris</i> oli kontaminoinut kaikki näytteet. Se oli kolonisoitunut selvästi vahvemmin juuristoon kattaen 30 – 80 % juurenkärjistä. Tämä johtuu taimitarhassa vallitsevista kasvuolosuhteista. Tämä kuului tutkimukseen, koska teollisen tavan oli kyettävä mykorritsoimaan juuria näissä oloissa. <i>Cadophora Finlandia</i>:n odotetaan lisäävän taimien kasvua istutuksen jälkeen.</p>		
Avainsanat (asiasanat) elektroforeesi, mikroskooppi, mykorritsa, taimi		
Muut tiedot		



Author(s) UUTELA, Tatu	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 27052013
	Pages 55	Language Finnish
		Permission for web publication (X)
Title IDENTIFICATION OF MYCORRHIZAE IN SPRUCE SEEDLINGS USING COLONIZATION EXPERIMENTS		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) LEPPÄ-AHO, Jaakko, PhD		
Assigned by FINNISH FOREST RESEARCH INSTITUTE, PENNANEN, Taina, PhD		
Abstract <p>The thesis was made for Finnish Forest Research Institute. In the thesis symbiotic fungus-roots or mycorrhizae were identified in spruce seedlings. The thesis is part of research which studies how to increase the growth of spruce by the mycorrhizae. The research tries to develop a way to cultivate and inoculate mycorrhizae in the industrial scale.</p> <p>The material in the thesis was trial seedlings. Those were inoculated with the new application developed for the industrial scale. The purpose was to find out if the inoculum of mycorrhizae was successful. This was done by searching fungi in roots under the microscope. The outcome of microscoping was confirmed by DNA applications such as phenol-chloroform extraction for the DNA isolation, polymerase chain reaction for the DNA multiplying, agarose gel electrophoresis (AGE) for expressing the multiplying and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for identifying the fungus species.</p> <p>Inoculum was not as successful as hoped. Only some fungus species had formed mycorrhizae. In those species <i>Cadophora Finlandia</i> were the most promising ones. It had colonized about 20% of the root caps. Widespread nursery mycorrhiza <i>Thelephora Terrestris</i> had contaminated all the samples. The contamination of the root caps of <i>Thelephora Terrestris</i> was between 30% and 80%. This originates from the growth conditions in the nursery. This was part of the research because the industrial application has to form mycorrhizae in these conditions. <i>Cadophora Finlandia</i> will be expected to increase the growth after the planting.</p>		
Keywords electrophoresis, microscope, mycorrhiza, seedling		
Miscellaneous		

Sisällys

1	OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT	5
2	EKOSYSTEEMI	7
2.1	Energiavirta.....	7
2.2	Ravinteiden kierto.....	8
3	MYKORRITSA	10
3.1	Ektomykorritsa.....	12
3.2	Arbuskelimykorritsa.....	16
3.3	Taimitarhamykorritsa	17
4	GENEETTINEN TIETO	18
4.1	Nukleiinihappojen rakenne.....	18
4.2	Ribosomaalinen DNA	24
5	OPINNÄYTETYÖSSÄ KÄYTETYT MENETELMÄT	25
5.1	Tunnistaminen	25
5.2	DNA:n eristys ja puhdistus.....	26
5.3	DNA:n monistaminen.....	26
5.4	Monistumisen ilmentäminen.....	28
5.5	Sienilajin varmistus	29
6	TYÖNSUORITUS.....	30
6.1	Näytteiden esikäsittely	30
6.2	Perimän erottaminen ja puhdistaminen.....	33
6.3	Perimän monistaminen.....	34
6.4	Monistuksen kuvantaminen	36
6.5	Sienilajin varmistus	37
7	TULOKSET	40
8	PÄÄTELMÄT.....	41
	LÄHTEET.....	43
	LIITTEET	45
	Liite 1. ECM1 kolonisaatioprosentit.....	45
	Liite 2. ECM2 kolonisaatioprosentit.....	46
	Liite 3. Thelephora terrestris kolonisaatioprosentit	47

Liite 4. Juurien keskiarvomassa.....	48
Liite 5. Verson keskiarvopituus	49
Liite 6. Versojen keskiarvomassa	50
Liite 7. Juurenkärjet keskimäärin senttimetrissä juurta	51
Liite 8. Tulodata (sivu 1)	52
Liite 9. Tulodata (sivu 2)	53
Liite 10. Tulodata (sivu 3)	54
Liite 11. Tulodata (sivu 4)	55

Kuviot

KUVIO 1. Mikroskooppikameran kuvia mykorritsan kehitysvaiheista.....	14
KUVIO 2. Ektomykorritsan kaavakuviio.....	15
KUVIO 3. Arbuskeli-vesikkelimykorrhitsan kaavakuviio.....	16
KUVIO 4. Nukleiinihapoissa esiintyvät sokerit	19
KUVIO 5. Nukleiinihapojen emäkset	20
KUVIO 6. DNA:n nukleosidit	21
KUVIO 7. DNA:n rakenne.....	23
KUVIO 8. Monistuksen tarkistaminen	37
KUVIO 9. Esitys DGGE:n peritaatteesta.....	38
KUVIO 10. Bio-Rad-laitteen geelikuva DGGE-ajosta	39

Taulukot

TAULUKKO 1. Kennot ja käsittelyt.....	31
TAULUKKO 2. PCR-reaktion ajo-ohjelma.....	35
TAULUKKO 3. PCR-reagenssit.....	35

ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö on syntynyt marraskuun 2010 ja toukokuun 2011 välisenä aikana Metsäntutkimuslaitoksella Vantaalla. Opin todella paljon uutta ja mielenkiintoista, josta tulevaisuudessa on hyötyä. Haluan erityisesti kiittää FT Taina Pennasta työni ohjaamisesta ja neuvomisesta. Lisäksi haluan kiittää metsäpatologian osaston työntekijöitä hyvistä muistoista ja loistavasta yhteishengestä.

Jyväskylässä 27.4.2013

Tatu Uutela

1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT

Kuusta uudistetaan istuttamalla. Se on tehokkaampi tapa kuin kylväminen. (Luoranen J. & Kiljunen N. 2006, 7 – 8.) Kuusi kasvaa viljavilla kasvupaikoilla, esimerkiksi lehtoisilla kankailla ja ravinteikkailla turvemailla. Kuusi kestää huonosti kuivuutta, koska sen juuristo on lähellä maanpintaa. Juuristo on pääasiassa humuskerroksessa ja maan pinnan lähellä kivennäismaassa. Veden imeytyessä maahan juuret saavat vettä vain ympäriltään. Veden imeytyessä juuria syvemmälle veden saanti loppuu. (Luoranen & Kiljunen 2006, 14 – 19.) Puiden juuristoissa elää symbionttisia juuristosieniä eli mykorritsasieniä, jotka ovat välttämättömiä veden ja ravinteiden saannin kannalta.

Kuuselle maaperä tulee olla kostea ja ilmava. Otollisia ovat hienot ja keskikarkeat maat, jotka pitävät hyvin vettä. Maaperän vedenpitävyys riippuu maan raakoosta. Pienemmät rakeet pitävät vettä paremmin, mutta hengittävät huonommin. Saven vedenpitävyys on parempi ja hengittävyys on huonompi soraan verrattuna. Vedenpitävyys on haitta, jos vesi jää seisomaan maan päälle. (Luoranen & Kiljunen 2006, 14 – 19.) Juuret eivät saa silloin happea.

Vuonna 2011 Suomen metsän istuttamisen kokonaiskustannukset olivat 52,5 miljoonaa euroa. Puita istuttiin 76 284 hehtaaria. Kuusi on Suomen yleisin istutuspuu. Vuonna 2011 kuusta istutettiin 52 047 hehtaaria, joista paakkutaimia oli 95,3 miljoonaa ja paljasjuurisia taimia 130 000 kappaletta. (Metsätilastollinen vuosikirja 2012, 119 – 150.) Kuusen istutuksen kokonaiskustannuksille voidaan laskea karkea arvio, jos ajatellaan, että kaikkien kustannusten tulevan paakkutaimista ja ettei istuttamisella ole kustannuseroja puulajien välillä. Näin laskettuna kuusen istuttamiseen kului 35,8 miljoonaa euroa. Lisäkustannuksia tuo taimien kasvatus ja kuljettaminen. Taimien kasvatuksessa maksaa esimerkiksi kastelu ja lämmitys.

Istutetuista taimista 30 % kuolee seuraavan 10 vuoden aikana (Rikala 1994, 11). Kriittisimmät hetket ovat juuri istutuksen jälkeen. Metsäntutkimuslaitoksella aloitettiin vuonna 2001 monivuotinen hanke, jonka tarkoituksena oli tutkia, voiko juuristosienillä parantaa kuusentaimien alkukehitystä. Luonnosta eristetyistä sienistä saatiin 55 puhdasviljelmää, jotka siirrostettiin kuusentaimiin. Istutuksen jälkeen 7 eri sienilajia nopeuttivat kasvua seuraavat 2-3 vuotta istutuksen jälkeen.

Tulosten perusteella haluttiin kehittää teolliseen mittakaavaan soveltuva ja kustannustehokas tapa kasvattaa juuristosieniä. Juuristosienet kasvavat yleensä hitaasti keinotekoisissa laboratorio-olosuhteissa ja menettävät kykynsä mykorritsoitua ilman juurta (Smith & Read 2011, 213). Vuonna 2008 saatiin sienikannat kasvamaan nesteytettäväksi soveltuvalla ja teollisesti tuotetulla kasvualustalla. Nestemäinen sieniliuos on mahdollista levittää taimitarhoilla kasteluveden mukana. Vuosina 2009 ja 2010 optimoitiin sienien kasvualustoja paremmin soveltuviksi ja kasvatettiin koe-erä taimitarhalla.

Kehitteillä olevan sieniliuoksen uskotaan auttavan taimea selviämään istutuksen jälkeen. Tämä toisi mittavia säästöjä ollen samalla ekologinen ratkaisu. Kuusien jäädessä suuremmalla todennäköisyydellä eloon istutuksen jälkeen voitaisiin pienentää istutusmääriä. Näin saataisiin pienennettyä kustannuksia, joka puolelta.

Opinnäytetyössä tehtävänä oli selvittää taimitarhalla kasvatetusta koe-erästä, muodostuiko kuusentaimen ja sienien välille sienijuurisymbioosia. Tutkimus suoritettiin mikroskopoimalla taimien juuria. Tulokset varmistettiin myöhemmin molekyylibiologisilla menetelmillä. Symbioosin elinvoimaisuutta kuvastavat muun muassa kolonisaatioprosentit.

2 EKOSYSTEEMI

Ekosysteemi koostuu energia- ja ravinnevirroista. Ekosysteemi jakaantuu eliöihin, maaperään ja ilmaan. Ne ovat alati vuorovaikutuksessa energia- ja ravinnevirtoihin. (Helmisaari 1998, 149.) Ekosysteemi voidaan jakaa myös eläviin ja elottomiin osiin. Elävät osat voidaan jakaa tuottajiin, kuluttajiin ja hajottajiin. Elottomia osia ovat fysikaaliset ja kemialliset tekijät, esimerkiksi auringon valo, vesi, ravinteet ja ilmakehän kaasut. (Salonen 2006, 265)

Eliöt voidaan luokitella niiden energian ottotavan ja hiilen lähteen perusteella. Auringon valosta energian saava eliö on fototrofi ja kemiallisia yhdisteitä hajottava on kemotrofi. Hiilen hiilidioksidista saava eliö on autotrofi ja orgaanisista yhdisteistä hajottava on heterotrofi. Termejä voidaan yhdistää, esimerkiksi energiansa ja hiilen lähteensä orgaanisista yhdisteistä hajottava eliö on kemoheterotrofi. (Campbell & Reece 2008, 564.)

2.1 Energiavirta

Yhteyttävät kasvit kuuluvat tuottajiin. Ne saavat energiansa auringonvalosta ja tuottavat yhteyttämällä hiiliyhdisteitä, jotka veden ja ravinteiden kanssa lisäävät biomassaa. Kuluttajat käyttävät tuottajien biomassaa omaksi ravinnokseen suoraan tai välillisesti. Tähän ryhmään kuuluvat eläimet. Lopullinen luokka, hajottajat, kuuluu myös kuluttajiin, mutta niillä on erilainen funktio. Hajottajat hajottavat kuollutta ainesta ravinnokseen. Hajottajiin kuuluu mikrobeja ja selkärangattomia eläimiä, kuten sukkulamatoja, lieroja ja hyppyhäntäisiä. (Salonen 2006, 265 – 267)

Ekosysteemin energia vähenee siirryttäessä tuottajista aina hajottajiin asti. Eliöstä toiseen liikuttaessa siirrytään aina yksi taso. Jokaisella tasolla osa ravitusta energiasta kuluu eliön omiin elintoimintoihin. Tämä energia on hävinnyt, kun liikutaan

alemmalle tasolle. Tämän takia tasoja ei ole normaaleissa ekosysteemeissä neljää tai viittä enempää. (Salonen 2006, 269)

2.2 Ravinteiden kierto

Ravintoaineiden kierto kuuluu olennaisena osana ekosysteemiin. Ensisijaisesti ravinteita saadaan ilmakehästä ja maaperästä. Hajottajat ovat ravinnekierrossa erittäin tärkeässä asemassa. Niiden elintoiminnoissa ravinteet mineralisoituvat eli vapautuvat kasveille ja mikrobeille käyttökelpoiseen muotoon (Salonen 2006, 267). Vapautumisen johdosta kasvit käyttävät osan ravinteista ja niiden kierto jatkuu.

Hiili on yksi yleisimmistä elämän rakennusaineista. Hiilen kierto alkaa kasveista. Fotoautotrofeina kasvit yhteyttävät valon voimalla vettä ja ilmakehän hiilidioksidia hiilihydraateiksi eli sokereiksi seuraavasti (Salonen 2006, 270 – 271.):



Kuluttajiin kuuluvat eliöt tarvitsevat kasvin tuottamaa sokeria energiakseen ja hiilen lähteekseen eli ne ovat kemoheterotrofeja. Eliöiden hengittäessä vapautuu hiiltä ilmakehään hiilidioksidina. Eliöiden kuoltua hajottajat vapauttavat hiiltä maaperään. Hiili siis kiertää ekosysteemissä sitoutuen kiinteäksi aineeksi ja vapautuen kaasuna taas sitoutuakseen. (Salonen 2008, 271.)

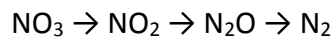
Typeä tarvitaan valmistamaan proteiineja, nukleiinihappoja ja lehtivihreää eli klorofyllejä. Ilmakehässä oleva typpikaasu (N_2) on käyttökelvottomassa muodossa kasveille ja eläimille. Typeä pääsee ekosysteemeihin ilmakehästä hiukkasiin sitoutuneena sateen ja pölyn mukana. Tämä on kuitenkin liian vähäistä typen kulutuksen kannalta. Maaperässä on sen takia typeä sitovia bakteereja, jotka

muuttavat typpikaasua orgaaniseen muotoon, ammoniakiksi. (Salonen 2006, 271 – 273.)

Nitrifikaatiobakteerit taas muuttavat ammoniakin nitraatiksi, jota kasvit voivat käyttää. Tätä aerobista reaktiota kutsutaan nitrifikaatioksi. (Salonen 2006, 271 – 273.) Martikaisen (2003, 111) mukaan reaktioyhtälö on seuraava:



Hapettomissa eli anaerobisissa oloissa denitrifikaatiobakteerit käyttävät nitraatin hapen itse, jolloin syntyy ilmakehään palaavaa typpikaasua. (Salonen 2006, 272.) Martikaisen (2003, 112) mukaan reaktioyhtälö on seuraava:



Ammonifikaatiossa orgaaniseen aineeseen sitoutunut typpi vapautuu maaperään ammoniumina. Tämän aiheuttavat hajottajat, varsinkin sienet ja bakteerit.

Ammonium on eliöille käyttömuotoisessa muodossa. Hajottajat auttavat suuria määriä typpeä takaisin ravinnekiertoon. (Salonen 2006, 272 – 273.)

Typhen kierto on samantapainen prosessi kuin hiilellä. Siihen liittyy kaasumainen ja kiinteä olomuoto. Bakteerit sitovat typpeä maaperään, josta kasvit saavat sitä.

Eläimet eivät saa typpeä kuin syömällä kasveja tai muita eläimiä. Useimmat kasvinsyöjät suosivat siksi typpipitoisia kasveja. Eliöiden kuollessa hajottajat vapauttavat typhen maaperään. (Salonen 2006, 272 – 273.)

Fosfori on tärkeä alkuaine elämän kehittymiselle ja ylläpitämiselle, sillä se on soluissa nukleiinihappojen, ATP:n ja fosfolipidien rakenneosana. Fosfori on maaperässä kasveille käyttömuotoisena epäorgaanisina fosfaatteina. Eläimet voivat saada fosfaatteja vain kasveista ja myöhemmin muista eläimistä. Fosforia vapautuu maaperään kallioista ja

maakerrostumista hajoamalla ja liukenemalla, sekä hajottajien kautta kuolleesta orgaanisesta aineesta. (Salonen 2008, 273.) Fosforin kierto eroaa suuresti hiilen ja typen kierrosta, koska sillä ei ole kaasumaista olomuotoa. Se kiertää maaperästä kasvien, eläinten ja hajottajien kautta takaisin maaperään.

3 MYKORRITSA

Mykorrhitsa eli sienijuuri on kasvin ja sienen mutualistinen eli molempia hyödyttävä symbioosi. Maanpäällisistä kasveista suurin osa muodostaa mykorrhitsoja.

Sienet ovat oma kuntansa kasvikunnan ja eläinkunnan ohella. Sienet kuuluvat eukaryooteihin eli aitotumallisiin eliöihin. Sieni voi kasvaa yhteen liittyneinä soluina rihmastona tai erillisinä soluina hiivana. Sienet voivat lisääntyä suvullisesti ja suvuttomasti. Sienet tuottavat itiöitä. Suurin osa sienistä on kemohetererotrofeja, eli ne käyttävät orgaanista ainetta ravinnokseen ja hiilen lähteekseen. Jotkin sienet muodostavat symbioosin toisen organismin kanssa. (Deacon 2006, 4 – 7.) Laajaan sienikuntaan kuuluvat esimerkiksi kantasienet (*Basidiomycota*), kotelosienet (*Ascomycota*), keräsienet (*Glomeromycota*), yhtymäsienet (*Zycomycota*) ja piiskasienet (*Chytridiomycota*) (Deacon 2006, 16). Arkikielessä sienet tarkoittavat sienen itiöemää, joka on sienen lisääntymiselin (Buczacki 1989, 8).

Kasvien juurien päätehtävät ovat kiinnittää kasvi kasvualustaan ja ottaa sieltä ravinteita ja vettä. Ne toimivat myös kasvin johto- ja varastosolukkona. Kannosta lähteviä, läpimitaltaan yli 20 mm olevia juuria kutsutaan tukivarsiksi, 2 – 20 mm paksuja juuria paksujuuriksi ja alle 2 mm:n paksuisia hienojuuriksi. Juurenkärkiä ovat hienojuurista haarautuvat puuttomat osat. Juurenkärjistä haarautuu juurikarvoja. Ne ottavat tehokkaimmin vettä ja ravinteita, koska ovat puuttomia. (Helmisaari H., Lehto T. & Makkonen K. 2003, 115 – 116.)

Mykorrhitsan sienirihmasto on jatke puun juurille. Esimerkiksi grammassa maaperää voi olla jopa 50 metriä vesikkeli-arbuskelimykorrhitsan sienirihmasto. Tämä riippuu juurien tiheydestä, sienen kolonisaatiosta, kausivaihtelusta ja muista maaperän ominaisuuksista. (Allen 1991, 16.) Ohuessa rihmastossa on paljon pinta-alaa, mikä tehostaa veden ja ravinteiden talteenottoa (Helmisaari ym. 2003, 120). Lisääntynyt ravinteiden saanti lisää kasvin kasvua ja lisääntymistä (Salonen 2006, 218 – 219).

Mykorrhitsat ovat avainasemassa ekosysteemin ravinteiden kierrossa (Barea, Azcon-Acuilar, & Azcon 1997, 67). Aiemmin selvitettiin ekosysteemin ravinne- ja energiavirtoja. Sieni kuuluu hajottajiin ja se tarvitsee orgaanisia yhdisteitä energiantuottoon ja hiilen lähteeksi. Kasvi taas ottaa energian auringosta ja hiilen ilmasta. Mutualistiseen symbioosiin päädytään, koska sieni tehostaa kasvin veden ja ravinteiden, etenkin fosforin ja typen, ottoa maaperästä. Kasvi antaa sienelle vastaavasti hiilihydraatteja hiilen ja energian lähteeksi. Molemmat antavat vaihdossa tuottamia ravinteita ja saavat tilalle sellaisia tuotteita, joita eivät voi itse tuottaa.

Mykorrhitsan muodostus voi olla haitta kasville, jos se saa tarpeeksi ravinteita ilman mykorrhitsaa. Tällöin kasvi antaa vaihdossa turhaan pois hiiltä, eikä saada sieneltä vastavuoroista palvelusta. (Salonen 2006, 214.) Tällöin ei päästä mutualistiseen symbioosiin vaan sieni toimii lähinnä loisena. Ympäristö siis määrittää, mikä mykorrhitsa toimii missäkin, jos ylipäätään ollenkaan.

Mykorrhitsa on myös etua kasvitauteja (Salonen 2006, 219), raskasmetalleja (Janhunen & Helmisaari 1998, 206) ja kuivuutta (Salonen 2006, 214) vastaan. Mantteli estää muita patogeenejä pääsemästä fyysisesti lähelle juurenkärkeä. Mykorrhitsat erittävät muita patogeenejä haittaavia aineita maaperään. (Helmisaari ym. 2003, 121.) Kasvipatogeenit ovat virusten, bakteerien ja sienten aiheuttamia tauteja, joilla on suoria ja epäsuoria vaikutuksia (Salonen 2006, 205).

Ektomykorritsoilla sienen kasvua rajoittaa hiilen saanti siinä määrin, ettei itiöemää muodostu ilman symbioosisuhdetta. Hiiltä on niin niukasti esimerkiksi metsämaassa. Kasvi tarvitsee sieneltä tulevaa fosforia ja erityisesti typpeä normaaliin kasvuun. Fosforin saanti edistää veden kuljetusta kasvien juurissa. Suomessa metsäpuut ovat riippuvaisia mykorritsoista typen riittävän saannin vuoksi. (Helmisaari ym. 2003, 119 – 120.) Symbioosissa molemmat ovat normaalissa tilassa.

Mykorritsoja on kahta tyyppiä: pintasolukossa solujen väliin tunkeutuvia ektomykorritsoja ja soluseinän läpi tunkeutuvia endomykorritsoja. Ektendo- ja arbutoidimykorrhizat ovat välimuoto, joilla on juuren päällä rihmastoja ektomykorritsojen tapaan ja jotka tunkeutuvat soluseinän läpi endomykorritsoille ominaisesti.

3.1 Ektomykorritsa

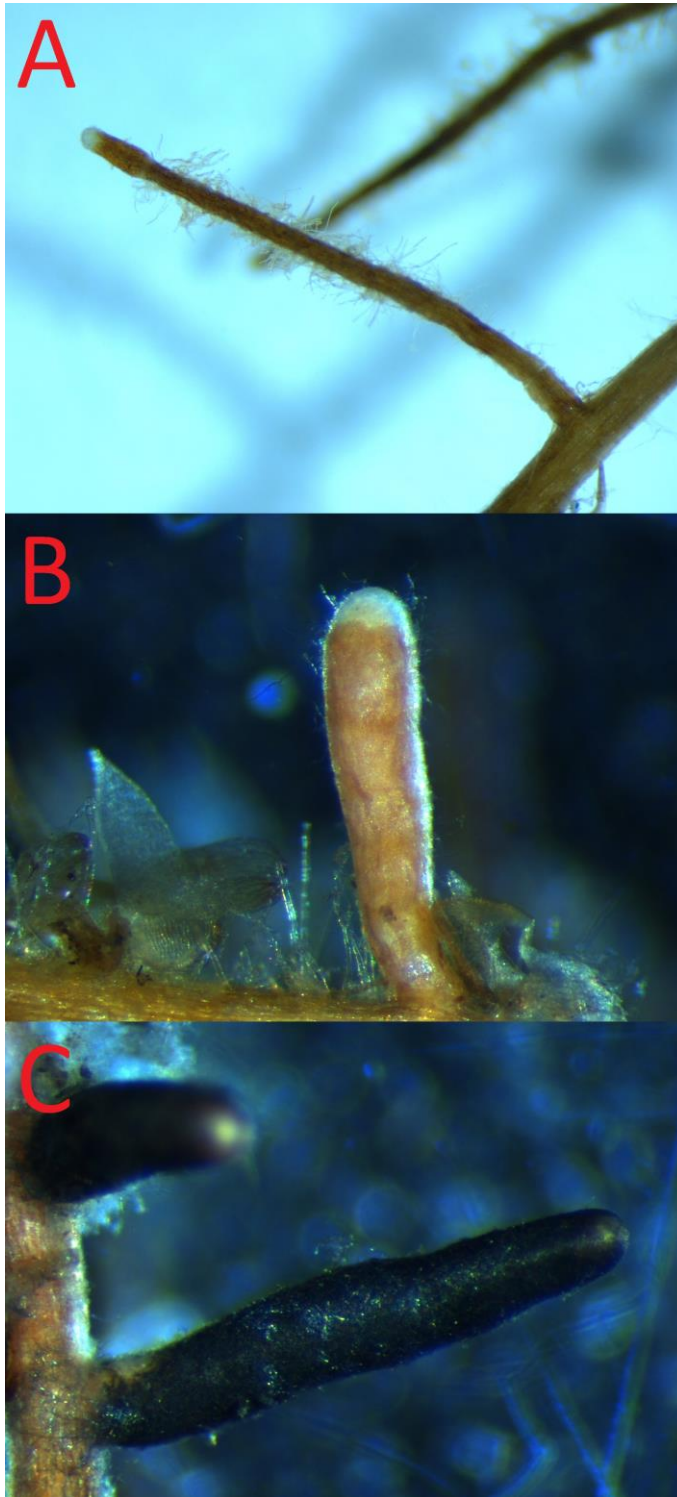
Maanpäällisistä kasveista arviolta kolme prosenttia muodostaa ektomykorritsoja. Suurin osa on monivuotisia puuvartisia kasveja eli puita ja pensaita. Maailman puutavaran tuoton kannalta ektomykorritsat ovat tärkeässä roolissa. Suomessakin tärkeimmät puutavaran raaka-aineet, mäntykasvit (*Pinaceae*), muodostavat ektomykorritsoja. Mäntykasveihin kuuluvat muun muassa kuusi (*Picea*) ja mänty (*Pinus*). 5000 – 6000 sienilajia muodostaa ektomykorritsoja, joihin kuuluu kotelosieniä ja kantasieniä. Suurin osa sienilajeista on kantasieniä. (Smith & Read 2008, 192 – 197.)

Johtuen sienilajien suuresta määrästä kasveilla voi olla useita eri vaihtoehtoja muodostaa mykorritsa. Sama sienilaji voi muodostaa mykorritsan usean kasvin kanssa. Kasvilla voi olla myös useita mykorritsoja samaan aikaan. Tyypiltään ne voivat olla esimerkiksi ekto- ja arbuskelimykorrhizojen tapaan. (Salonen 2006, 216 – 217.)

Kasvupaikalla saatavilla olevat ravinteet ja sienen sopivuus kasvupaikalle säätelevät symbioosiparin toimivuuden (Helmisaari ym. 2003, 121).

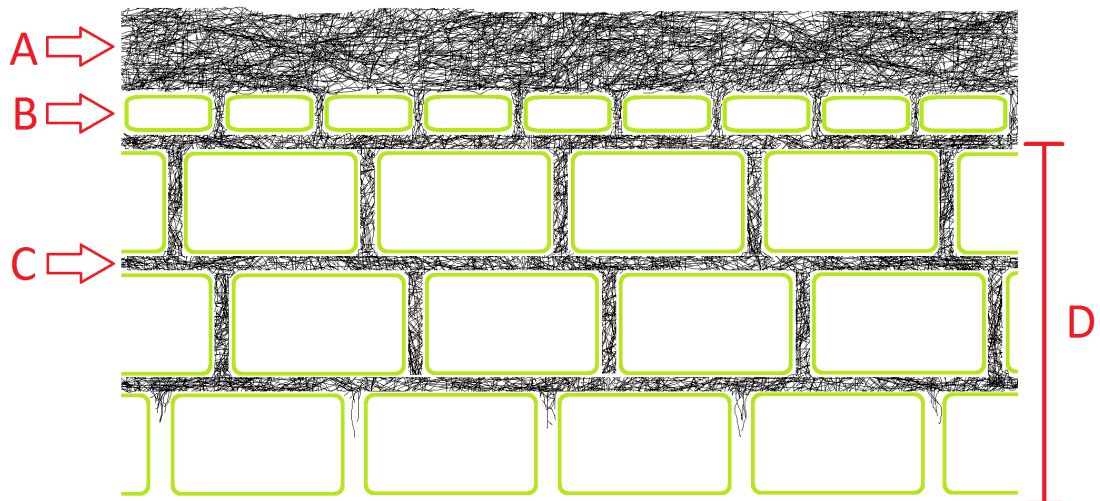
Ektomykorriitsalle on ominaista kolme ulkoista rakennetta: mantteli eli juurenkärjen ympäröivä rihmasto, pintasolukon ja johtosolukon väliin kasvanut rihmasto eli Hartigin verkko ja ulospäin kasvavat rihmaston osat, jotka ovat yhteydessä maaperään ja itiöemään. Osa rakenteista voi kuitenkin puuttua. (Smith & Read 2008, 191 – 192.) Ektomykorriitsat lisäävät hienojuurien haaroittumista (Helmisaari ym. 2003, 117).

Sieni ja juuri kohtaavat kasvaessaan maaperässä. Sieni-infektio alkaa juurikarvoista, koska ne tarjoavat suuren pinta-alan maaperän rihmastolle. Infektio leviää juurikarvan pinnalta juurenkärkeen (Smith & Read 2008, 223). Manttelin muodostuminen alkaa sienirihmaston saavutettua juurenkärjen. Aluksi rihmasto leviää juurenkärjen pinnalla juurikarvojen väleissä. Juurikarvat ovat selvästi näkyvissä. Rihmasto lisääntyy juurenkärjen ympärillä, kunnes mantteli on valmis ja juurenkärkeä ympäröi paksu rihmasto, eikä juurikarvoja enää näy. (Smith & Read 2008, 233.) Kuviossa 1 näkyy erilaisissa mykorriitsavaiheissa olevia juurenkärkiä.



KUVIO 1. Mikroskooppikameran kuvia mykoritsan kehitysvaiheista. **A.** Mykoritsaton paljas juurenkärki. Juurenkärjen pituus kuvassa on 5 mm. **B.** Mykoritsallinen juurenkärki. Juurenkärjen pituus kuvassa on 2 mm **C.** Mykoritsoitunut juurenkärki, jossa mantteli selvästi näkyvässä. Juurenkärjen pituus kuvassa on 3 mm.

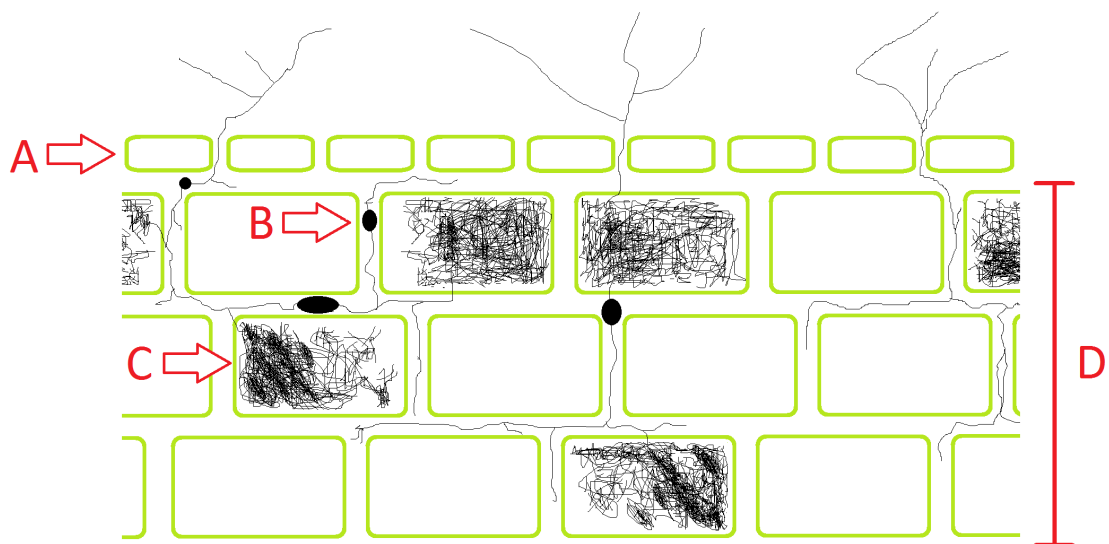
Ensin sienirihmasto saavuttaa juurenkärjen, sitten rihmasto tunkeutuu juurisolukon sisään ja lopuksi mantteli valmistuu. Manttelin sisäosasta juuren sisään kasvavaa rakennetta kutsutaan Hartigin verkkoksi. Koppisiemenisillä kasveilla tunkeutuminen rajoittuu pinta- eli epidermisolukkoon. Paljassiemenisillä kasveilla rihmasto tunkeutuu pintasolukon ohi johtosolukkoon. Juurisolukon sisään tunkeutunut rihmasto kasvaa verkkomaisesti solujen ympärille. Tämän takia solun ja rihmaston välillä on suuri kosketuspinta-ala. Joissakin tapauksissa rihmasto voi läpäistä soluseinän. (Smith & Read 234 – 237.) Ravinteiden vaihto kasvin ja sienen välillä tapahtuu Hartigin verkossa (Salonen 2006, 216). Manttelista ulospäin kasvaa joko yksittäisiä rihmoja eli hyyfiä tai yhteen kietoutuneita paksumpia rihmastosäikeitä eli ritsoideja (Helmisaari ym. 2003, 117). Mikroskoopissa hyyfi näyttää lähinnä manttelista kasvilla hiuksilta. Ektomykorritsalajeja voidaan tunnistaa manttelin värin ja ulkoisen rihmaston rakenteen perusteella (Smith & Read 2011, 239). Kuviossa 2 näkyy ektomykorritsan rakenne.



KUVIO 2. Ektomykorritsan kaavakuvi. Musta väri kuvaa sienirihmastoja. A. Mantteli B. Pintasolukko C. Hartigin verkko D. Kuorisolukko

3.2 Arbuskelimykorrhitsa

Arbuskelimykorrhitsat kuuluvat endomykorrhitsoihin (Helmisaari ym. 2003, 118). Ne ovat yleisimpiä mykorrhitsoja ja niillä on todella laaja valikoima kasveja symbioosin muodostamiseen. Sammalet, sanikaiset, paljas- ja koppisiemeniset muodostavat arbuskelimykorrhitsoja (Smith & Read 2011, 5). Niitä on vaikea tunnistaa, koska ne eivät tee juurenkärkeen ulkoisia rakenteita, kuten manttelia. Soluseinän sisälle tunkeutunutta ja poimuttunutta sienirihmaston rakennetta kutsutaan arbuskeliksi. (Smith & Read 2011, 5 – 15.) Rihmasto ei ole tunkeutunut solulimaan asti (Smith & Read 2011, 66). Aineiden vaihtuminen tapahtuu arbuskeleissa. Solujen väleissä kulkee sienirihmaa, joka yhdistää arbuskelit. Paikoittain solujen välissä kulkeva sienirihma voi olla pullistunut. Pullistumaa kutsutaan vesikkeliksi. Vesikkelit toimivat varastointi- ja lisääntymispaikkoina. (Helmisaari ym. 2003 118 – 119.) Kuviossa 3 on esitetty arbuskeli-vesikkelimykorrhitsan rakenne.



KUVIO 3. Arbuskeli-vesikkelimykorrhitsan kaavakuvio. Musta väri kuvaa sienirihmastoja. A. Pintasolukko B. Vesikkeli C. Arbuskeli D. Kuorisolukko

3.3 Taimitarhamykorritsa

Taimitarhan ja istutuspaikan kasvuolosuhteet eroavat paljon toisistaan. Luonnossa ektomykorritsa leviää itiöteitse ilman mukana. Taimitarhoilla kasvatushuoneet estävät leviämisen ilman mukana. (Helmisaari ym. 2003, 115 – 128.)

Taimitarhamykorritsa kuitenkin pääsee leviämään kasteveden mukana. Yleisesti taimitarhalla taimet saavat normaalia enemmän vettä ja ravinteita. Kasvuolosuhteet eivät vastaa metsässä vallitsevia. *Thelephora Terrestris* on maailmanlaajuisesti yleinen taimitarhan olosuhteisiin sopeutunut ektomykorritsa (Smith & Read 2011, 626). Se kestää hyvin yltäkyläisen ravinteiden ja veden saannin sekä korkean pH:n. Taimitarhoilla *Thelephora Terrestris* auttaa ehkäisemään juuritauteja. (Helmisaari ym. 2003, 121.) Se ei ole kuitenkaan paras mahdollinen sieni metsän olosuhteissa, kun vettä ja ravinteita ei enää tule tasaisesti kasteluohjelman mukaan.

Taimen olisi otollisinta mykorritsoitua jo taimitarhalla istutuspaikalle soveltuvalla sienellä. Sieni kasvattaa rihmaston nopeasti maahan. Mykorritsallinen juuristo on kasville eduksi, vaikkei se soveltuisikaan istutuspaikalle. Huonosti soveltuva sieni voi väistyä paremman tieltä jo parin kasvukauden aikana. Mykorritsallisella kasvilla on todettu olevan paremmat elinmahdollisuudet kuin kasveilla, joilla mykorritsaa ei ole. Mykorritsa, joka ei väisty eikä tarjoa ravinteita riittävästi suhteessa puulta saamaansa hiileen ei paranna elinoloja. (Helmisaari ym. 2003, 121.)

Mahdollisesti käytössä oleva seulottu tai sterilisoitu kasvualusta ei sisällä mykorritsasieniä. Tässä työssä käytettyjä paakkutaimia kasvatettiin kenoissa Haapastensyrjän taimitarhalla. Taimet olivat kaksivuotiaita.

4 GENEETTINEN TIETO

DNA:n eli deoksiribonukleiinihapon rakenteen ymmärtäminen on tärkeää tässä opinnäytetyössä käytettävien menetelmien kannalta. Ne perustuvat rakenteen avautumiseen ja sulkeutumiseen.

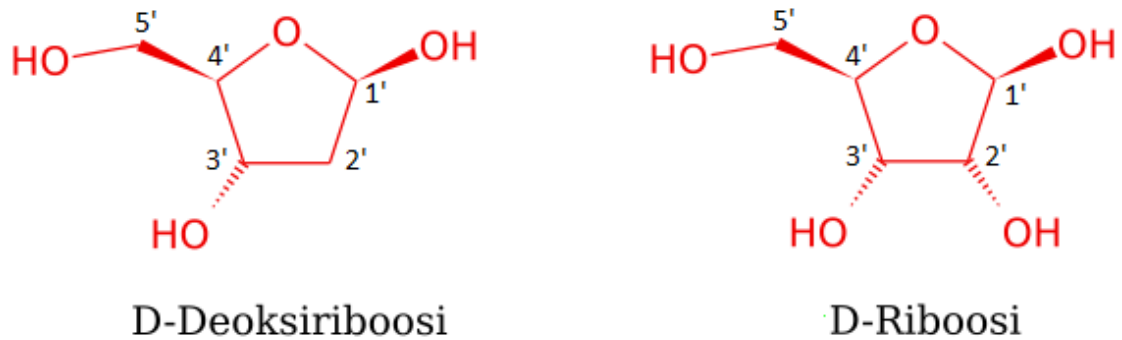
Maapallolla elämän geneettinen tieto on varastoitu soluissa nukleiinihappoihin. DNA:sta tieto välittyy neljän kirjaimen koodina RNA:han eli ribonukleiinihappoon, jonka mukaan rakennetaan proteiineja. DNA:sta tehdään transkriptiossa RNA:ta. Prosessia RNA:sta proteiiniksi kutsutaan proteiinisynteesiksi. (Devlin 2011, 26.) Solujen toiminta riippuu olennaisesti proteiineista. Nukleiinihapot ovat ketjumaisia molekyylejä, jotka muodostuvat nukleotideista. Kahden perättäisen nukleotidin paria kutsutaan dinukleotidiksi, kolmesta viiteenkymmeneen nukleotidin ketjua oligonukleotidiksi ja yli viidenkymmenen ketjua polynukleotidiksi. (Devlin 2011, 30.) Ketjua voidaan kutsua myös juosteeksi. Yksi nukleotidi muodostuu fosfaattiryhmästä, sokerista ja emäksestä.

4.1 Nukleiinihappojen rakenne

Deoksiribonukleiinihappo eli DNA koostuu kahdesta toisiinsa liittyneestä juosteesta. Kaksoisjuoste on kietoutunut kierteelle. Tämä johtuu kasautumisvoimista, mm. hydrofobiset ja van der Waalsin voimat, ja emästen vetysidosten vuorovaikutuksesta. (Devlin 2011, 34 – 35.) Yksi juoste koostuu perättäisistä deoksinukleotideista.

RNA eli ribonukleiinihappo on yksijuosteista ribonukleotideista muodostunutta ketjua. Se eroaa rakenteeltaan kaksijuosteisesta DNA:sta sokeriltaan ja yhdeltä emäkseltään. RNA:n mukaan rakennetaan proteiinisynteesissä proteiineja. RNA:ta on useita erilaisia, esimerkiksi lähetti-RNA, siirtäjä-RNA ja ribosomaalinen-RNA. (Devlin 2011, 26.)

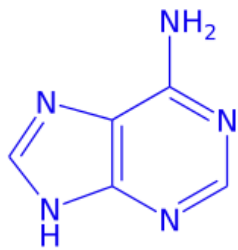
Nukleiinihappoissa tavataan kahta erilaista sokeria. Deoksiriboosi on DNA:n ja riboosi on RNA:n sokeri. Molemmat ovat pentooseja eli ne koostuvat viiden hiilen ketjusta (ks. kuvio 4). Nukleiinihappoissa niiden neljä hiiltä ja happi muodostavat heterosyklisen viisirenkaisen eli viisikulmaisen rakenteen. Sitä kutsutaan furanoosiksi. Sokerien hiilet numeroidaan niin, että ensimmäinen (1') hiili on sitoutunut renkaan happiatomiin. Nukleiinihappojen sokerit eroavat toisistaan hiukan rakenteeltaan. Deoksiriboosi on pelkistynyt riboosi. Siitä puuttuu toisen hiilen happiatomi. (Devlin 2011, 27.) Kuviossa 4 alla on esitetty sokerien rakenne.



KUVIO 4. Nukleiinihappoissa esiintyvät sokerit. Sokerin hiilet on nimetty numeroin.

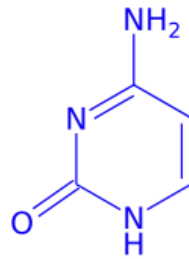
Emäksiä on kahta luokkaa: puriineja ja pyrimidiinejä. Molemmat ovat heterosyklisiä yhdisteitä, jotka sisältävät typpeä. Puriineihin kuuluvat emäkset ovat adeiini (A) ja guaiini (G). Pyrimidiineihin taas kuuluvat tymiini (T), sytosiini (C) ja urasiili (U) (ks. kuvio 5). DNA:ssa puriinit pariutuvat vetysidoksin pyrimidiinien kanssa. Näin saadaan DNA:ta koodaavat emäsparit A – T ja G – C. Emäsparit ovat komplementaarisia, esimerkiksi adeiinin vastakappale on tymiini. Tämä toimii myös toisin päin. Yksijuosteisessa RNA:ssa urasiili korvaa tymiinin. (Devlin 2011, 27.)

Puriinit

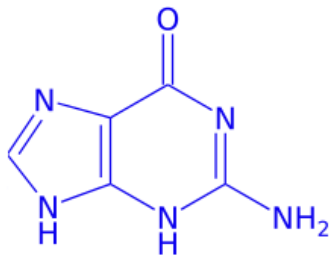


Adeniini

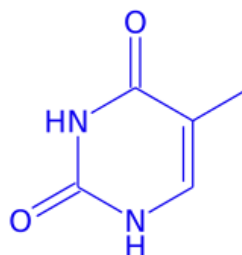
Pyrimidiinit



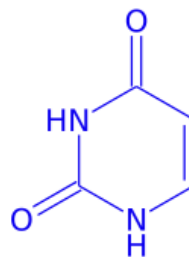
Sytosiini



Guaniini



Tymiini

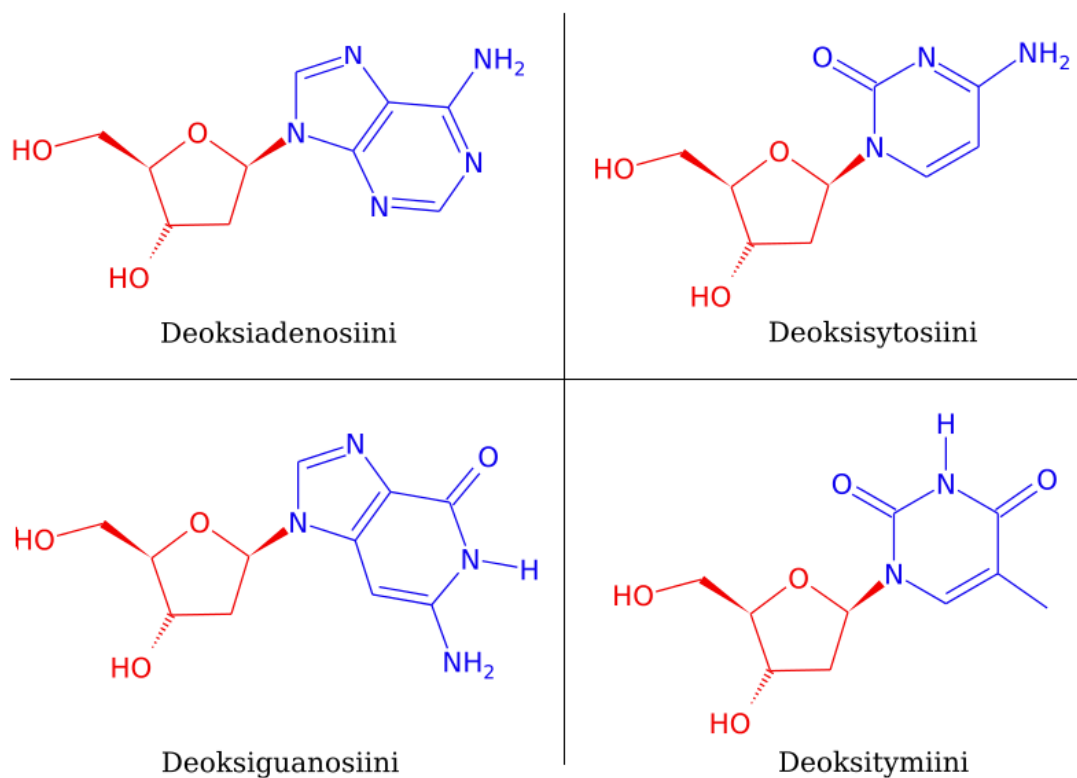


Uraasiili

KUVIO 5. Nukleinihappojen emäkset.

A – T sitoutuu toisiinsa kahdella vetysidoksella, kun taas G – C sitoutuu kolmella vetysidoksella. Vetysidokset muodostuvat elektronegatiivisuuden mukaan. Typpi tai happi ovat varautuneet negatiivisesti ja vety on varautunut positiivisesti. Happi ja vety ovat hyviä elektronin vastaanottajia ja vetyyn sitoutunut typpi hyvä elektronin luovuttaja. (Devlin 2011, 33.)

Sokeri ja emäs liittyvät toisiinsa N-glykosididoksella. Se syntyy emäsrenkaan typen ja sokerin ensimmäisen (1') hiilen välille, niin että hydroksyyliiryhmä ja typen vety lohkeavat pois vetenä. Sokerin ja emäksen muodostamaa molekyyliä sanotaan nukleosidiksi. RNA-nukleosidit koostuvat riboosista ja emäksistä, joista urasiili korvaa tymiinin. (Devlin 2011, 27.) Kuviossa 6 näkyy deoksiriboosin ja emäksien väliset DNA-nukleosidit.



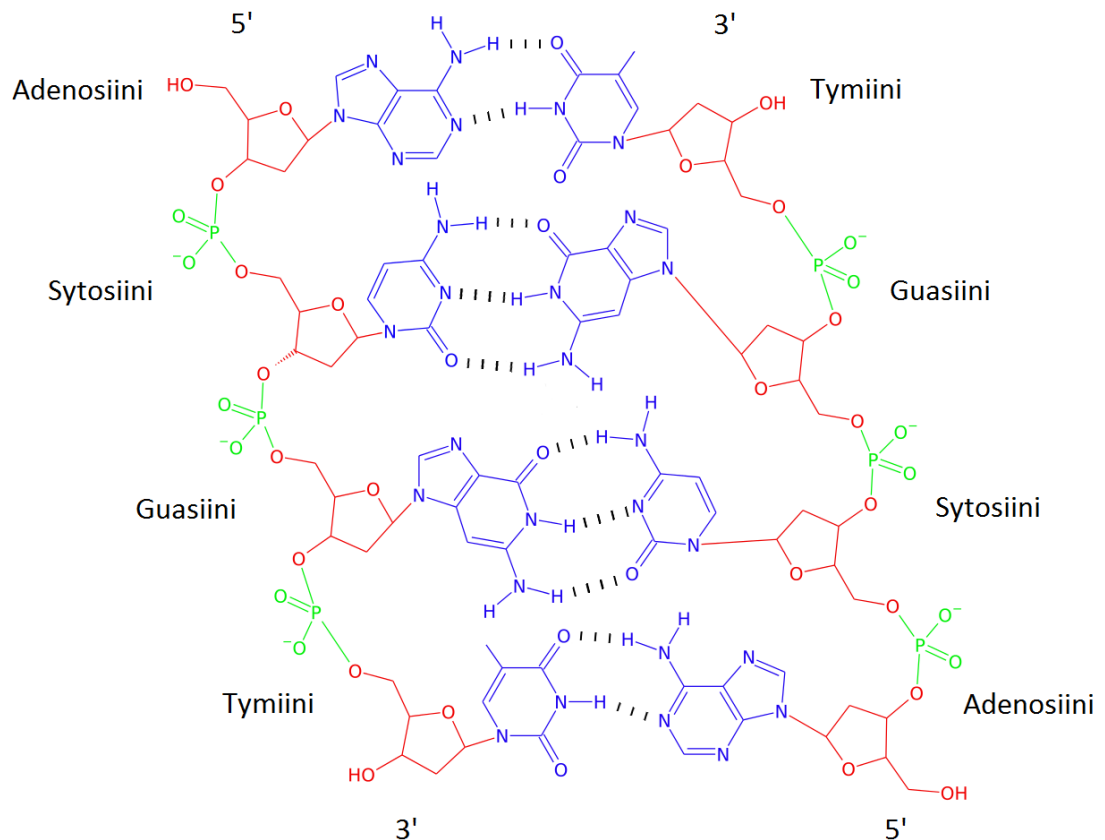
KUVIO 6. DNA:n nukleosidit.

Nukleotidi syntyy fosfaatin liittyessä fosforylaatiolla nukleosidiin. Liittyminen voi tapahtua mihin hydroksyyliiryhmään tahansa. Nukleiinihapoissa tavataan sokerin viidenteen (5') hiileen tapahtunutta liitosta. Nukleotidit liittyvät toisiinsa fosfaatin

liittyessä seuraavan nukleotidin kolmannen (3') hiilen hydroksyyliiryhmään. Syntynyttä sidosta kutsutaan fosfodiesterisidokseksi. (Devlin 2011, 30.)

Nukleotidin rakenne on vakaa laajalla pH-alueella, joka kattaa biologisesti oleellisen pH-alueen (pH 6 – 8). Nukleotidin rikkoutumiseen tarvitaan äärimmäiset olosuhteet. Esimerkiksi N-glykosidisisidos katkeaa vasta 60 %:ssa perkloorihapossa 100 asteessa, jolloin myös sokeri tuhoutuu. (Devlin 2011, 28.) Juosteet koostuvat toisiinsa liittyneistä nukleotideista. Tämän takia myös juosteiden rakenne on vakaa.

Juosteen päillä on omat nimensä. 3'- ja 5'-päiden nimet tulevat sokerin hiiliatomien paikoista. Näillä on esimerkiksi proteiinisynteesissä tärkeä merkitys, jotta koodia luetaan oikeaan suuntaan. (Devlin 2011, 30.) Kuvioon 7 on merkattu 3' aloitus- ja 5' lopetuspäät.



KUVIO 7. DNA:n rakenne. Katkoviivat kuvaavat vetysidoksia. Fosfaattisilta on värjätty vihreällä, deoksiriboosi punaisella ja emäkset sinisellä.

DNA-juosteiden irrottamista toisistaan kutsutaan denaturoimiseksi. Denaturoinnissa vetysidokset katkeavat ja sen seurauksena kolmiulotteinen rakenne muuttuu. Tämä on erittäin tärkeä proteiinisynteesissä ja PCR:ssa. Juosteiden toisistaan irtoamisessa pakkautumisvoimat vaikuttavat enemmän kuin emästen väliset vetysidokset. (Devlin 2011, 34 – 35.) Pakkautumisvoimia voidaan rikkoa monella eri tavalla muuttamalla esimerkiksi pH:ta, suolaisuutta, lämpöä, nostetta, viskositeettia ja sähköisiä voimia. Liuos muutetaan kaksoiskierrettä suotuisammaksi emäksille eli pakkautumisvoimat heikkenevät ja juosteet irtoavat. (Devlin 2011, 35 – 36.)

4.2 Ribosomaalinen DNA

Geenit ovat DNA:n toiminnallisia yksiköitä, jotka koostuvat koodaavista osista eksoneista ja koodaamattomista osista introneista. Geenit sisältävät tiedon muun muassa proteiinin rakentamiseen tarvittavasta primaarirakenteesta. Aluksi DNA:sta käännetään RNA:ta transkriptiossa. RNA:sta pilkotaan pois ylimääräinen, esimerkiksi intronit ja geenin toimintaa säätelevä osa. Tämän jälkeen tapahtuu proteiinisynteesi eli RNA:sta tehdään primaarinen proteiini. (Heino & Vuento 2007, 44 – 46.)

Ribosomi on solun proteiineja syntetisoiva eli yhteen liittävä osa. Ribosomissa primaariproteiineja liitetään toisiinsa monimutkaisemmiksi proteiineiksi. (Heino & Vuento 2007, 78.) Ribosomi koostuu muun muassa ribosomaalista RNA:sta eli rRNA:sta. DNA:ssa on useita rRNA:ta koodaavia alueita. Niitä kutsutaan ribosomaaliseksi DNA:ksi eli rDNA:ksi. Ribosomaaliset RNA:t jaotellaan ja nimetään S-yksiköillä, jotka kuvaavat sedimentoitumista sakkaroosiliuoksessa sentrifuugissa. Aitotumallisilla soluilla on kolme rRNA:ta: 28S, 18S ja 5.8S. (Deacon 2006, 2.)

Aitotumallisilla soluilla rDNA-alueissa esiintyvät rRNA:t järjestyksessä 18S, 5.8S ja 28S. Niiden väleihin jää kaksi ITS-aluetta (engl. internal transcribed spacer). Koko alue sisältää koodaamattomat ITS-alueet ja 5.8S rRNA:n koodaavan alueen. 5.8S alue on melko muuttumaton, mutta ITS-alueiden informaatio muuttuu. (Gardes & Bruns 1993, 112 – 115.)

5 OPINNÄYTETYÖSSÄ KÄYTETYT MENETELMÄT

5.1 Tunnistaminen

Asioiden tunnistamista ulkoisten erojen perusteella kutsutaan morfotyyppaukseksi. Mikroskooppia käytetään apuna näkemään paremmin pieniä kohteita. Yleisimmät mikroskoopit jakautuvat kahteen ryhmään: stereomikroskooppiin ja läpivalaisumikroskooppiin. Ne ovat optisia mikroskooppeja. Niiden suurennus perustuu valon taittamiseen linseillä. Okulaari on osa, johon katsotaan. Okulaarissa on linsejä, jotka suurentavat yleensä 5 – 10 kertaiseksi. Objektiivi on osa lähimpänä näytettä. Siinä on yksi tai useampi linssi, joka suurentaa kuvaa. Okulaarin ja objektiivin tulo on mikroskoopin näyttämä suurennos. (Levine & Johnstone 2008, 12 – 18.)

Stereomikroskoopissa on kaksi erillistä okulaaria, joista kuva kulkee omien linssiensä kautta objektiiville. Se kohdistaa linjat samaan pisteeseen. Silmien linjat tulevat kuitenkin eri kulmissa, ja näin syntyvä kuva on kolmiulotteinen. Tarkasteluun vaadittava valaisu ohjataan näytepöydällä olevaan kohteeseen ylhäältä tai sivuilta. Stereomikroskoopin normaali enimmäissuurennos on 20 – 40 kertainen. (Levine & Johnstone 2008, 12 – 18.) Tämä on varsin pieni verrattuna valomikroskooppiin, jolla päästään tuhatkertaiseen suurennokseen. Valomikroskoopissa valo ohjataan näytteen läpi sen alapuolelta. Näyte tulee siksi olla riittävän ohut läpäistäkseen valoa. Näyte on yleensä kahden lasin välissä. Objektiivi tulee näytteeseen melkein kiinni. (Levine & Johnstone 2008, 12 – 18.)

5.2 DNA:n eristys ja puhdistus

Eristämisessä on tärkeää saada solusta paljon puhdasta DNA:ta talteen. Ensin tulee DNA saada ulos solusta. EDTA eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo heikentää solukalvoa. SDS eli natriumlauryylisulfaatti auttaa solua hajoamaan. DNA denaturoituu tullessaan ulos solusta. (Suominen & Ollikka 1999, 62.)

Liuoksessa on proteiineja, solukalvon osia ja muita epäpuhtauksia, joista tulisi päästä eroon. Fenoli-kloroformiuutto denaturoi proteiinit. Fenoli ja kloroformi ovat orgaanisia liuottimia, eivätkä liukene veteen. Voimakas sekoittaminen auttaa proteiineja denaturoitumaan ja syntyy emulsio. Sentrifugointi erottaa orgaanisen aineen putken pohjalle orgaaniseen liuotinseokseen, proteiinit ovat nesteiden rajapinnalla haalentumana ja vesiliukoinen DNA on ylemmässä faasissa. (Suominen & Ollikka 1999, 64.)

Käsittelyn voi toistaa kloroformi-isoamyylialkoholilla, jolloin syntyy edelleen kaksi faasia. Ylemmässä on DNA liuenneena ja alemmassa ovat mahdolliset proteiinijäänteet.

PEG eli polyetyleeniglykoli saostaa DNA:n vesifaasista. Sentrifugoinnin jälkeen DNA on pellettinä putken kyljessä ja vesiliuos poistetaan. DNA-pelletti pestään etanolilla. DNA saostuu etanolipitoisuuden ollessa vähintään 70 %. Etanoli tulee poistaa esimerkiksi haihuttamalla. DNA säilytetään liotettuna puskuriin. (Suominen & Ollikka 1999, 64.)

5.3 DNA:n monistaminen

Polymeraasiketjureaktio PCR (engl. polymerase chain reaction) monistaa haluttua osaa DNA:sta eli templaattia. Kopioita tuotetaan miljoonia eksponentiaalisesti.

Kopioituminen perustuu lämpötilojen vaihteluun. PCR-reaktio tapahtuu putkessa olevassa nesteliuoksessa, jonka lämpötilaa säädelään tarkasti PCR-laitteella. Monistusreaktio koostuu useasta kolmivaiheisesta kierroksesta. Yhtä kierrosta kutsutaan sykliksi. (Suominen & Ollikka 1999, 107 – 109.) Nesteliuoksessa ovat tarvittavat reagenssit: templaatti, alukkeet, nukleotidit, polymeeraasi, puskuri ja vesi.

Ensimmäinen vaihe on denaturointi. 94 – 98 asteessa lämpötilan vaikutuksesta kaksoisjuosteen kasassa pitävät voimat purkautuvat ja kaksoisjuoste aukeaa (Suominen & Ollikka 1999, 108).

Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan. Alukkeet kiinnittyvät pienen kokonsa ansiosta nopeasti auenneisiin juosteisiin, ennen kuin ne ehtivät sulkeutua. Kiinnitys tapahtuu juosteiden 3'-päihin alukkeita vastaaviin kohtiin. Alukkeet ovat tutkittuja kohtia DNA:ssa ja niiden emäsjärjestys tiedetään. Alukkeiden väliin jää kopioitava DNA:n osa. (Suominen & Ollikka 1999, 107 – 108.) Alukkeessa voi olla kiinni fluoresoiva tai muu toiminnallinen osa.

Kolmas eli pidennysvaihe tapahtuu 72 asteessa. Pidennyksessä rakennetaan kopioitava DNA:n osa. Kiinnittyneiden alukkeiden jälkeen Taq-polymeeraasi aloittaa vastajuosteen rakentamisen liuoksessa olevista nukleotideista kohti 5'-päättä. Rakentuminen tapahtuu DNA:n emäsjärjestyksen mukaan. Taq-polymeeraasi on eristetty kuumissa lähteissä elävältä *Thermus aquaticus* -bakteerilta. Sen takia se kestää lämpöä ja mahdollistaa rakentamisen kuumissa oloissa. (Suominen & Ollikka 1999, 107 – 108.)

Ensimmäinen sykli on suoritettu. Tämän jälkeen aloitetaan uusi sykli. Tätä toistetaan yleensä 15 – 40 kertaa. PCR monistaa 34 syklin aikana 2^{34} eli noin 17 miljardia kopiota.

Alukkeet määrittävät kopioitavan DNA:n alueen kertomalla aloituskohdan ja suunnan. ITS-aluetta on helppo monistaa, mutta se on olemassa laajalla eliökunnalla, esimerkiksi eläimillä, kasveilla ja sienillä. Esimerkiksi ITS-alukkeita käytettäessä näytteestä monistuvat molemmat, sekä kasvin että sien DNA. ITS1F-sienispesifialuke on kehitetty kopioimaan vain sien DNA:ta. Sienillä ITS-alue on 600 – 800 emäsparia pitkä, lajien välinen vaihtelu suurta ja lajien sisäinen vaihtelu vähäistä. Se soveltuu erinomaisesti sienten lajien erottamiseen. Alukkeilla ITS1F ja ITS4 monistuvat kantasienet (*Basidiomycota*) ja kotelosienet (*Ascomycota*). (Gardes & Bruns 1993, 113 – 115.)

ITS1F-GC-alukkeessa oli edellä mainittujen ominaisuuksien lisäksi toiminnallinen osa G – C-häntä, joka mahdollisti denaturoivan gradientti geelielektroforeesin. Siinä G – C-emäspari toistuu peräkkäin monta kertaa. G – C-emäspari on vahvempi kuin A – T-emäspari, koska siinä on muun muassa kolme vetysidosta kahden sijaan (Devlin 2011, 35). Vahvuutensa takia se ei denaturoidu helposti.

5.4 Monistumisen ilmentäminen

Agaroosigeelielektroforeesi on kromatografinen menetelmä. Tarkoituksena on erottaa sähkövirralla molekyylit toisistaan. Agaroosigeelielektroforeesissa varautunut molekyyli liikkuu sähkökentän vaikutuksesta huokoisen geelin läpi. Esimerkiksi negatiivinen molekyyli liikkuu negatiiviselta navalta eli katodilta kohti positiivista napaa eli anodia. Erotuskyky perustuu siihen, että lyhemmät molekyylit mahtuvat kulkeutumaan verkoston väleistä, joihin pidemmät takertuvat. (Suominen & Ollikka 1999, 72 – 74.)

Geeli tehdään sekoittamalla liuokseen pitkiä molekyylejä. Agaroosi on merilevästä eristetty polysakkaridi eli pitkä sokeriketju. Lämmittämällä polysakkaridit leviävät sattumanvaraisesti liuokseen. Huoneenlämmössä liuos jähmettyy geeliksi, jossa

pitkät sokeriketjut kannattelevat välissään olevia vesimolekyylejä. Geeli on huokoinen polysakkaridiketjujen muodostama verkosto. (Suominen & Ollikka 1999, 72.) Sitä voisi luonnehtia siiviläviidakoksi, jossa siivilöitä on peräkkäin koko geelin pituudelta. Konsentraatiolla saadaan säädettyä geelin huokoskokoa.

Erottumiseen vaikuttavat molekyylin varaus ja koko, geelin huokoisuus ja sähkökentän voimakkuus. Sähkövirran voimakkuus vaikuttaa myös molekyylin etenemiseen. Suurella virralla eteneminen on nopeampaa. Huokoisuus tarkoittaa ei kiinteän aineen suhdetta kiinteään aineeseen. Geelin huokoisuus vaikuttaa molekyylin läpäisevyyteen: mitä huokoisempi geeli on, sitä nopeammin molekyyli liikkuu siinä. Verkostossa on siis suurempia aukkoja. (Suominen & Ollikka 1999, 74 – 76.)

Molekyylit saadaan värjäämällä näkyviin. Värjäys voidaan suorittaa monella tavalla. Yleinen värjäysaine on etidiumbromidi. Se on aromaattinen yhdiste. Se fluoresoi oranssinpunaista valoa, kun sitä viritetään UV-valolla. Etidiumioni tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Emäkset absorboivat UV-valoa ja luovuttavat sen energian etidiumille. (Suominen & Ollikka 1999, 72.)

5.5 Sienilajin varmistus

DGGE eli denaturoiva gradientti geelielektroforeesi on kromatografinen elektroforeesinen erotusmenetelmä, joka perustuu näytteen denaturointiin. Siihen soveltuvat samat fysikaaliset lainalaisuudet kuin agarosigeelielektroforeesiin. Siihen on lisätty olennaisena osana näytteen denaturoiva ominaisuus. Denaturoivan aineen määrä lisääntyy edettäessä geelissä. Denaturointi muuttaa näytteen muotoa, yleensä avaten sen. Avautuminen pysäyttää näytteen liikkumiseen geelissä, sillä näytteen koko suurenee avautuessa ja geelin huokoskoko pysyy samana. Avautumisen johdosta tulee ajo-olosuhteet valita sellaisiksi, että osa molekyylistä ei denaturoidu

tai molekyyli hajoaa kokonaan geeliin. Menetelmän erottelukyky on huomattavasti parempi kuin tavallisen geelielektroforeesin.

6 TYÖNSUORITUS

6.1 Näytteiden esikäsittely

Opinnäytetyö aloitettiin 28.10.2010 hakemalla tutkittavat taimet Haapastensyrjän taimitarhalta. Kaksivuotisten taimien juuriin oli ruiskutettu sieniliuosta ja kontrollia. Tarkoituksena oli mykorrhizoida haluttu sieni taimeen. Tutkimuksessa oli kahdeksaa eri sientä. Yhteensä kasvatuskennoja oli 25. Kokeilussa oli myös kahden sienien kombinaatiota. Sieniliuoksen ruiskuttamisen lisäksi taimia kasteltiin normaalisti taimitarhan kasteluohjelman mukaan. Taimista kerättiin systemaattisesti näytteet, jotka tutkittiin mikroskopoimalla. Kennojen laidoissa olevia kuivempia taimia ei kerätty, sillä ne eivät edustaneet riittävän paljon suurinta osaa kennosta. Keräys tapahtui aloittamalla vasemmasta alakulmasta ja etenemällä kohti oikeaa yläkulmaa. Jokaisesta kennosta otettiin kahdeksan näytettä, paitsi kennosta 24 neljä näytettä. Kontrolliin PP03 lisätty liuos sisälsi 5 ml:a tuotteen kasvatusalustaa ja 5 ml:a vettä. Siinä ei siis ollut sientä vaan kasvatusalustaa. Taimitarhakontrolliin F6 ei lisätty lainkaan sieniliuosta. Näytteet laitettiin merkattuihin muovipusseihin ja säilytettiin yön yli viileässä. Taulukossa 1 on lueteltu kennot ja käsittelyt:

TAULUKKO 1. Kennot ja käsittelyt.

Kenno	Käsittely
1	Laccaria sp.
2	Tylospora asterophora
3	Cenococcum geophilum
4	Piloderma byssinum
5	Amphineva sp.
6	Hebeloma sp.
7	Cadophora finlandia
8	Paxillus involotus
9	Laccaria-Piloderma
10	Laccaria-Cenococcum
11	Laccaria-Cadophora
12	Tylospora-Paxillus
13	Paxillus-Cadophora
14	Piloderma-Cadophora
15	Piloderma-Cenococcum
16	Hebeloma-Cadaphora
17	Tylospora-Cadophora
18	Paxillus-Cenococcum
19	Kontrolli PP03
20	Kontrolli PP03
21	Taimitarhakontrolli F6
22	Taimitarhakontrolli F6
23	Paxillus-Cadophora
24	Paxillus-Cadophora
25	Kontrolli PP03

Seuraavana päivänä erotettiin verso juurista katkaisemalla. Verso katkaistiin juuren haarautuessa. Juuret pakastettiin merkityissä muovipusseissa. Versot mitattiin 0,5 cm:n tarkkuudella ja jätettiin huoneenlämpöön kuivumaan paperipusseihin.

Myöhemmin versot kuivattiin Thermo Scientific Heraeus lämpökaapissa neljä tuntia 40 °C:ssa ja punnittiin Mettler Toledo XS403S vaa'alla. Kuivat neulaset tullaan jauhamaan ja analysoimaan myöhemmin (ei tässä opinnäytetyössä).

Jäätyneet juuret sulatettiin ja turve pestiin varoen ennen juurenkärkien laskemista. Liian raju peseminen katkoo juurenkärkiä ja irrottaa mantteleita. Juuret leikattiin kahden sentin paloiksi laskemisen helpottamiseksi. Kaikkia juuria ei ehditty mikroskopoida, kuitenkin jokaisesta kennosta laskettiin neljä näytettä. Lupaavimmista käsiteltiin kaikki kahdeksan taiminäytettä. Tässä opinnäytetyössä mykorritsojen tarkasteluun käytettiin stereomikroskooppia. Satunnaisotannalla kerätyistä juurenpaloista tutkittiin noin 250 juurenkärkeä. Luku saattoi ylittyä, kun laskettiin valittu juurenpala loppuun.

Mykorritsojen tunnistamisessa käytettiin apuna Metsäntutkimuslaitoksen perehdytysmateriaalia, johon oli koottu tietoa sienilajien ulkoisista eroavaisuuksista. Mykorritsaksi laskettiin juurikarvattomat juuret, jotka olivat infektoituneet mykorritsalla. Aluksi infektio poistaa juurikarvat, sitten juurenkärki paisuu ja lopuksi sienirihmastosta muodostunut mantteli tulee selkeästi näkyviin. Juurissa saattoi olla kahtakin eri mykorritsaa, jolloin tunnistaminen vaikeutui. Luokkia olivat ECM1 eli siirrostettu sieni 1, ECM2 eli siirrostettu sieni 2, yleinen taimitarhasieni *Thelephora Terrestris* ja muu, joka ei käynyt edellisistä mihinkään luokkaan. ECM1:n ja ECM2:n piti erottua todella selkeästi, ennen kuin ne luokiteltiin omaan luokkaansa. Mykorritsa laitettiin suoraan luokkaan muu, jos ei voitu olla varmoja. Luokkien varmistumiseksi otettiin juurenkärjistä näytteitä molekyylibiologisia menetelmiä varten. Osa näistä näytteistä kuvattiin mikroskooppikameralla, jotta tulosten tultua voitiin määrittää helpommin kyseinen luokka. DNA-menetelmillä saatiin tietää, mikä sienilaji juuren oli infektoinut. Mahdollisesti väärin tulkitut luokat korjattiin DNA-tulosten valossa.

Juuret sommiteltiin peräkkäin ja mitattiin millimetripaperin avulla, jotta saatiin selville onko sieni vaikuttanut juurenkärkien haaroittumiseen juuressa (ks. liite 7). Lopuksi juuret laitettiin merkittyihin paperipusseihin, joita kuivattiin lämpökaapissa neljä tuntia 40 °C:ssa kuivapainon punnitsemiseksi.

6.2 Perimän erottaminen ja puhdistaminen

Varmistettavia näytteitä säilytettiin veteen jäädytettynä pakastimessa eristykseen asti. Eristyksessä jäädytetyt juurenkärjet sulatettiin ja eristettiin työhohjeen mukaan. Juurenkärjessä oli sienien ja puun DNA:ta. Lisäksi siinä oli myöhempiä työvaiheita, esimerkiksi PCR:ää haittaavia epäpuhtauksia. Eristyksen tarkoituksena oli saada DNA mahdollisimman puhtaana seuraaviin työvaiheisiin.

Aluksi solut rikottiin. Tämä suoritettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkissa, joissa oli 350 µl hajotuspuskuria, joka auttoi DNA:n pois solun sisältä. Hajotuspuskurissa oli EDTA:a ja SDS:a. Vesiliukoisena DNA vapautuu tumasta liuokseen. Solut hajotettiin mekaanisesti jauhamalla juurenkärkeä tikulla putken seinään. Inkubointi suoritettiin 65 asteessa 30 minuutin ajan.

Seuraavaksi näyte uutettiin fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholiseoksella, jossa näyte puhdistui eli DNA erottui proteiineista ja orgaanisesta aineesta. Lisättiin 300 µl fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholia (50:49:1). Ravisteltiin minuutti ja sentrifugoitiin kaksi minuuttia nopeudella 10 000 kierrosta minuutissa. Syntyi kaksi faasia. Alemmassa fenoliliukoisessa faasissa oli orgaaninen aines esimerkiksi juurenkärjen jäänteet. Alempi liuos oli tummentunut epäpuhtauksista. Faasien rajapinnalla näkyivät proteiinit samentumana. Yläfaasissa oli veteen liunneena DNA ja kaikki vesiliukoinen.

Yläfaasi siirrettiin tarkasti uuteen putkeen, johon lisättiin 200 µl kloroformi-isoamyylialkoholia mahdollisen orgaanisen faasin ja siihen liunneiden epäpuhtauksien poistamiseksi. Kloroformi liukenee niukasti veteen, joten hajotuspuskuri erottui hyvin omaksi faasikseen. Ravistettiin 2 minuuttia ja sentrifugoitiin kolme minuuttia. Yläfaasi otettiin talteen uuteen putkeen.

PEG-saostuksessa saostetaan DNA pois vesifaasista. PEG-liuosta lisättiin putken vesiliuokseen suhteessa 10:6 ja sekoitettiin. Liuos siirrettiin jäälle 20 minuutiksi ja sentrifugoitii 20 minuuttia. DNA oli saostunut putken seinään pellettinä. Liuos poistettiin putkesta.

DNA puhdistettiin ravistelemalla 800 µl kylmää 70 %:sta etanolia. Etanoli saostaa DNA:ta ja se tulee poistaa, koska DNA:n on oltava liukoisessa muodossa myöhemmin PCR-reaktiossa. Sentrifugoinnin jälkeen etanoliliuos poistettiin ja DNA-pelletti kuivattiin vakuumisentrifugilla. Lopuksi näyte suspendointiin 30 µl TE-puskuria, joko inkuboimalla 65 °C:ssa 10 minuuttia tai huoneenlämmössä yön yli. Eristettyä DNA:ta säilytettiin -20 °C:ssa pakastimessa.

6.3 Perimän monistaminen

Polymeerasiketjureaktiolla monistettiin eristetyistä DNA:sta lukematon määrä klooneja myöhempisiin työvaiheisiin. ITS1F ja ITS4 alukkeet valikoivat monistuksessa sienien DNA:n muusta. PCR tehtiin kontaminaation ehkäisemiseksi pystyvirtauslaminaarissa. Reagenssit pipetoitiin jäiden päällä, jotta ylimääräisiä reaktioita ei tapahtuisi. Näytteiden lisäksi monistettiin kontrollisienien DNA:ta. Kontrolleina käytettiin yleensä oletettuja ECM1- tai ECM2-luokan sieniä. Muu- luokkaan kuuluville sienille oli yleensä epäily, jota käytettiin kontrollina, tai sitten käytettiin koko tutkimuksen sienilajeja kontrolleina. PCR-reaktio suoritettiin Bio-Rad-merkkisellä laitteella. Taulukossa 2 näkyy PCR-reaktiossa käytetty ohjelma.

TAULUKKO 2. PCR-reaktion ajo-ohjelma. Alussa on pidempi alkulämmitys. Lopussa oleva pitkä viilennysjakso varmisti näytteiden kylmäketjun katkeamattomuuden ja lisäsi säilyvyyttä.

Vaihe	Lämpötila	Aika
1.	95 °C	8 min
2.	95 °C	1 min
3.	58 °C	1 min
4.	72 °C	1 min
5.	jatka 2. vaiheesta 34 kertaa	
6.	72 °C	7 min
7.	8 °C	99 h

Taulukossa 3 ovat PCR-reagenssit ja määrät.

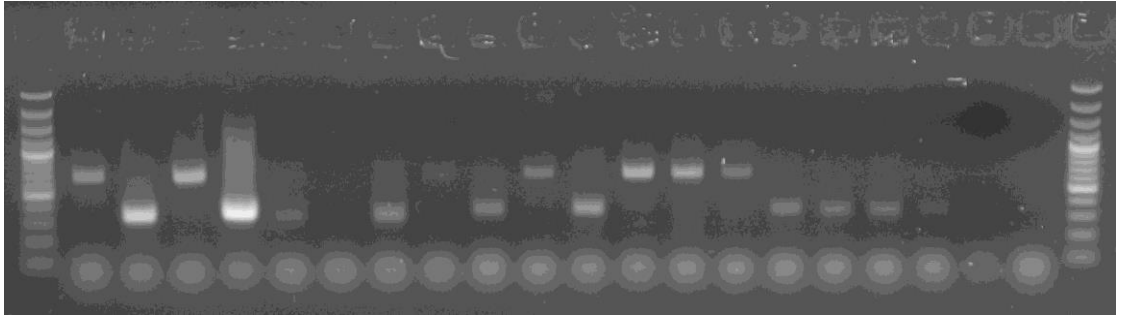
TAULUKKO 3. PCR-reagenssit.

Reagenssi	Määrä µl / Näyte
Templaatti DNA	1
Aluke 25 µM ITS1F-GC	1
Aluke 25 µM ITS4	1
Puskuriliuos	2,5
Tislattu vesi (DDW)	40,8
Nukleotidit 10mM dNTP	1
Puskuri	2,5
Polymeraasi	0,2
Yhteensä	50

6.4 Monistuksen kuvantaminen

Laboratorion ohjeistukseen kuului tarkistaa PCR:n onnistuminen elektroforeesijolla agarosigeelissä ennen kalliimpia määrytyksiä, sillä silmämääräinen todentaminen on mahdotonta. Agarosimäärytyksille oli oma huoneensa, koska etidiumbromidi on karsinogeeninen yhdiste. Aluksi valmistettiin 1,5 prosenttinen agarosigeeli, 230 ml:sta 10 kertaista TAE-puskuria ja 3,45 grammasta agarosia. Agarosia liukeni puskuuriin mikrossa lämmittämällä. Liuoksen jäähtyttyä alle 60 °C:ksi lisättiin etidiumbromidia 5 tippaa väriaineeksi. Geeli sekoitettiin huolellisesti ja kaadettiin geelinvaluastiaan. Ilmakuplat poistettiin pipetin kärjellä ja kammat lisättiin geeliin. Niistä syntyivät näytteiden kaivot. Geeli jähmettyi jäähtyttyään noin 45 minuuttia. Valmiita geelejä säilytettiin jääkaapissa. Geelin valamisessa piti varoa paakkuuntumista. Paakussa sokeriketjujen konsentraatio on suurempi eli siivilöityminen on tiheämpää. Tästä seuraa, ettei molekyyli kulje paakun ohi yhtä nopeasti.

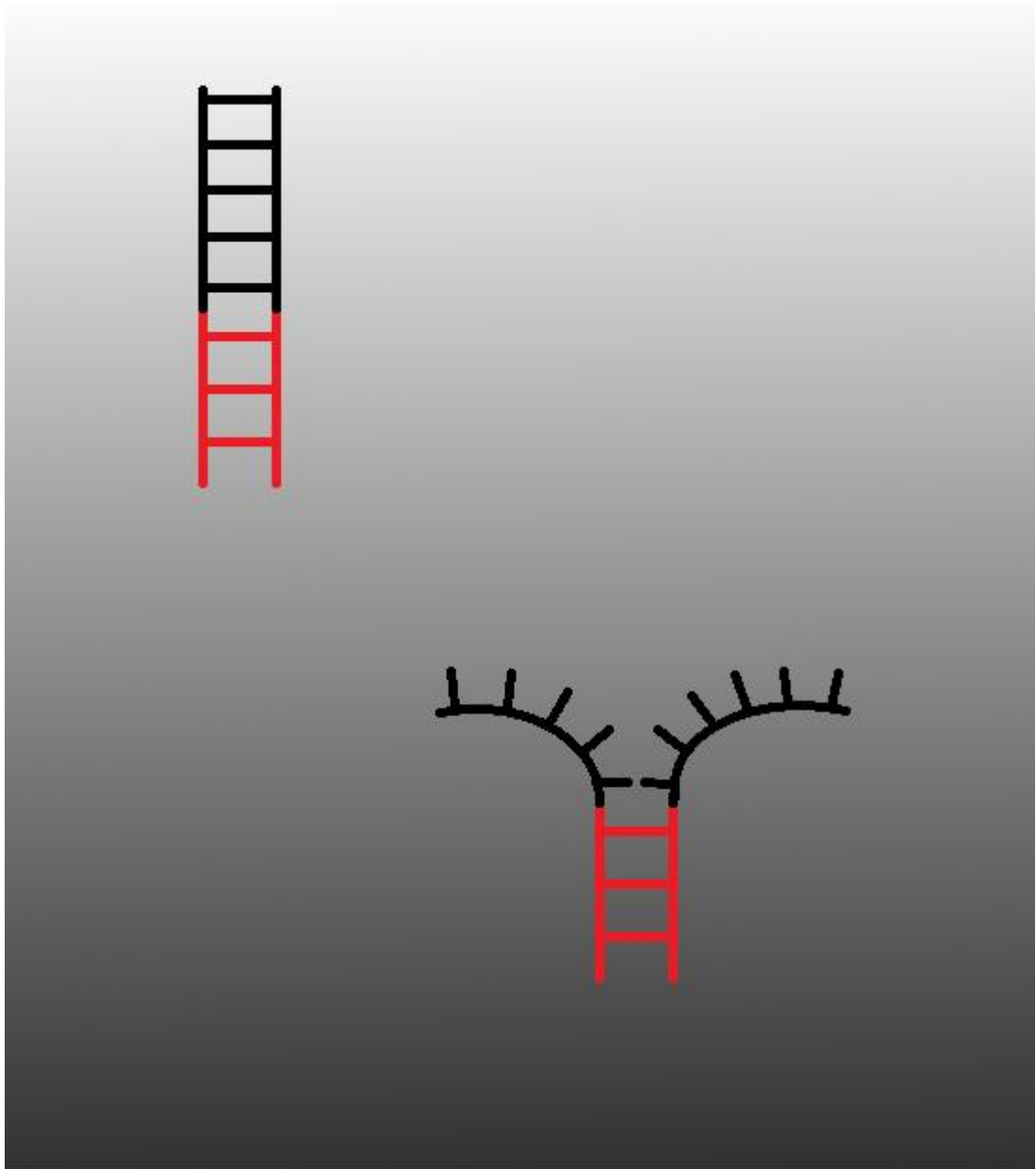
PCR-tuotteisiin lisättiin 12,5 µl viisinkertaista TD:tä väriaineeksi helpottamaan pipetointia geelin kaivoihin elektroforeesilaitteissa. Kontrollia säilytettiin jääkaapissa. Ajo suoritettiin 120 mV:ssa noin 40 minuutissa. Negatiivisesti varautunut DNA-molekyyli liikkuu negatiiviselta navalta eli katodilta kohti positiivista napaa, anodia. Geelit kuvattiin digikameralla UV-valossa. Onnistuneet PCR-reaktiot näkyivät geelissä fluoresoivina nauhoina. Kuviossa 8 näkyvät kontrollit molemmissa reunoissa ja näytteet niiden välissä. Agarosin erotuskyky ei riitä sienilajien tunnistamiseen, sillä eri sienilajien ITS-alueet eivät eroa pituudeltaan tarpeeksi. Ne ajautuvat melkein samaan kohtaan. Kuviossa 8 näkyy PCR-ajon tulos.



KUVIO 8. Monistuksen tarkistaminen. Agarosigeelielektroforeesin ajogeeli UV-valossa. Reunoissa on ladder, joka toimi kontrollina. Oikeassa kulmassa on kaksi näytettä, joissa ei ole ollenkaan PCR-tuotteita.

6.5 Sienilajin varmistus

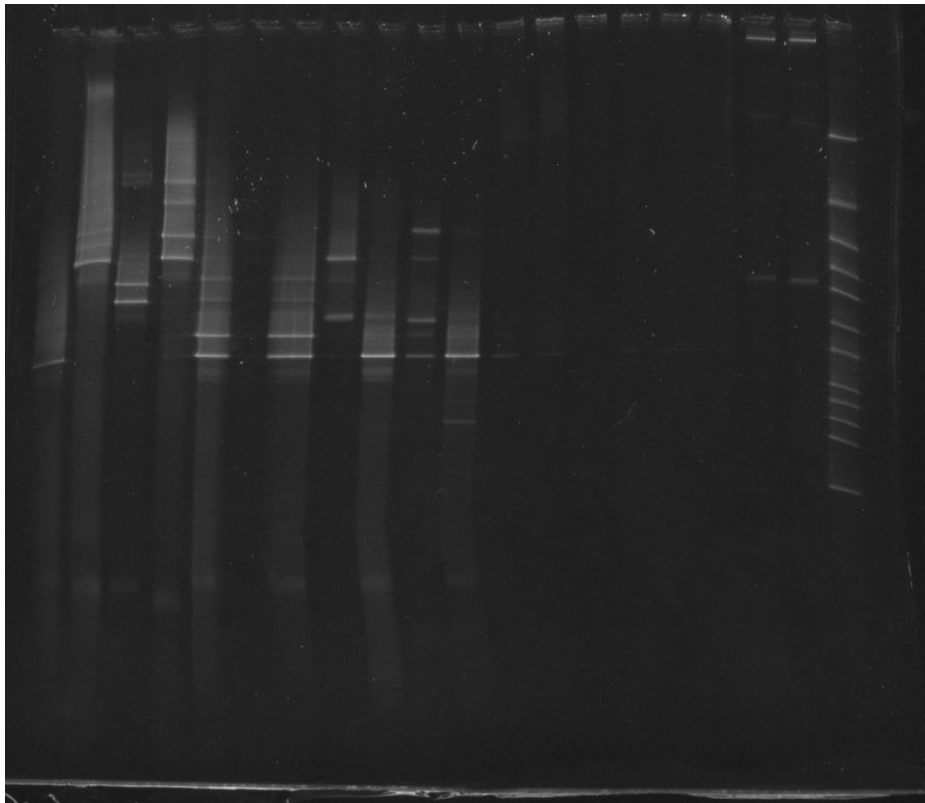
Sienet tulee tunnistaa. Tarkempi menetelmä tunnistamiseen on DGGE eli denaturoiva gradientti geelielektroforeesi. DGGE on menetelmä, jota on käytetty tässä työssä halutun DNA:n erottumiseksi. DNA etenee geelissä, kunnes se denaturoituu eli aukeaa. Tämä tapahtuu siinä pisteessä, jossa denaturoivat voimat voittavat DNA-juosteet yhdessä pitävät voimat. Urea denaturoi DNA:ta. Kaksoisjuoste avautuu aivan kuin vetoketju. Juosteet leviävät toisistaan erilleen. Ainoastaan ITS1F-alukkeen G – C-häntä pitää alukkeen 3'-päässä yhdessä. DNA-molekyylin auennut muoto ei liiku elektroforeesin aikana. Tämä tekee menetelmän erottelukyvyn erittäin tarkaksi. Kuviossa 9 periaate on kuvattu pelkistetysti.



KUVIO 9. Esitys DGGE:n periaatteesta. Vasemmalla puolella on liikkuva molekyyli ja oikealla puolella on avautunut ja pysähtynyt molekyyli. Punainen väri kuvaa G - C-häntää. Musta väri kuvaa muuta DNA:ta.

Denaturoivassa gradientti geielektroforeesissa ajetaan näytteen kanssa aiemmin mainitut kontrollit. Aluksi valettiin geeli, jossa urea lisääntyi kohti pohjaa. Geelin yläpinta oli 18-prosenttinen ja pohja oli 58-prosenttinen. Urean konsentraatio saatiin vaihtumaan tasaisesti pumppaamalla 0-prosenttinen ja 100-prosenttinen liuos

erikoisen gradientinsekoittajan läpi. Ajo voitiin aloittaa, kun TAE-ajopuskuri oli lämmennyt 60 °C:n ja näytteitä pipetoitu 20 µl:a kaivoihinsa. Näytteisiin oli sekoitettu jo PCR-reaktion jälkeen 12,5 µl:a viisinkertaista TD-väriainetta. Ajo suoritettiin Bio-Rad DCode -laitteella ajamalla 16 tuntia 75 V:lla. Sähkövirta kuljettaa näytteitä pohjaa kohti. Ajon jälkeen geeli otettiin varovasti lasien välistä ja värjättiin värjäyshuoneessa 15 ml:lla Sybr Gold -reagenssia. Reagenssin annettiin vaikuttaa puoli tuntia valolta suojattuna ennen kuvaamista. Kuvaus suoritettiin digikameralla ultraviolettivalossa. Sienet olivat selvästi erottuneet omiksi nauhoikseen geelissä. Työvaiheiden jälkeen saatiin haluttu varmistus morphotyypaukselle. Kuviossa 10 alla näkyy Bio-Radin valmistaman DGGE-laitteen tuotos, jossa on paljon tarkempi erottelukyky kuin agarosigeelielektroforeesissa.



KUVIO 10. Bio-Rad-laitteen geelikuva DGGE-ajosta (vrt. kuvioon 8).

7 TULOKSET

Tutkimustulokset olivat odotettuja heikompia. Koko tulosdata löytyy liitteistä 8 – 11. Kaikki sieniliuoskäsittelyt eivät mykorritsoituneet ollenkaan ja ne, jotka mykorritsoituivat kolonisoivat juuristoa arveltua heikommin. Yhden käsittelyn kennoista mykorritsoituivat kennot 2, 3 ja 7 (ks. liite 1). Niistä merkittävimmin kolonisoivat kenno 7, johon oli lisätty *Cadophora Finlandia*:a. Kennon 7 kolonisaatio oli keskimäärin noin 23 % (ks. liite 1). Kahden sienen muodostaman kombinaation käsittelyissä kolonisoivat kennot 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22 ja 23 (ks. liite 2). Kahden sienen kombinaatioissa ainoastaan *Cadophora Finlandia* oli kolonisoitunut merkitsevästi.

Taimitarhamykorritsa eli *Thelephora Terrestris* oli kontaminoinut koko tutkimusaineiston. Taimitarhamykorritsan keskiarvollinen kolonisointiprosentti yksittäisessä kennossa nousi parhaimmillaan yli 80 %:n ja huonoimmillaankin se oli 29,3 % (ks. liite 3). *Thelephora Terrestris* oli siis selvästi hallitseva mykorritsa tämän tutkimuksen koe-erässä.

Massaltaan suurimmat juuret olivat taimitarhakontrolleilla, joihin ei oltu lisätty mitään ja yhdellä kolmesta kasvatusalustakontrollista, johon oli lisätty pelkästään kasvatusalustaa (ks. liite 4). Sama kehityssuunta pätee myös versojen pituuteen (ks. liite 5) ja massaan (ks. liite 6). Taimitarhakontrollit olivat kaikkein vähiten mykorritsoituneet *Thelephora Terrestris*-sienellä.

Juuren haaroittumista kuvaa juurenkärkien lukumäärä senttimetrin matkalla (ks. liite 7). Kennossa 8 *Paxillus Involutus* -käsittelyllä oli kaikkein haaroittuneemmat juuret. Kenno 8 ei ollut kuitenkaan mykorritsoitunut kyseisellä sienellä. Seuraavaksi haaroittunein oli kenno 2 eli *Tylospora* ja kolmanneksi näiden kombinaatio kennossa 11. Erot kennojen välillä olivat todella pieniä.

Opinnäytetyön parhaana tuloksena voidaan pitää sitä, että *Cadophora Finlandia*:n huomattiin mykorrhitsoituvan näillä menetelmillä ja näissä olosuhteissa. Sen käyttö kannattaakin priorisoida tutkimuksen seuraavissa vaiheissa.

8 PÄÄTELMÄT

Tulokset eivät osoittaneet vahvaa kolonisaatiota. Tähän ovat voineet vaikuttaa useat syyt esimerkiksi tutkimuksen toteuttamisessa ja tämän opinnäytetyön tutkimusosan suorituksessa.

Tutkimusasetelmaan liittyviin tekijöihin olennaisena osana kuuluu sienien mykorrhitsoitumis-ominaisuuden säilyttäminen. Yleensä sieni hävittää mykorrhitsoitumis-ominaisuuden keinotekoisilla kasvualustoilla, kun juuret eivät ole läsnä. Kasvualustan liukoiseksi tekeminen saattaa myös vaikuttaa epäedullisesti mykorrhitsoitumiseen, koska rihmastoja rikotaan. Taimitarhoilla siirrostamistapa saattoi olla niin ikään epäedullinen. Koe-erästä saattoivat eniten mykorrhitsoituneita olla kennojen laidassa olevat kuivat taimet, jotka eivät olleet tarpeeksi edustavia näytteiksi. Niissä oli paremmat olosuhteet mykorrhitsoitumiselle, koska ravinteiden ja veden saanti näytti olleen niukempaa.

Kasvuolojen epäedullisuudesta kertoo se, että *Thelephora Terrestris* oli kolonisoitunut koko koe-erän. Sitä ei ollut lisätty taimiin missään vaiheessa, vaan se oli tullut kennoihin kasteluveden mukana. *Thelephora Terrestris*:n mukanaolo oli kokeen kannalta hyvä, sillä lopullisen tuotteen tulee olla taimitarhoille soveltuva ja tehokas. Taimitarhamykorrhitsa ei saa vaikuttaa lisätyn sieniliuoksen kolonisaatioon. *Thelephora Terrestris* on istutushetkellä tyhjää parempi ja auttaa taimea selviytymään.

Opinnäytetyön tutkimuksen osalta tulokset ovat saattaneet vääristyä monella tavalla. Kaikkia taimia ei käyty läpi ajan puutteen takia. On mahdollista, että loput taimet olisivat muuttaneet tuloksia. Tämän vuoksi pyrittiin varmistamaan ne sienilajit, jotka selvästi kolonisoivat juuria ja jätettiin mykorritsattomat sienet taka-alalle. Morfotyyppaus osoittautui vaativaksi menetelmäksi. Siihen liittyvät epävarmuustekijät pyrittiin kuitenkin poistamaan opinnäytetyössä käytettävillä DNA-menetelmillä.

Tuloksissa taimitarhakontrollit olivat selvästi kehittyneimpiä ja niillä oli kaikkein vähiten mykorritsoja. Tämä viittaisi siihen, että taimitarhalla saadaan niin paljon ravinteita ja vettä, ettei mykorritsan muodostus ole elinehto. Päinvastoin se näyttäisi haittaavan kasvua. Aiemmin on selvitetty, että kasvupaikan ollessa kasville edullinen ja sienen soveltuessa kasvupaikalle heikosti toimii mykorritsasieni lähinnä loisena. Se ottaa kasvilta hiiltä, mutta ei pysty antamaan takaisin ravinteita. Mykorritsojen ei voida katsoa lisänneen juurten haaroittumista, sillä kokeessa ei ollut verrattavia mykorritsottomia juuria. Haaroittumisella ei ollut suurta eroa sienilajien välilläkään.

Saadut tulokset ovat vain ensimmäinen osa koko tutkimusta. Lopulliset tulokset selviävät, kun taimitarhalla kasvaneet taimet istutetaan lopulliselle kasvupaikalle. Mykorritsoituminen on eduksi istutushetkellä ja vasta kasvuolosuhteet määrittelevät, toimiiko mykorritsan muodostava pari. Mykorritsoituminen voi vielä lisääntyä juurissa istutuksen jälkeen, kun kasvuolosuhteet muuttuvat.

LÄHTEET

Allen, M. F. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge: Cambridge of University Press. Viitattu 13.5.2013.

http://www.google.fi/books?hl=en&lr=&id=w5XK4scCQfQC&oi=fnd&pg=PR9&dq=ecology+of+mycorrhizae&ots=PCzizGbz7A&sig=DyiDwL6FmhtGAazyAmtBbIIgtjo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Barea, J. M., Azcon-Acuilar, C. & Azcon, R. 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere micro-organisms within the context of sustainable soil-plant systems. Multitrophic interactions in terrestrial systems – The 36th Symposium of the British ecological society, 67. Ed. A. C. Gange & V. K. Brown. United Kingdom: Blackwell Science Ltd. Viitattu 13.5.2013.

http://www.google.fi/books?hl=en&lr=&id=cN46shfwgGAC&oi=fnd&pg=PR10&dq=multitrophic+interactions+in+terrestrial+systems&ots=U5lv0K8nGZ&sig=THbYcTIO-WIPZbnpP4-oC_aFOqIE&redir_esc=y#v=onepage&q=multitrophic%20interactions%20in%20terrestrial%20systems&f=false

Buczacki, S. 1989. Fungi of Britain and Europe. United Kingdom: William Collins Sons & Co. Ltd.

Campbell, N. A. & Reece, J. B. 2008. Biology. 8th ed. United States, San Francisco: Pearson Education Inc.

Deacon, J. 2006. Fungal biology. 4th ed. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd.

Devlin, T. M. 2011. Textbook of biochemistry: with clinical correlations. 7th ed. United States: John Wiley & Sons Inc.

Gardes, M. & Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113 – 118.

Heino, J. & Vuento, M. 2007. Biokemian ja solubiologian perusteet. WSOY Oppimateriaalit Oy.

Helmisaari, H. 1998. Metsäekosysteemin rakenne ja toiminta. Ympäristönmuutos ja metsien kunto - Metsien terveydentilan tutkimusohjelman loppuraportti. Julkaisussa Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 691. Toim. E. Mälkönen. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos, 149 – 150.

Helmisaari H., Lehto, T. & Makkonen, K. 2003. Hienoituureet ja mykorritsat. Teoksessa Metsämaa ja sen hoito. Toim. E. Mälkönen. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos, 115 – 128.

Janhunen, S. & Helmisaari, H. 1998. Mykorritsat ja raskasmetallit. Teoksessa Ympäristömuutos ja metsien kunto - Metsien terveydentilan tutkimusohjelman loppuraportti, 206. Toim. E. Mälkönen. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 691. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos.

Levine, S. & Johnstone, L. 2008. The Ultimate Guide to Your Microscope. New York: Sterling Publishing Co. Inc. Viitattu 15.5.2013
http://books.google.fi/books?id=EpyQC_aVV1kC&printsec=frontcover&dq=microscope&hl=en&sa=X&ei=MSCTUdf1IsXrsgaP74CADQ&ved=0CEIQ6AEwAzgK#v=onepage&q=microscope&f=false

Luoranen, J. & Kiljunen, N. 2006. Kuusen paakkutaimien viljelysopas. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos.

Martikainen, P. 2003. Metsämaa mikrobisto. Teoksessa Metsämaa ja sen hoito. Toim. E. Mälkönen. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos, 101 – 114.

Metsätilastollinen vuosikirja 2012. 2012. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos, 119-150. Viitattu 13.5.2013.
http://www.metla.fi/metinfo/tilasto/julkaisut/vsk/2012/vsk12_03.pdf

Rikala, R. 1994. Miksi taimet kuolevat - tarvitaanko taimitutkimusta? Julkaisussa Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 496. Toim. H. Smolander & j. Rautala. Vantaa: Metsäntutkimuslaitos, 11-26.

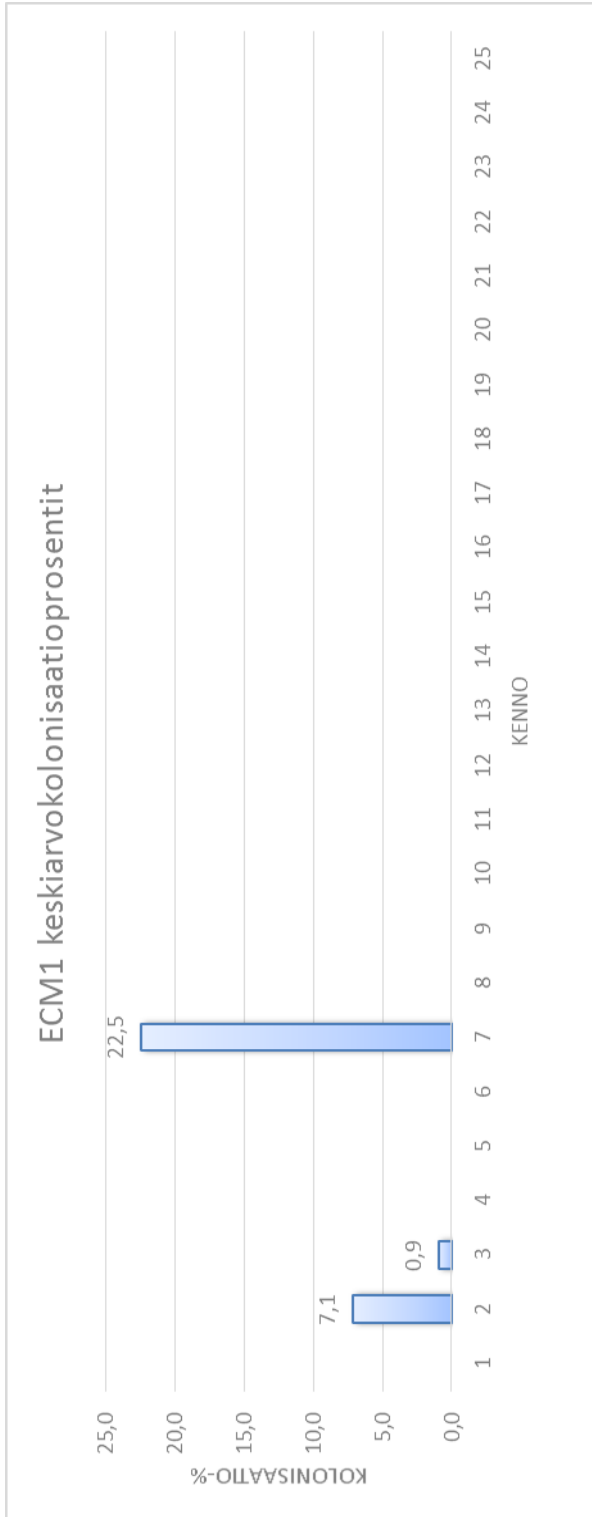
Salonen, V. 2006. Kasviekologia. Helsinki.

Smith, S. E. & Read, D. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. United Kingdom: Elsevier Ltd.

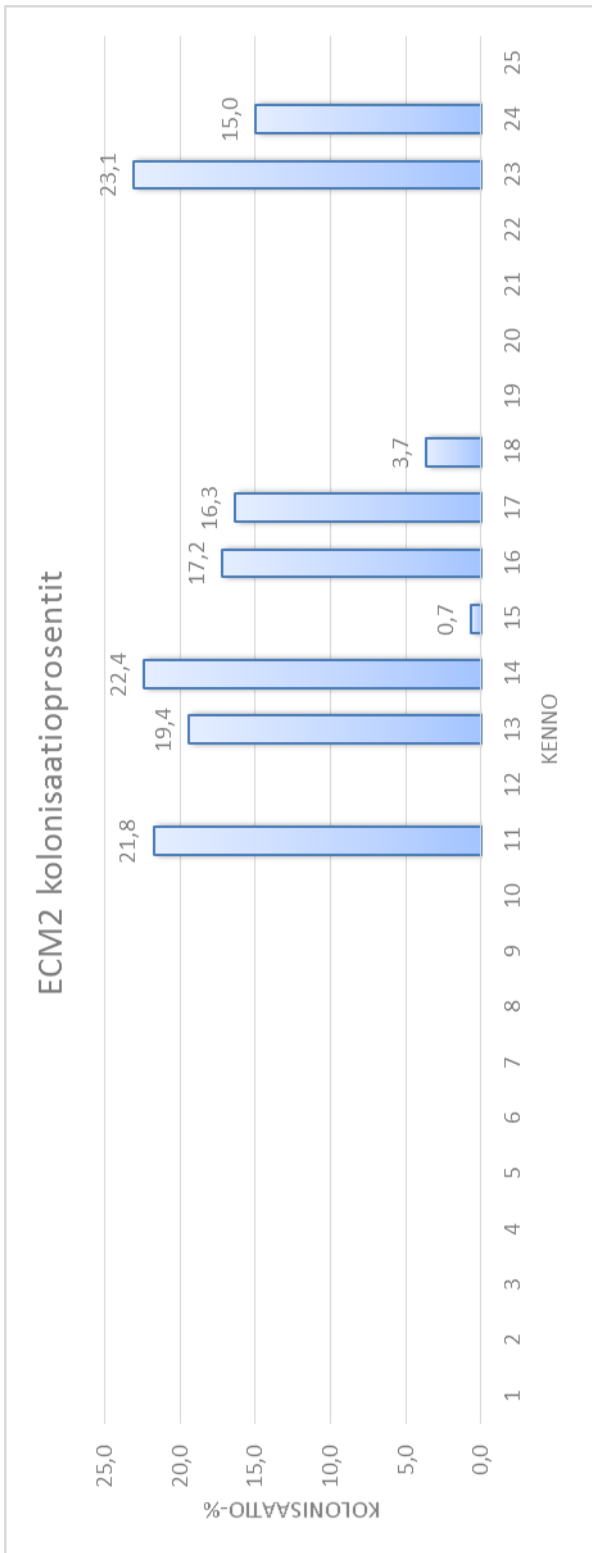
Suominen, I. & Ollikka, P. 1999. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3. p. Helsinki.

LIITTEET

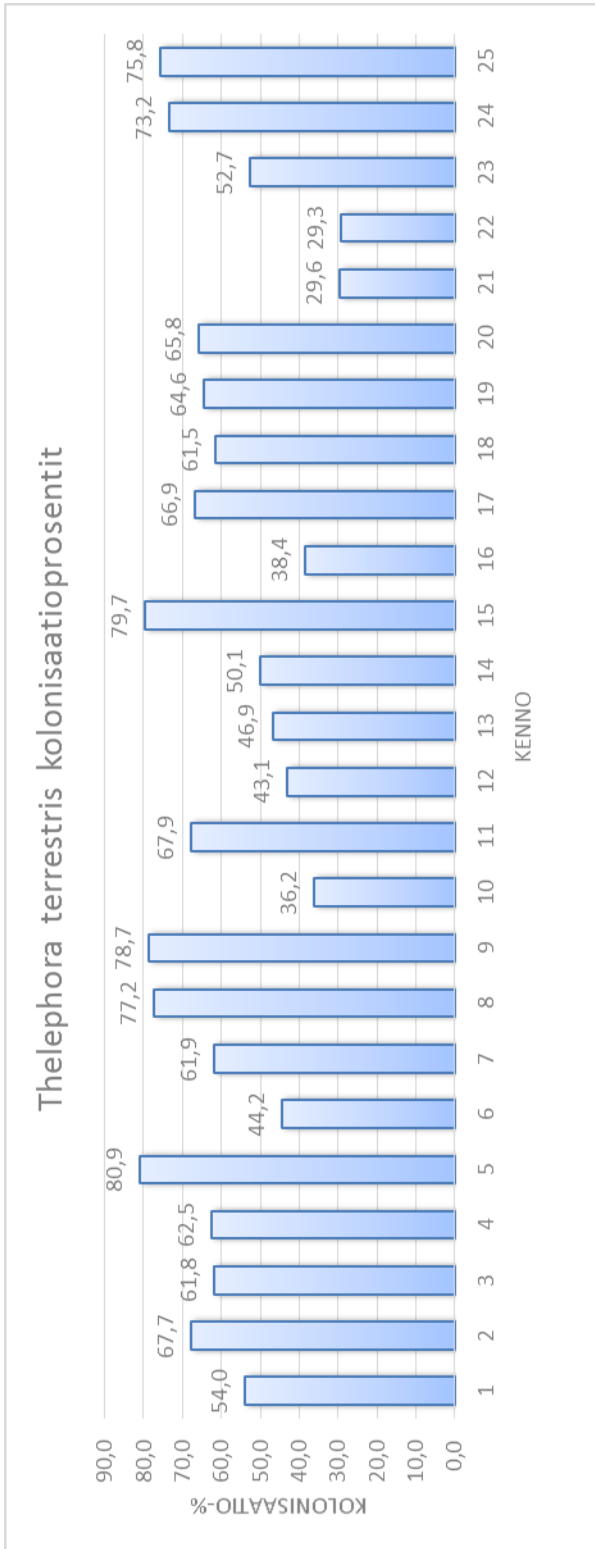
Liite 1. ECM1 kolonisaatioprosentit (kennojen käsittelyt taulukossa 1):



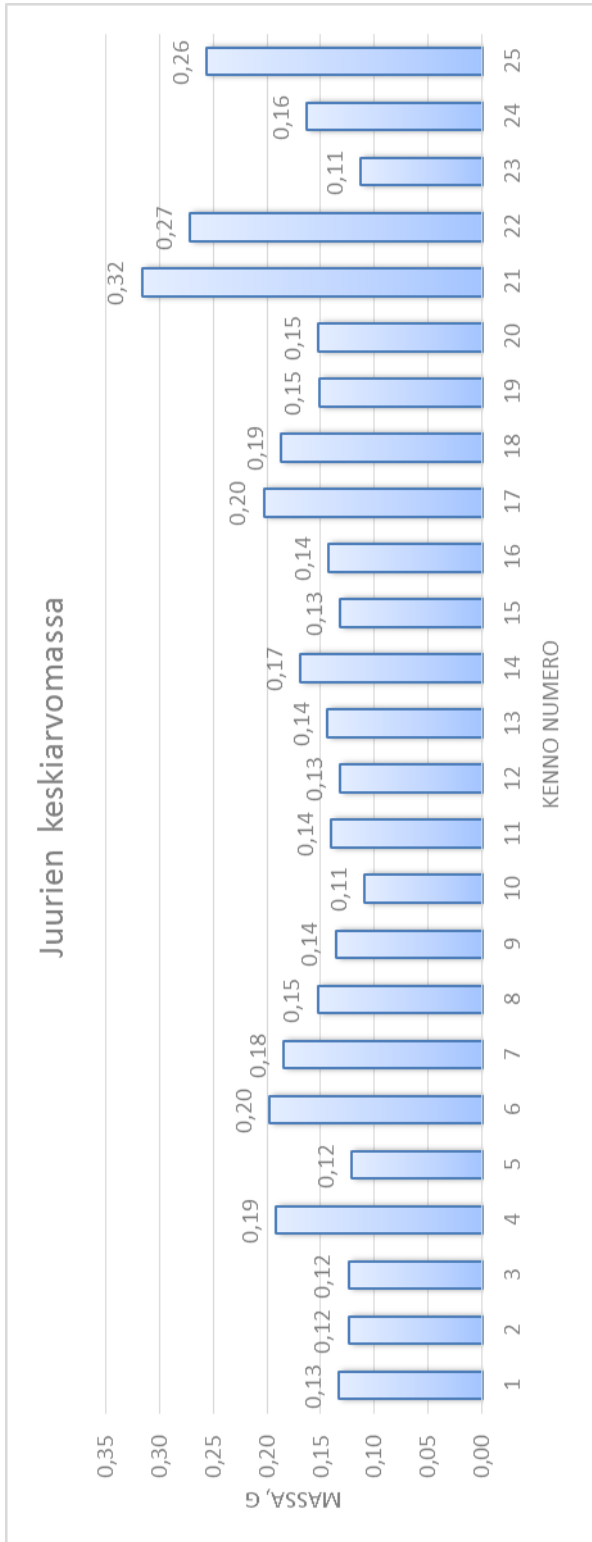
Liite 2. ECM2 kolonisaatioprosentit (kennojen käsittelyt taulukossa 1):



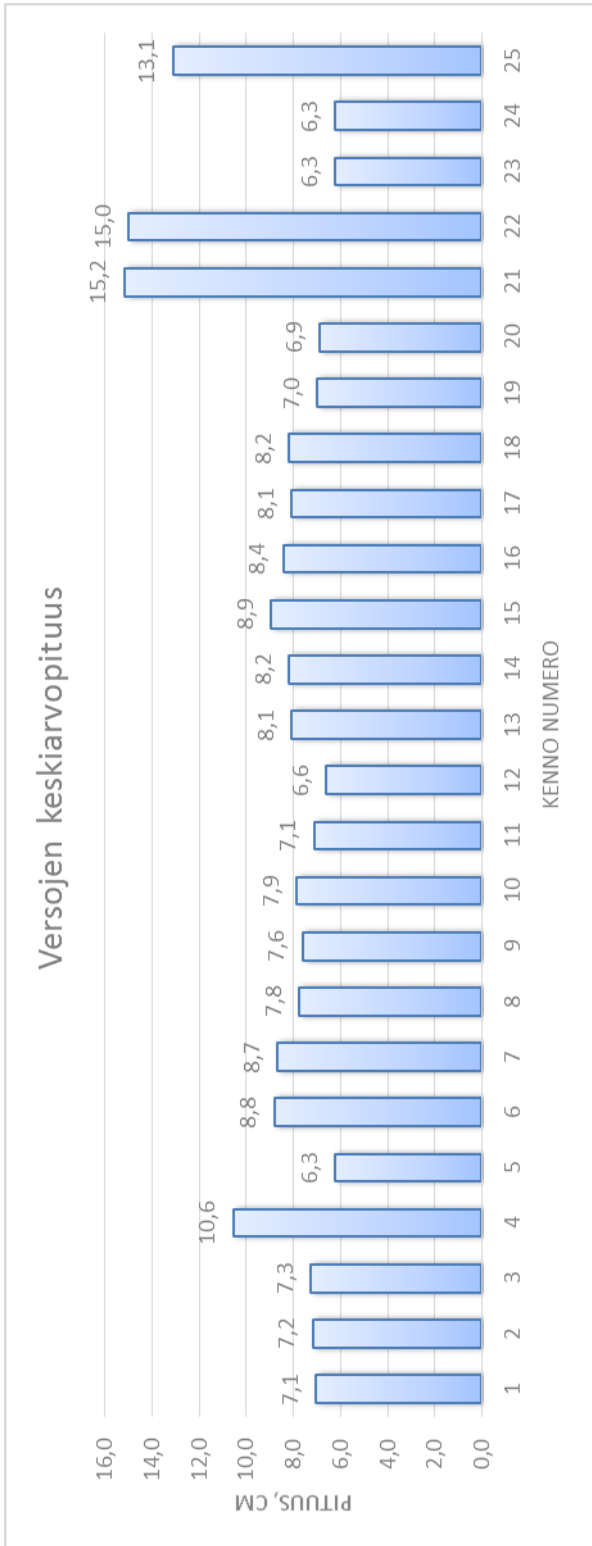
Liite 3. *Thelephora terrestris* kolonisaatioprosentit (kennojen käsittelyt taulukossa 1):



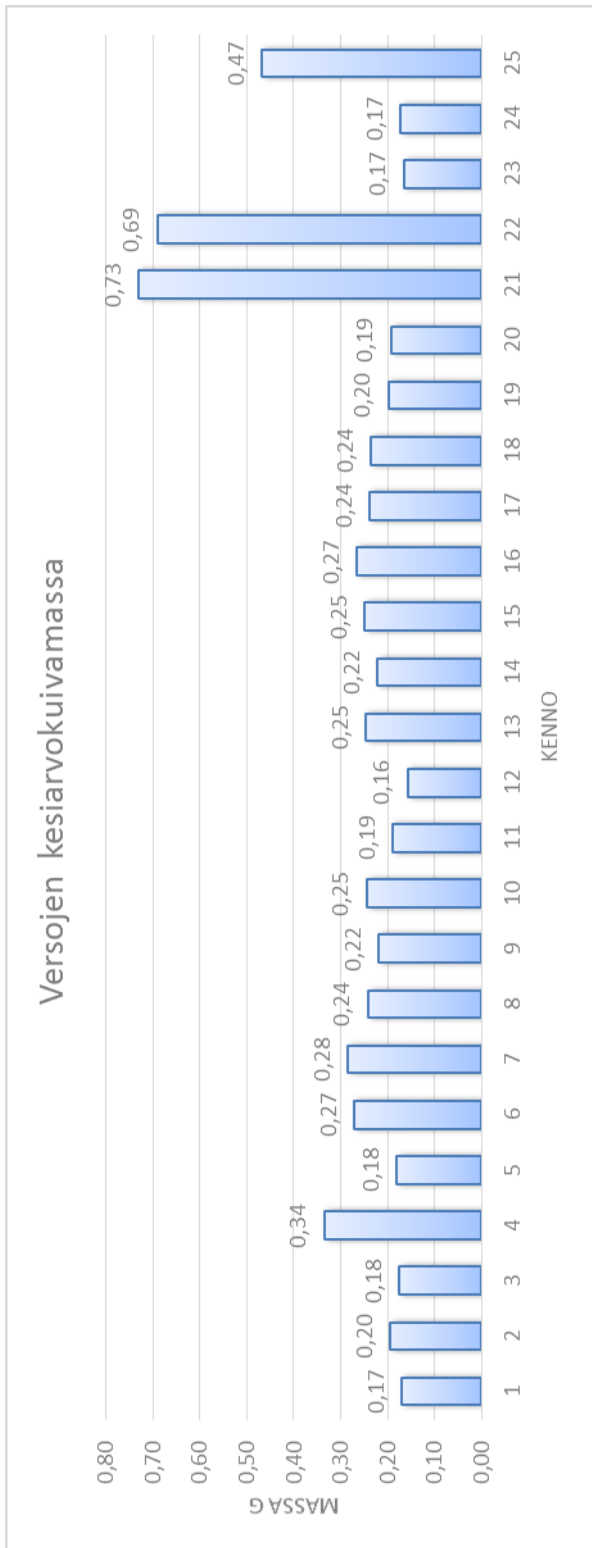
Liite 4. Juurien keskiarvomassa (kennojen käsittelyt taulukossa 1):



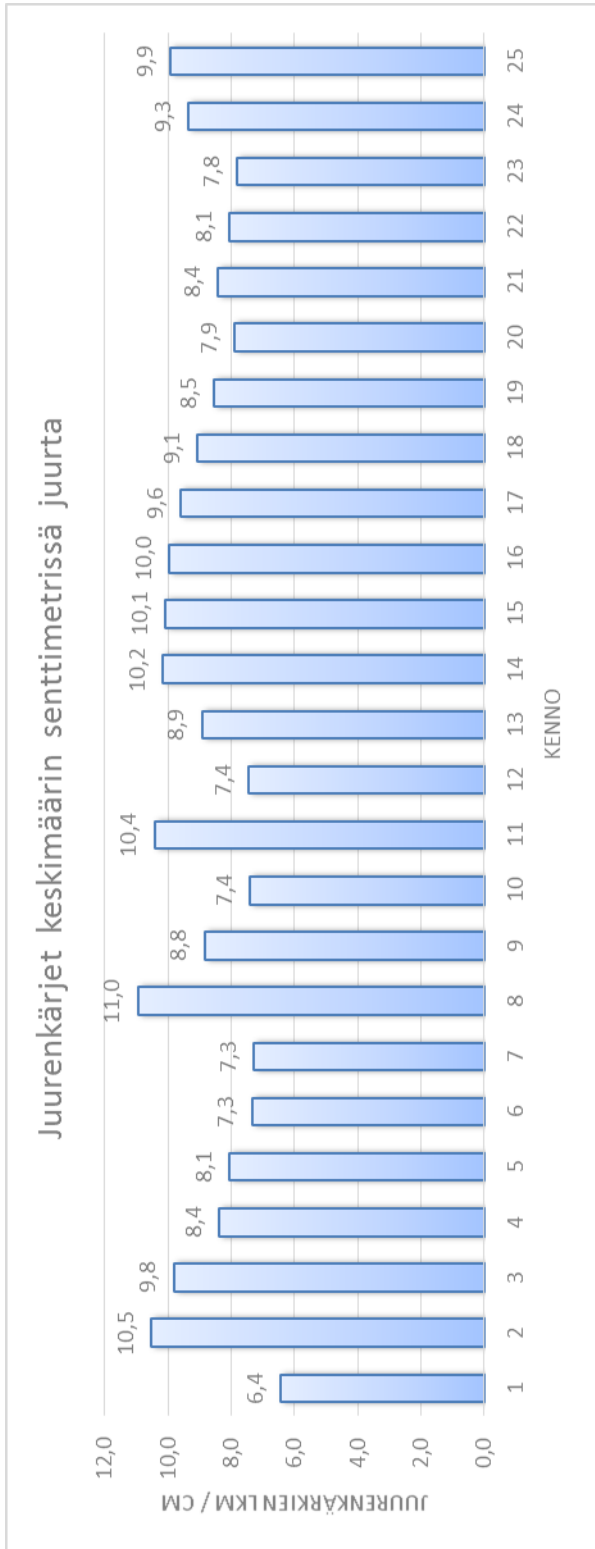
Liite 5. Verson keskiarvopituus (kennojen käsittelyt taulukossa 1):



Liite 6. Versojen keskiarvomassa (kennojen käsittelyt taulukossa 1):



Liite 7. Juurenkärjet keskimäärin senttimetrissä juurta (kennojen käsittelyt taulukossa 1):



Liite 8. Tulodata (sivu 1)

Käsittely	Taimi	Verso, l (cm)	Juurj, m (g)	Verso, m (g)	ECM1	ECM2	T. terrestris	Muu	Paljas	Kärkiä yht.	Juurta (cm)	Juuren kärkiä/cm	Kolon. ECM1	Kolon. ECM2	Kolon. T. terrestris
1	1	6,5	0,15	0,19			135		129	264	38,0	6,9	0,0	0,0	51,1
Laccaria sp.	2	5,5	0,14	0,18			190		64	254	34,5	7,4	0,0	0,0	74,8
TT2 F-NC02	3	6,0		0,15						0					
	4	5,5		0,11						0					
	5	6,5	0,12	0,14			191		63	254	44,0	5,8	0,0	0,0	75,2
	6	6,0	0,08	0,10			148		106	254	40,5	6,3	0,0	0,0	58,3
	7	9,5	0,19	0,24			43		212	255	50,5	5,0	0,0	0,0	16,9
	8	11,0	0,11	0,25			122		133	255	35,5	7,2	0,0	0,0	47,8
2	1	8,0	0,12	0,23			182	46	29	257	14,0	18,4	0,0	0,0	70,8
Tylospora asterophora	2	7,0	0,11	0,18	18		157		80	255	41,5	6,1	7,1	0,0	61,6
HK1 R-SP01	3	7,0	0,15	0,17			177		77	254	31,0	8,2	0,0	0,0	69,7
	4	5,5	0,12	0,12			235		25	260	27,5	9,5	0,0	0,0	90,4
	5	6,0		0,15						0					
	6	8,0		0,20						0					
	7	6,0		0,17						0					
	8	10,0		0,35						0					
3	1	9,0	0,18	0,26	18		82		151	251	44,5	5,6	7,2	0,0	32,7
Cenococcum geophilum	2	8,0	0,13	0,18			230		22	252	14,0	18,0	0,0	0,0	91,3
AV1 (ei symbioosia 2009) R-FC03	3	8,0	0,14	0,21			170		81	251	26,0	9,7	0,0	0,0	67,7
	4	6,5	0,01	0,07			42		59	101	8,0	12,6	0,0	0,0	41,6
	5	7,0	0,12	0,16			198		54	252	32,5	7,8	0,0	0,0	78,6
	6	5,5	0,12	0,12			198		58	256	31,5	8,1	0,0	0,0	77,3
	7	9,0	0,09	0,30			87		164	251	41,5	6,0	0,0	0,0	34,7
	8	5,0	0,21	0,11			178		73	251	23,5	10,7	0,0	0,0	70,9
4	1	12,0	0,19	0,52			58		48	106	15,0	7,1	0,0	0,0	54,7
Piloderma byssinum	2	13,5	0,22	0,44			53		49	102	9,5	10,7	0,0	0,0	52,0
AL R-SP03	3	10,5		0,31			229		28	257	49,5	5,2	0,0	0,0	89,1
	4	8,5	0,17	0,26			224		34	258	28,0	9,2	0,0	0,0	86,8
	5	14,0		0,49						0					
	6	8,0		0,21						0					
	7	8,5		0,21			22		231	253	43,0	5,9	0,0	0,0	8,7
	8	9,5		0,25			212		42	254	21,0	12,1	0,0	0,0	83,5
5	1	6,0	0,13	0,18			216		44	260	28,0	9,3	0,0	0,0	83,1
Amphineva sp.	2	7,5	0,13	0,27			207		44	251	29,0	8,7	0,0	0,0	82,5
HK1 R-SP03	3	5,0	0,07	0,12			211		44	255	40,0	6,4	0,0	0,0	82,7
	4	7,0	0,16	0,19			191		62	253	32,0	7,9	0,0	0,0	75,5
	5	5,0		0,15						0					
	6	6,5		0,17						0					
	7	6,0		0,18						0					
	8	7,0		0,19						0					
6	1	8,0	0,20	0,23			93	11	148	252	37,5	6,7	0,0	0,0	36,9
Hebeloma sp.	2	10,5	0,17	0,35				1	115	116	15,0	7,7	0,0	0,0	0,0
TT F-NB01	3	4,5		0,10						0					
	4	7,5		0,24						0					
	5	8,5		0,29						0					
	6	7,5		0,21						0					
	7	12,0	0,20	0,38			127		127	254	39,0	6,5	0,0	0,0	50,0
	8	12,0	0,22	0,38			227		25	252	30,0	8,4	0,0	0,0	90,1
7	1	9,5	0,15	0,35	9		236		14	259	36,0	7,2	3,5	0,0	91,1
Cadophora finlandia	2	7,5	0,20	0,22	51		160		45	256	45,5	5,6	19,9	0,0	62,5
MT R-MF01	3	9,0	0,16	0,31	97		153		4	254	28,0	9,1	38,2	0,0	60,2
	4	7,5	0,16	0,22	57		172		22	251	63,0	4,0	22,7	0,0	68,5
	5	9,0	0,21	0,27	26		203		25	254	26,0	9,8	10,2	0,0	79,9
	6	8,5	0,23	0,27	53		154		43	250	32,0	7,8	21,2	0,0	61,6
	7	9,5	0,18	0,38	103		12		135	250	33,0	7,6	41,2	0,0	4,8
	8	9,0	0,19	0,26	58		169		26	253	35,0	7,2	22,9	0,0	66,8

Liite 9. Tulodata (sivu 2)

Käsittely	Taimi	Verso, l (cm)	Juuri, m (g)	Verso, m (g)	ECM1	ECM2	T. terrestris	Muu	Paljas	Kärkiä yht.	Juurta (cm)	Juuren kärkiä/cm	Kolon. ECM1	Kolon. ECM2	Kolon. T. terrestris
8	1	8,0	0,15	0,25			214		41	255	22,0	11,6	0,0	0,0	83,9
Paxillus involutus	2	13,0	0,26	0,54			112		154	266	16,0	16,6	0,0	0,0	42,1
1-2007 F-CY01	3	5,5		0,18						0					
	4	10,0		0,32						0					
	5	7,0	0,11	0,17			240		12	252	31,0	8,1	0,0	0,0	95,2
	6	5,0	0,09	0,14			219	13	18	250	33,5	7,5	0,0	0,0	87,6
	7	8,5		0,22						0					
	8	5,0		0,14						0					
9	1	5,5	0,09	0,17			140		117	257	34,5	7,4	0,0	0,0	54,5
Laccaria-Piloderma	2	6,0	0,12	0,18			192		62	254	36,5	7,0	0,0	0,0	75,6
	3	13,5	0,23	0,42			226	7	19	252	27,0	9,3	0,0	0,0	89,7
	4	6,0	0,10	0,15			238		12	250	21,5	11,6	0,0	0,0	95,2
	5	6,5		0,18						0					
	6	8,0		0,19						0					
	7	7,0		0,24						0					
	8	8,5		0,21						0					
10	1	6,0	0,11	0,14			57		196	253	52,0	4,9	0,0	0,0	22,5
Laccaria-Cenococcum	2	5,0	0,10	0,10		1	115		135	251	35,5	7,1	0,0	0,4	45,8
	3	8,5	0,12	0,24			67		185	252	27,0	9,3	0,0	0,0	26,6
	4	6,0	0,10	0,18			125		125	250	30,0	8,3	0,0	0,0	50,0
	5	7,0		0,14						0					
	6	12,5		0,56						0					
	7	9,0		0,29						0					
	8	9,0		0,30						0					
11	1	6,0		0,18						0					
Laccaria-Cadophora	2	7,0		0,17						0					
	3	7,5		0,17						0					
	4	6,0		0,15						0					
	5	9,0	0,17	0,24		40	188		28	256	30,0	8,5	0,0	15,6	73,4
	6	7,0	0,11	0,21		13	220		24	257	24,0	10,7	0,0	5,1	85,6
	7	6,0	0,14	0,15		83	144	18	10	255	37,0	6,9	0,0	32,5	56,5
	8	8,5	0,14	0,24		87	144		26	257	16,5	15,6	0,0	33,9	56,0
12	1	6,0		0,19						0					
Tylospora-Paxillus	2	7,5		0,12						0					
	3	7,0	0,21	0,16			127		127	254	39,0	6,5	0,0	0,0	50,0
	4	5,5	0,08	0,10			150		115	265	34,5	7,7	0,0	0,0	56,6
	5	9,5	0,16	0,32			64		188	252	32,0	7,9	0,0	0,0	25,4
	6	5,5	0,08	0,16			104		154	258	33,5	7,7	0,0	0,0	40,3
	7	7,0		0,12						0					
	8	5,0		0,10						0					
13	1	10,0		0,36						0					
Paxillus-Cadophora	2	9,5		0,40						0					
	3	7,5		0,18						0					
	4	5,5		0,14						0					
	5	11,0	0,11	0,27					24	24	28,0	0,9	0,0		
	6	7,5	0,17	0,24		82	131		54	267	28,0	9,5	0,0	30,7	49,1
	7	8,0	0,18	0,23		11	70		172	253	29,5	8,6	0,0	4,3	27,7
	8	5,5	0,12	0,15		77	84		95	256	30,0	8,5	0,0	30,1	32,8
14	1	6,5	0,20	0,17		31	125		99	255	25,5	10,0	0,0	12,2	49,0
Piloderma-Cadophora	2	7,5	0,15	0,20		75	119		65	259	25,0	10,4	0,0	29,0	45,9
	3	8,0		0,24						0					
	4	8,0		0,24						0					
	5	8,0	0,18	0,19		88	159		25	272	21,5	12,7	0,0	32,4	58,5
	6	9,0	0,20	0,25		67	146		41	254	20,0	12,7	0,0	26,4	57,5
	7	10,5	0,20	0,34		57	135		63	255	31,0	8,2	0,0	22,4	52,9
	8	8,0	0,09	0,16		31	94		131	256	36,0	7,1	0,0	12,1	36,7

Liite 10. Tulosdata (sivu 3)

Käsittely	Taimi	Verso, l (cm)	Juuri, m (g)	Verso, m (g)	ECM1	ECM2	T. terrestris	Muu	Paijas	Kärkiä yht.	Juurta (cm)	Juuren kärkiä/cm	Kolon. ECM1	Kolon. ECM2	Kolon. T. terrestris
15	1	11,0	0,16	0,34			151		102	253	29,5	8,6	0,0	0,0	59,7
Piloderma-Cenococcum	2	10,5	0,12	0,30			180		70	250	22,5	11,1	0,0	0,0	72,0
	3	10,0		0,27						0					
	4	7,0		0,20						0					
	5	8,0	0,11	0,17			249		6	255	32,5	7,8	0,0	0,0	97,6
	6	10,0	0,14	0,25		7	234		21	262	20,5	12,8	0,0	2,7	89,3
	7	6,5		0,21						0					
	8	8,5		0,25						0					
16	1	8,0		0,26						0					
Hebeloma-Cadaphora	2	8,0		0,24						0					
	3	13,5		0,48						0					
	4	6,5		0,22						0					
	5	7,5	0,14	0,20		72	123		78	273	24,0	11,4	0,0	26,4	45,1
	6	6,5	0,09	0,14		62	118		71	251	21,0	12,0	0,0	24,7	47,0
	7	10,5	0,20	0,35		9	104		140	253	25,5	9,9	0,0	3,6	41,1
	8	7,0	0,15	0,23		36	52		168	256	39,0	6,6	0,0	14,1	20,3
17	1	6,0		0,18						0					
Tylospora-Cadaphora	2	6,0		0,16						0					
	3	7,5	0,19	0,24		41	216		6	263	19,5	13,5	0,0	15,6	82,1
	4	10,5	0,37	0,41		35	193		27	255	31,0	8,2	0,0	13,7	75,7
	5	8,5		0,15						0					
	6	8,0		0,19						0					
	7	6,0	0,12	0,19		19	197		35	251	28,0	9,0	0,0	7,6	78,5
	8	12,0	0,13	0,38		78	86		111	275	35,5	7,7	0,0	28,4	31,3
18	1	8,5		0,29						0					
Paxillus-Cenococcum	2	9,0		0,30						0					
	3	9,0	0,32	0,24		37	101		115	253	30,0	8,4	0,0	14,6	39,9
	4	7,0	0,11	0,19			141		127	268	37,0	7,2	0,0	0,0	52,6
	5	10,0		0,29						0					
	6	7,5		0,16						0					
	7	7,5	0,14	0,21			247		10	257	21,5	12,0	0,0	0,0	96,1
	8	7,0	0,18	0,21			150		111	261	30,0	8,7	0,0	0,0	57,5
19	1	7,0		0,18						0					
Kontrolli PP03	2	9,5		0,35						0					
(5ml tuotteen kasvatusalustaa + 5ml vettä)	3	7,5		0,23						0					
	4	5,5		0,17						0					
	5	7,5	0,19	0,16			143	4	107	254	22,0	11,5	0,0	0,0	56,3
	6	7,0	0,15	0,16			224	3	27	254	26,0	9,8	0,0	0,0	88,2
	7	5,5	0,16	0,15			225		38	263	46,0	5,7	0,0	0,0	85,6
	8	6,5	0,11	0,19			72		183	255	36,0	7,1	0,0	0,0	28,2
20	1	6,0		0,17						0					
Kontrolli PP03	2	9,0		0,26						0					
(5ml tuotteen kasvatusalustaa + 5ml vettä)	3	8,0	0,18	0,22			69		188	257	32,0	8,0	0,0	0,0	26,8
	4	7,0	0,17	0,29			224		30	254	31,0	8,2	0,0	0,0	88,2
	5	7,5	0,18	0,19			222		32	254	33,0	7,7	0,0	0,0	87,4
	6	4,0	0,08	0,08			153		99	252	33,0	7,6	0,0	0,0	60,7
	7	8,0		0,24						0					
	8	5,5		0,12						0					
21	1	17,0	0,31	0,71			39		215	254	35,0	7,3	0,0	0,0	15,4
Taimitarhakontrolli F6	2	16,5	0,31	0,82			67		202	269	26,0	10,3	0,0	0,0	24,9
	3	15,0		0,72						0					
	4	13,0		0,70						0					
	5	14,5	0,25	0,62			60		193	253	28,5	8,9	0,0	0,0	23,7
	6	19,5	0,40	0,90			139		117	256	35,5	7,2	0,0	0,0	54,3
	7	12,0		0,75						0					
	8	14,0		0,64						0					

Liite 11. Tulodata (sivu 4)

Käsittely	Taimi	Verso, l (cm)	Juuri, m (g)	Verso, m (g)	ECM1	ECM2	T. terrestris	Muu	Paljas	Kärkiä yht.	Juurta (cm)	Juuren kärkiä/cm	Kolon. ECM1	Kolon. ECM2	Kolon. T. terrestris
22	1	13,5		0,61						0					
Taimitarhakontrolli F6	2	10,0		0,43						0					
	3	18,0		0,89						0					
	4	13,5		0,54						0					
	5	19,0	0,33	0,99			67	8	180	255	31,0	8,2	0,0	0,0	26,3
	6	16,0	0,30	0,82			127		140	267	29,0	9,2	0,0	0,0	47,6
	7	17,0	0,27	0,83			18		232	250	31,5	7,9	0,0	0,0	7,2
	8	13,0	0,19	0,42			91		161	252	36,5	6,9	0,0	0,0	36,1
23	1	7,0	0,16	0,18		71	71		109	251	36,0	7,0	0,0	28,3	28,3
Paxillus-Cadophora	2	5,5	0,08	0,15		72	113		67	252	29,5	8,5	0,0	28,6	44,8
	3	6,0		0,17						0					
	4	6,5		0,19						0					
	5	7,5	0,12	0,17		68	132		53	253	32,0	7,9	0,0	26,9	52,2
	6	5,0	0,09	0,09		22	221		16	259	33,0	7,8	0,0	8,5	85,3
	7	5,5		0,20						0					
	8	7,0		0,18						0					
24	1	7,0	0,17	0,20		85	117		60	262	32,0	8,2	0,0	32,4	44,7
Paxillus-Cadophora	2	6,0	0,24	0,22		20	212		26	258	30,0	8,6	0,0	7,8	82,2
/	3	6,0	0,12	0,13		36	200		29	265	27,0	9,8	0,0	13,6	75,5
Tricholoma matsutake	4	6,0	0,12	0,15		16	234		8	258	24,0	10,8	0,0	6,2	90,7
	5	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.						0					
	6	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.						0					
	7	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.						0					
	8	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.	matsutake ei anal.						0					
25	1	13,5	0,33	0,51			160		94	254	26,5	9,6	0,0	0,0	63,0
PP03 kontrolli	2	12,0	0,22	0,47			201	9	44	254	38,5	6,6	0,0	0,0	79,1
(5ml tuotteen kasvatusalustaa + 5ml vettä)	3	14,0		0,60						0					
	4	10,5		0,33						0					
	5	14,5	0,29	0,51			227	5	28	260	17,5	14,9	0,0	0,0	87,3
	6	12,5	0,20	0,39			191	1	67	259	30,0	8,6	0,0	0,0	73,7
	7	13,0		0,41						0					
	8	15,0		0,52						0					