

Tiedekunta/Osasto) Fakultet/Sektion) Faculty Matematiske-naturvetenskapliga/ allmän mikrobiologi		Laitos) Institution) Department Biovetenskapliga institutionen
Tekijä) Författare) Author Bomberg, Malin Joanna Maria		
Työn nimi) Arbetets titel) Title Detection of Archaea in Scots pine mycorrhizosphere developed on boreal forest humus		
Oppiaine) Läroämne) Subject Ekologisk mikrobiologi		
Työn laji) Arbetets art) Level Laboratorie	Aika) Datum) Month and year 09.2000	Sivumäärä) Sidoantal) Number of pages 42
Tiivistelmä) Referat) Abstract <p>Livsformerna på jorden delas klassiskt in i prokaryota och eukaryota organismer. Till de prokaryota organismerna hör de flesta encelliga mikroorganismerna, nämligen de tillhörande Bacteria och Archaea. Målen för den här undersökningen var för det första, att utveckla en snabb och enkel metod för att utvinna DNA härstammande från Archaea från humus och mykorrhizofär prover från tvådimensionella tillväxt kamrar innehållande humus från en torr moskog och ett exemplar av tall, Pinus sylvestris. Tall plantans rötter var koloniserade av en av två svamp arter, plugg skivling, Paxillus involutus, eller kosopp, Suillus bovinus. Det andra målet var att amplifiera det utvinna DNA med primers specifika för Archaea 16S rRNA gener genom användning av en "nested-PCR" metod. Det tredje målet var artbestämning genom att sekvensera det amplifierade Archaea 16S rDNA och ställa upp sekvenserna mot kända Archaea 16S rDNA sekvenser i en data bas.</p> <p>Tallplantor uppodlades aseptiskt i 100 ml provrör med MMN-agar medium och lergrus. Tallrötterna inokulerades med aseptiskt odlat svamp mycel och de fick bilda mykorrhizor med tallrötterna och flyttades sedan att fortsätta att växa på osteriliserad humus från torr moskog i de tvådimensionella tillväxt kamrarna under konstanta ljus och värme förhållanden. Efter en tillväxt period på tre till fyra månader avlägsnades provbitar av tallarnas kortrötter, mycorrhiza, svamp hyfer och humus, både från områden koloniserade av svamphyfer och okoloniserade områden. Tre olika metoder för utvinning av DNA jämfördes med varandra. I den första metoden utvanns DNA från humus med kloroform var efter det fälldes ut med 2-propanol och etanol. Slutgiltig rengöring av DNA gjordes med en kommersiell DNA rengörings förpackning (Qiagen). Den andra metoden utgjordes helt och hållet av att använda ett DNA utvinnings kit (UltraClean Soil DNA Isolation Kit, Mobio), och i den tredje metoden separerades mikrob cellerna från humus och svamp material innan DNA utvanns genom att använda ett DNA isolerings kit. DNA amplifierades med en "nested-PCR" metod och de resulterande DNA fragmenten identifierades som Archaea genom att tillämpa Southern blot tekniken för att flytta DNA från en agaros gel efter agaros gel elektrofores, och hybridisera DNA med en DIG-probe som framställts av 16S rDNA av Halobacterium salinarum. De PCR produkter som gav positivt hybridiserings resultat klonades in i en plasmid vektor. De olika klonerna skiljdes från varandra genom restriktions analys, RFLP, av de klonade Archaea 16S rDNA, och en representant av varje grupp av mönster sekvenserades.</p> <p>Av de undersökta DNA utvinnings metoderna visade det sig att UltraClean Soil DNA Isolation Kit var det effektivaste och det resulterade i rent och användbart DNA. De använda DNA primers för Archaea visade sig också binda till sekvenser som inte hybridiserade till Halobacterium salinarum proben, även då de gav upphov till PCR produkt. Vid restriktions analysen upptäcktes fyra olika restriktions mönster bland de kloner som uppvisat positiv hybridisering till Halobacterium salinarum proben. En representant av varje sekvenserades. Dessa fanns att tillhöra tidigare upptäckta arter av Archaea från finsk skogs humus, FFS (Finnish Forest Soil)-arter, nämligen FFSC3, FFSB1 och FFSB10. Det fjärde mönstret visade sig i sekvenseringen visa upp relativt stor likhet med Halobacterium salinarum.</p>		
Avainsanat) Nyckelord) Keywords Tall, Archaea, mycorrhiza, mykorrhizofär, FFS, 16S rDNA, nested-PCR		
Säilytyspaikka) Förvaringsställe) Where deposited Allmän mikrobiologi, hand biblioteket		
Muita tietoja) Övriga uppgifter) Additional information		