

KOIVUN MIKROLISÄÄMINEN JA MYKORITSAINOKULAATIO
IN VITRO -KASVATUKSESSA

Laura Parkkinen

Pro gradu

Biotieteiden laitos

Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Itä-Suomen yliopisto

Tammikuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Biotieteiden laitos

PARKKINEN, LAURA: Koivun mikrolisääminen ja mykoritsainokulaatio *in vitro*

-kasvatuksessa

Pro gradu, 42 sivua

Opinnäytetyön ohjaajat: dosentti, FT Arja Tervahauta, FT Anne Kasurinen

Tammikuu 2012

Avainsanat: mikrolisäys, rauduskoivu, ektomykoritsa, inokulaatio, kasvuvasteet

Tiivistelmä

Koivut lisääntyvät luonnossa yleensä siementen avulla. Ongelmana siementen avulla lisääntymisessä ovat kuitenkin alhainen itämisaste ja geneettisesti erilaiset jälkeläiset. Mikrolisäyksellä voidaan tuottaa paljon terveitä, geneettisesti samanlaisia kasveja *in vitro*. Luontaisesti koivu maaekosysteemissä muodostaa symbioosin mykoritsasienen kanssa, mikä lisätessään juurisysteemin pinta-alaa parantaa ravinteiden saantia ja vaikuttaa puun kasvuun. Mikrolisätyiltä koivun taimilta mykoritsasieni yleensä puuttuu.

Tutkimuksessa mikrolisättiin kahta eri koivukloonaa (W008 ja Sand 1/48) WPM-alustalla ja siirrettiin niiden juuristoon kaksi eri mykoritsakantaa, pulkkosieni (*Paxillus involutus*) ja punakärpässieni (*Amanita muscaria*). Tarkoituksena oli tutkia, kuinka koivujen genotyypit ja sienikäsittelyt (kontrolli, AM ja PI) vaikuttavat versojen ja juurten kasvuun *in vitro* olosuhteissa. Mitattavina ominaisuuksina olivat lehtien lukumäärä, verson pituus, kuivapaino, juurien lukumäärä, juurien pituus, lyhytjuurien lukumäärä ja mykoritsan infektoitumisaste. Testauksessa käytettiin kaksisuuntaista monimuuttujavarianssianalyysiä (multivariate anova). Koivun genotyyppien (W008 ja Sand 1/48) ja sienikäsittelyiden (kontrolli, AM ja PI) välillä ei saatu esille tilastollisesti merkitsevää yhteisvaikutusta koivunversojen ja juurten kasvuun. Sitä vastoin koivun genotyypeillä (W008 ja Sand 1/48) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus lehtien lukumäärään ja sienikäsittelyillä (kontrolli, AM ja PI) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus juurien lukumäärään.

Lisäksi testattiin PCR-menetelmää, jonka avulla on mahdollista varmistaa mykoritsan läsnäolo mikrolisätyissä taimissa ja tunnistaa eri mykoritsalajit DNA-sekvenssin perusteella kasvinäytteestä. Mikrolisätyistä koivuklooneista ja mykoritsojen puhtasviljelmistä eristettiin DNA:t ja mykoritsojen ITS-sekvenssiä monistettiin käyttäen yleisiä sienialukkeita. Mykoritsanäytteiden PCR-tuotteet puhdistettiin, kloonattiin plasmidivektoriin ja sekvensoitiin. Saatuja ITS-sekvenssejä verrattiin NCBI:n Blast-ohjelmalla tietokannassa oleviin sekvensseihin. *Amanita muscarian* ITS-sekvenssi vastasi tietokannan *Amanita muscarian* sekvenssiä, mutta *Paxillus involutus* ITS-sekvenssi vastasi kloonausvektorin sekvenssiä kertoen kloonauksen

epäonnistumisesta. Kloonauksen ja sekvensoinnin onnistuessa menetelmällä voidaan tunnistaa mykoritsalaji.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Science and Forestry

Department of Biosciences

PARKKINEN, LAURA: Micropropagation of birch and inoculation of mycorrhiza *in vitro*

MSc thesis, 42 pages

MSc thesis supervisors: Arja Tervahauta, Anne Kasurinen

January 2012

Keywords: micropropagation, silver birch, ectomycorrhiza, inoculation, growth responses

Abstract

In nature birches are multiplied from seeds. Unfortunately, the seeds are germinating poorly and genetically the seedlings are variable. By using micropropagation healthy and genetically identical plants can be produced *in vitro*. In soil ecosystems birch forms symbiosis with mycorrhizas, which by increasing the root area improves the uptake of nutrients thus affecting on the tree growth. The micropropagated birches do not usually contain mycorrhizas.

The aims of the research were to micropropagate two different birch clones (W008 and Sand 1/48) and inoculate them with two different mycorrhiza strain, brown roll-rim (*Paxillus involutus*) and fly agaric (*Amanita muscaria*). The aim was to study how birch genotypes and fungal treatments (control, AM and PI) effect the growth of the shoots and roots. The number of leaves, the height of shoot, dry weight, the number of roots, the length of roots, the number of short roots and infection level were measured. Two-way multivariate analysis of variance was used for testing. There were no statistical significance between birch genotypes and fungal treatments in the growth of shoots and roots. Birch genotypes (W008 and Sand 1/48) had statistical significance for the number of leaves and fungal treatments (control, AM and PI) had statistical significance for the number of roots.

A PCR-method, which makes possible to recognize and identify mycorrhizas from plant material, was also tested. DNAs were isolated from clean birch clones and mycorrhiza pure cultures and the ITS region of fungi was amplified with general fungal primers. PCR-products of mycorrhiza samples were purified and cloned. One plasmid-DNA sample from each mycorrhiza strain was sent to sequencing. ITS-sequences were compared to sequences of the database by Blast-program of NCBI. The ITS-sequence of *Amanita muscaria* was identical to the sequence of *Amanita muscaria* in the database. ITS-sequence of *Paxillus involutus* was identical to the sequence of the cloning vector. With successful cloning and sequencing process the fungal strain can be identified in pure cultures and in plant tissue.

LYHENNELUETTELO

2,4-D	2,4-diklorfenoksietikkahappo
ABA	abskissihappo
BA	6-bentsylaminopuriini
BAP	6-bentsylaminopuriini
IAA	indolietikkahappo
IBA	indolivoihappo
IPA	2-isopentenyladenopuriini
LB	lysogeny broth
MS	Murashige & Skoog
NAA	α -naftaleenietikkahappo
PPM	Plant Preservative Mixture
TAE	Tris-asettaatti-EDTA
WPM	Woody Plant Medium

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	9
2.1 Koivujen levinneisyys ja merkitys	9
2.2 Mikrolisäys	10
2.2.1 Mitä mikrolisäys on?.....	10
2.2.3 Mikrolisäysmateriaali ja pintasterilointi	13
2.2.4 Kasvatusalustat	14
2.2.5 Juurtuminen.....	18
2.3 Mykoritsasymbioosi	18
2.3.1 Mikä on ektomykoritsa?.....	18
2.3.2 Ektomykoritsasymbioosin spesifisyys ja inokulaatioprosessi.....	21
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	25
3.1 Tutkimuksen tavoitteet	25
3.2 Koivun mikrolisäys ja mykoritsojen ymppeäys	25
3.3 DNA:n eristys, puhdistus ja kloonauus	26
3.4 Transformaatio ja miniprepiit	29
3.5 Aineiston tilastollinen testaus	30
4 TULOKSET	31
4.1 Sienikantojen puhtaus ja infektioste koivuissa	31
4.2 Koivun genotyyppien ja sienikäsittelyjen vaikutukset koivujen kasvuun	33
5 TULOSTEN POHDINTA	37
Lähteet	39

1 JOHDANTO

Koivut lisääntyvät luonnossa yleensä siementen avulla (Welander 1993). Ongelmana siementen avulla lisääntymisessä ovat kuitenkin alhainen itämisaste ja geneettisesti erilaiset jälkeläiset. Koivut ovat tuulipölytteisiä ja siemenet kehittyvät usein ristipölytyksen seurauksena (Hynynen ym. 2010). Koivut kukkivat keväällä yhtä aikaa lehtien muodostumisen kanssa ja siemenet kypsyvät Pohjois-Euroopassa heinä-elokuussa. Koivut voivat myös lisääntyä versomalla, jos pääverso on heikentynyt tai poistettu. Mikrolisäys on mielenkiintoinen vaihtoehto tuottaa koivuja.

Mikrolisäys on tehokas tapa tuottaa paljon terveitä, geneettisesti samanlaisia kasveja *in vitro* (Honda & Kobayashi 2004). Mikrolisäyksen avulla voidaan tuottaa uusia kasveja joko suoraan versojen organogeneesin tai somaattisen embryogeneesin avulla. Mikrolisäyksen onnistumisen kannalta on hyvä valita mahdollisimman hyväkuntoinen ja terve emokasvi, jolloin kasviyksilöillä on paremmat mahdollisuudet selvittää mikrolisäyksen aiheuttamasta stressistä (Haapala & Niskanen 1992). Myös emokasvin iällä on merkitystä mikrolisäyksen onnistumiseen. Lisäksi mikrolisäyksen onnistumisen kannalta on ratkaisevaa sopivan kasvatusalustan valinta ja pintasterilointi.

Mykoritsa sana tulee kreikan kielen sanoista ”sieni” ja ”juuri” (Taiz & Zeiger 2010). Isäntäkasvi tarjoaa mykoritsalle hiilihydraatteja ja mykoritsa puolestaan tarjoaa isäntäkasvilleen ravinteita ja vettä. Borealisella vyöhykkeellä kasvavilla puuvartisilla vallitseva mykoritsasymbioosin muoto on ektomykoritsa. Grellier ym. (1984) havaitsivat, että pulkkosienellä (*Paxillus involutus*) inokuloitujen rauduskoivujen versot olivat kaksi kertaa pidempiä kuin kontrolleina käytettyjen inokuloimattomien rauduskoivujen ja inokuloituissa puissa myös juurten kasvu parani verrattuna kontrollipuuihin. Ektomykoritsat voivat myös toimia mekaanisena suojana patogeenisiä sieniä ja sukkulamatoja vastaan (Petersen ym. 2004) Lisäksi jotkut ektomykoritsat voivat sitoa itseensä raskasmetalleja ja siten suojella kasveja näiltä aineita.

Tässä työssä tutkittiin kahden mikrolisätyn rauduskoivukloonin (W008 ja Sand 1/48) juurten ympäystä ektomykoritsasienillä juurtumisalustassa ja sitä miten

sieniympäyksen jälkeen verson ja juurten kasvu muuttuu. Kokeessa käytettiin kahta eri sienilajia (pulkkosieni ja punakärpässieni), jotta nähtiin miten eri sieniosakkaat vaikuttavat kloonien välisiin ja sisäisiin eroihin kasvutavassa.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Koivujen levinneisyys ja merkitys

Koivut (*Betula* sp.) ovat levinneet laajalle alueelle pohjoisella pallonpuoliskolla, ja siellä ne ovat pääosin rajoittuneet lauhkealle ja borealiselle kasvillisuusvyöhykkeelle (Welander 1993). Euroopassa kasvaa neljä alkuperäistä koivulajia, joista rauduskoivu (*Betula pendula* Roth) ja hieskoivu (*Betula pubescens* Ehrh) ovat puita, kun taas vaivaiskoivu (*Betula nana* L) ja pensaskoivu (*Betula humilis* Schrank) ovat pensaita. Useat koivulajit ovat valoa vaativia pioneerilajeja ja kykenevät siis nopean kasvutapansa ja tehokkaan siementuotantonsa takia nopeasti valloittamaan aukeat paikat metsäpalon tai avohakkuun jälkeen (Fischer ym. 2002, Hynynen ym. 2010). Rauduskoivu on yksi yleisimmistä ja tärkeimmistä lehtipuulajeista Pohjois-Euroopassa ja myös tärkeä havumetsävyöhykkeen biodiversiteetin eli monimuotoisuuden kannalta. Rauduskoivun lehtiä ja kaarnaa syö suuri joukko nisäkäs- ja hyönteisherbivoreja, juuret muodostavat symbiooseja mykoritsasienten kanssa ja puuta lahottavat monet eri lajottajasisienet.

Koivut vaikuttavat myös maaperän fysikaalisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin ja happamuuteen (Welander 1993). Koivut vaikuttavat maaperän ominaisuuksiin eri tavalla kuin havupuut (Mikola 1954, Mikola 1985, Hynynen ym. 2010). Koivun lehdet maatuvat nopeammin kuin havupuiden neulaset ja koivusta muodostuvat jätteet ovat vähemmän happamia. Koivikoissa ravinteiden kierto on nopeampaa kuin havupuumetsissä (Priha 1999, Hynynen ym. 2010). Koivujen juuristo ulottuu maaperässä syvälle ja maaperän huokoisuudelle on suotuisaa kuolleiden juurien nopea maatumisen. Puut vaikuttavat maaperään mikroilmastollaan, maan alle ja maan päälle muodostuvalla karikkeella ja juurien toiminnoilla. Puun aiheuttama varjostus vaikuttaa maaperän valo ja lämpötila olosuhteisiin ja karikkeesta vapautuvat epäorgaaniset yhdisteet vaikuttavat ravintoaineiden saatavuuteen ja maaperän orgaanisen materiaalin koostumukseen. Juuret erittävät maaperään erilaisia yhdisteitä kuten aminohappoja, orgaanisia happoja ja hiilihydraatteja.

Rauduskoivua käytetään materiaalina viilun ja vanerin tuotannossa sekä selluloosateollisuudessa paperin raaka-aineena (Welander 1993). Koivulla on myös korkea arvo polttopuuna, koska se toimii hyvänä energialähteenä. Koivua hyödynnetään myös huonekaluteollisuudessa, lattiamateriaalina ja lähtömateriaalina useissa kemiallisissa ja biokemiallisissa tuotteissa kuten hartsissa, rehussa ja kemikaaleissa kuten asetonissa ja glyserolissa.

2.2 Mikrolisäys

2.2.1 Mitä mikrolisäys on?

Kasvien mikrolisäyksellä tarkoitetaan solujen, solukoiden ja kasvinosien viljelyä irrallaan kasvista steriileissä olosuhteissa (Haapala & Niskanen 1992). Emokasvista irrotettua solukkoa kasvatetaan kasvatusalustalla, joka sisältää solukon kasvuun tarvittavia aineita, kuten sokereita, kasvihormoneita, makro- ja mikroravintoaineita. Emokasvista irrotettu solukko saa tarvitsemansa kaasumaisen hapen ja vedyn kasvatusastian sisällä olevasta ilmasta. Mikrolisäyksen perustana on kasvisolun kaikkikykisyys eli totipotenssi, jolloin jokainen kasvisolu pystyy muista kasvisoluista riippumatta kasvamaan kokonaiseksi kasviksi. Kasvien mikrolisäys on tehokas menetelmä tuottaa paljon tautivapaita, geneettisesti samanlaisia kasveja eli klooneja *in vitro* (Honda & Kobayashi 2004). Mikrolisäyksen etuna perinteisiin kasvien lisäysmenetelmiin verrattuna on nopeus, sillä yhdestä kasviyksilöstä voidaan mikrolisäyksen avulla tuottaa tuhansia kasveja (Haapala & Niskanen 1992).

Mikrolisäyksessä voidaan tuottaa uusia kasveja joko suoraan versojen organogeneesin tai somaattisen embryogeneesin avulla (Honda & Kobayashi 2004). Versojen organogeneesi on yksi laajimmin käytetyistä menetelmistä. Organogeneesissä kasvinosat alkavat muodostua välivaiheitta joko suoraan aloituspalasta tai siitä kasvaneesta kallussolukosta. Organogeneesi sisältää mikroversojen ja -juurien erilaistumisen (Ahuja 1993). Yleensä mikroversot alkavat kehittyä sytokiniinialustalla ja mikrojuuret auksiinialustalla. Organogeneesissä voidaan käyttää mikrolisäysmateriaalina kallusta eli aktiivisesti jakautuvaa erilaistumatonta solukkoa,

kasvien osia (siemeniä, sirkkalehtiä ja silmujen meristeemejä eli jakautumiskykyisiä säilyttäviä kasvusolukoita), soluja ja protoplasteja eli kasvisolukosta eristettyjä soluseinättömiä soluja. Organogeneesin onnistumiseen vaikuttaa paljon lisättävän materiaalin genotyyppi, fysiologinen tila ja ikä, *in vitro* ympäristö, valo, lämpötila, kasvatusalusta ja käytetyt hormonipitoisuudet. Solususpensioita ja protoplastiviljelmiä ei ole saatu onnistumaan laajassa mittakaavassa puuvartisilla kasveilla, joten näiden menetelmien käyttö on vähäistä. Solususpensiosta ja protoplastiviljelmistä kehittyi ensin kallusviljelmiä, minkä vuoksi niitä ei suositella kasvien kloonaukseen (Haapala & Niskanen 1992). Somaattinen embryogeneesi sisältää alkuiden kehityksen embryogeneesiin sopivista somaattisista soluista *in vitro* (Ahuja 1993). Somaattinen embryogeneesi on mahdollinen vielä kehitysvaiheessa olevilla puuvartisilla kasveilla.

Mikrolisäyksessä kloonausmateriaalien geneettinen yhdenmukaisuus on tärkeää (Ahuja 1993). Pitkäaikaisissa kallusviljelmissä esiintyvä geneettinen muuntelu onkin harmittava ongelma. Meristeemiviljelmät sitä vastoin ovat kohtalaisen stabiileja ja geneettisen muuntelun riski on niissä pieni. Meristeemialoitus on paras aloitusmenetelmä puuvartisten kasvien mikrolisäyksessä (Haapala & Niskanen 1992). Meristeemi on kasvusolukkoa, joka ei ole erilaistunut miksikään kasvinosaksi. Meristeemisolukkoa on kaikissa kasvavissa kasvinosissa, mutta meristeemiviljelyn aloittaminen on helpointa silmujen meristeemeistä. Meristeemi sijaitsee kasvupisteessä silmun sisällä, lehdenaiheiden suojassa. Irrotetut meristeemit joutuvat hyvin erilaiseen kasvuympäristöön ja siksi ne alkavat erittää fenoleita kasvatusalustaansa ja siten vähitellen myrkyttämään itseään. Fenolit ovat kemikaaleja, joita kasvi normaalisti käyttää ja varastoi solukoihinsa. Vapautuneena fenolit ovat kuitenkin kasveille haitallisia ja siksi mikrolisäyksen alussa meristeemejä joudutaan siirtämään parin päivän välein uudelle kasvatusalustalle.

2.2.2 Koivun mikrolisäys

Koivulajeja on mikrolisätty sekä nuorista että aikuisista puista (Welander 1993). Kasvun eri vaiheissa koivuilla on käytetty useita eri kasvatusalustoja ja kasvun säätelijöitä. Mikrolisäysmateriaalina taimista ja nuorista puista on käytetty verson

kärkiä, kärki- ja hankasilmuja ja solmuosia. Myös kallusvaiheen kautta on pystytty lisäämään sekä nuoria että vanhoja puita käyttämällä esimerkiksi niiden juuria, lehtiä, solmuja ja heteen ponsia mikrolisäysmateriaalina. Useimmat koivulajit muodostavat silmuja melko helposti ja luultavasti siksi aikuismateriaalia voidaan mikrolisätä ilman suurempia ongelmia. Mikrolisäykseen tarvittavaan aikaan vaikuttaa mikrolisäysmateriaali, emopuun ikä, lajit ja kloonit. Normaalisti silmualoitukseen tarvitaan noin 4-10 viikkoa.

Useat tekijät vaikuttavat rauduskoivun kasvuun ja kehitykseen sekä nuoresta että aikuisesta mikrolisäysmateriaalista (Welander 1993). Nuorilla puilla viljelyn aloitukseen vaikuttaa sekä emokasvin hoito että silmujen sijainti. Lyhyen päivän olosuhteisiin altistetut puut ovat lepotilassa ja siten parhaiten soveltuvia *in vitro* kasvatukseen. Vakava ongelma puuvartisten kasvien mikrolisäyksessä on fenolisten yhdisteiden erittyminen leikkauskohdasta. Mikrolisäyksen alussa ilmenevään fenolisten yhdisteiden erittymiseen vaikuttaa mikrolisäysmateriaalin ikä, silmun sijainti, mikrolisäysmateriaali ja emokasvin hoito. Aikuisista puista otetut pidentyneet kärkisilmut erittävät vähemmän fenoleja kuin levossa olevat silmut. Aktiivisesti kasvavien puiden silmut sitä vastoin sisältävät enemmän fenoleja kuin lepotilassa olevat silmut.

Jones ym. (1996) vertailivat tutkimuksessaan mikrolisättyjen ja siemenestä itäneiden rauduskoivujen kasvua. Mikrolisäyksen aloitukseen käytettiin 20-vuotiaan rauduskoivun solmukohtia ja kalluskudosta ja myös siemenet kerättiin samasta puusta. Siemenistä iti noin 50 % kahden viikon aikana. Mikrolisättyjen taimien ja siemenistä itäneiden taimien kasvua seurattiin kasvatusastiassa 17 kuukautta ja kuusi vuotta kenttäkokeessa. Sekä solmukohdista että kalluskudoksesta mikrolisätetyt puut kasvoivat samaa vauhtia siemenistä kasvaneiden puiden kanssa eikä selviä mutanttityyppejä havaittu. Mikrolisätetyt puut olivat kuitenkin yhdenmukaisempia pituuskasvultaan ja rungon ympärysmitaltaan kuin siemenistä kasvaneet puut. Toinen ero mikrolisättyjen ja siemenistä kasvaneiden puiden välillä liittyi kukkimiseen. Yli 80 % mikrolisätetyistä puista kukki pellolla ensimmäisen kolmen vuoden aikana, kun taas siemenistä kasvaneista puista vain 39 % kukki ensimmäisen kolmen vuoden aikana. Mikrolisättyillä

puilla esiintyi vähemmän koivulle tyypillistä kaarnan halkeilua kuin siemenistä kasvaneilla puilla.

2.2.3 Mikrolisäysmateriaali ja pintasterilointi

Mikrolisäyksen onnistumisen kannalta on hyvä valita mahdollisimman hyväkuntoinen ja terve kasvi (Haapala & Niskanen 1992). Vahvat ja hyväkasvuiset emoyksilöt selviävät usein paremmin mikrolisäyksen aiheuttamasta stressistä. Myös kasvin iällä on merkitystä mikrolisäyksen onnistumiseen. Nuoret kasvit ja vanhojen kasvien nuoret oksat ovat parempia vaihtoehtoja mikrolisäykseen kuin vanhat oksat. Mikrolisäys voidaan aloittaa mihin aikaan vuodesta tahansa, mutta monien kasvien mikrolisäys onnistuu yleensä parhaiten joko aikaisin keväällä kasvunsa jo alkaneista silmuista tai lepotilaisista silmuista. Keväällä on kuitenkin varmistettava, että pakkanen ei ole vahingoittanut jo avautuneita silmuja. Joissakin tapauksissa paras aloitusaika on keskikesällä, jolloin kasvin kasvu on parhaimmillaan.

Mikrolisäysmateriaali pintasteriloidaan ennen mikrolisäyksen aloittamista (Haapala & Niskanen 1992). Pintasteriloinnin tarkoituksena on tuhota mikro-organismit, kuten sienet ja bakteerit, kasvin pinnalta. Monissa kasveissa voi kuitenkin olla sisäisiä infektoita, jotka mikrolisäyksen aikana aiheuttavat kontaminaatioita. Pintasteriloinnissa käytettävän sterilointiaineen olisi hyvä olla helposti huuhdeltavissa kasvin pinnalta steriloinnin jälkeen. Welanderin (1993) tutkimuksessa muutaman senttimetrin mittaiset koivun varren palat pintasteriloitiin 70 % etanolilla 1 minuutin ajan. Tämän jälkeen palat siirrettiin 15 minuutiksi 7 % kalsiumhypokloriittiin, joka sisälsi myös nestemäistä saippuaa (0,1 % Tween-20). Welanderin (1993) mukaan verson kärjet eivät tarvitse etanolikäsittelyä vaan niille riittää pelkästään 10 minuutin kalsiumhypokloriittikäsittely. Mikrolisäysmateriaali huuhdottiin kolme kertaa steriilillä vedellä ja tämän jälkeen mikrolisäysmateriaali siirrettiin 0,1 mM L-kysteiiniliuokseen, jotta välttyttäisiin materiaalin ja kasvatusalustan ruskettumiselta. Grellier ym. (1984) tutkimuksessa rauduskoivun siemenet pintasteriloitiin upottamalla ne 1 % vetyperoksidiin (H_2O_2) 48 tunniksi +4 °C. Tämän jälkeen siemeniä steriloitiin vielä 30 % vetyperoksidilla 15 minuuttia ja lopuksi siemenet huuhdeltiin vielä steriilillä vedellä. Jones ym. (1996)

tutkimuksessa koivunversot leikattiin 2-4 cm pituisiksi palasiksi, minkä jälkeen ne pintasteriloitiin 70 % etanolilla 1 minuutin ajan. Tämän jälkeen palat upotettiin 15 minuutiksi 10 % natriumhypokloriittiliuokseen, joka sisälsi myös nestemäistä saippuaa (0,1 % Tween-20), ja steriloinnin jälkeen palat pestiin kolme kertaa steriilillä vedellä. Monille kasveille, joiden mikrolisäys aloitetaan silmumeristeemistä, pintasterilointi pelkällä 70 %:lla etanolilla on osoittautunut riittäväksi toimenpiteeksi mikro-organismia vastaan (Haapala & Niskanen 1992). Muita yleisiä sterilointiaineita ovat hypokloriitit, kuten natriumhypokloriitti ja kalsiumhypokloriitti. Natriumhypokloriitin etuna on, että se tunkeutuu nopeammin kasvisolukkaan kuin kalsiumhypokloriitti. Muita pintasterilointiin käytettyjä kemikaaleja ovat esimerkiksi elohopeakloridi, hopeanitraatti, yksinkertaiset hapot ja emäkset sekä jotkut antibiootit. Pintasterilointia voidaan tehostaa huuhtelemalla mikrolisäysmateriaali ensin vedellä. Myös nestemäisen saippuan tai pesuaineen, kuten Tween-20 tai Tween-80, lisääminen hypokloriittiin vähentää pintajännitystä ja parantaa steriloinnin tehoa. Kosteana ja lämpimänä kautena aloitetut mikrolisäysviljelmät vaativat tehokkaamman pintasteriloinnin kuin kylmänä kautena aloitetut.

2.2.4 Kasvatusalustat

Kasvatusalustan aineosat on tarkoitettu mikrolisäysmateriaalin solukkojen ravinteiksi (Haapala & Niskanen 1992). Solukkojen kasvuun ja erilaistumiseen vaikuttaa ravinteiden määrä ja laatu. Kasvatusalustat ovat suurimmaksi osaksi vettä, jossa se toimii kasvatusalustan liuottimena. Koska tavallinen vesijohtovesi sisältää epäpuhtauksia, sitä ei voida käyttää kasvatusalustoihin. Tavallisen vesijohtoveden sijaan käytetään ionivaihdettua tai tislattua vettä. Kasvatusalustan kiinteyttämiseen käytetään yleisesti agaria, joka veteen liuotettuna hyydyttää nesteen. Agarin hyytymiseen vaikuttaa liuoksen happamuus ja siksi kasvatusalusta yleensä valmistetaan lievästi happameksi (pH 5-6). Tämä pH-arvo on myös suotuisa mikroravinteiden saatavuudelle. Makroravinteista kasvit tarvitsevat kaliumia, kalsiumia, magnesiumia, rikkiä, fosforia ja typpeä ja niitä kasvatusalustaan epäorgaanisina suoloina. Mikroravinteista tärkeimmät ovat mangaani, sinkki, kupari, boori, kloori, jodi, molybdeeni, koboltti, alumiini ja nikkeli ja näiden lisäksi kasvatusalustoihin lisätään myös rautaa erilaisina yhdisteinä. Kasvatusalustan tärkein osa on sokeri, koska solukko viljelyoloissa kasvien

yhteyttäminen on heikkoa tai sitä ei ole ollenkaan. Kasvatusalustassa sokeri on hiilen lähde, ja yleisin kasvatusalustoissa käytetty sokeri on sakkaroosi, joka hajoaa osittain autoklavoitaessa glukoosiksi ja fruktoosiksi.

Kasvatusalustoihin lisätään myös vitamiineja, aminohappoja ja muita orgaanisia aineita joko ravinteiden lähteeksi tai kasvin aineenvaihduntaa varten (Haapala & Niskanen 1992). Vitamiinit osallistuvat usein entsyymien toimintaan ja ovat välttämättömiä kasvien kehitykselle. Kasvatusalustoihin voidaan lisätä vesiliukoisia B-vitamiineja ja C-vitamiinia. Aminohapot, kuten L-glutamiini, adeniini ja aspargiini, toimivat kasvatusalustassa orgaanisena typen lähteenä. Kasvatusalustaan lisätty aktiivihiili estää agarista tai kasvista erittyvien myrkyllisten aineiden vaikutusta. Aktiivihiilen on myös huomattu estävän solukkojen ruskettumista, vähentävän fenolien haittavaikutusta kasvin kasvuun ja edistävän versojen juurtumista. Aktiivihiilen käytön huonona puolena on se, että se alentaa alustaan lisättyjen ja kasvista erittyvien kasvihormonien tehoa.

Kasvit tuottavat siis itse hormoneita, jotka pieninä määrinä edistävät kasvua ja kehitystä (Haapala & Niskanen 1992). Kasvatusalustoissa kasvihormonit säätelevät solukkojen erilaistumista. Mikrolisäyksessä käytetään sekä luonnon kasvihormoneita että synteettisiä hormoneita. Auksiinit ovat kasvihormoneja, jotka edistävät pieninä pitoisuuksina verson ja juuren kasvua. Yleisin mikrolisäyksessä käytetty luonnonauksiini on indolietikkahappo (IAA). Synteettisistä auksiineista eniten käytettyjä ovat α -naftaleenietikkahappo (NAA), indolivoihappo (IBA) ja 2,4-diklorfenoksietikkahappo (2,4-D). Luonnonauksiinit ja synteettiset auksiinit eroavat toisistaan rakenteen ja tehon osalta, luonnonauksiineja tarvittaisiin kasvatusalustoissa suurempia määriä kuin synteettisiä auksiineja ja siksi synteettisiä auksiineja on lisättävä sekä peruskasvatusalustaan että juurtumisvaiheessa juurrutusalustaan. Auksiineja käytetään juurrutusalustoissa edistämään juurten muodostumista. Sytokiniinit taas ovat kasvihormoneita, jotka edistävät solunjakautumista. Luonnon sytokiniineistä mikrolisäyksessä käytetään 2-isopentenyladenopuriinia (IPA) ja zeatiinia. Mikrolisäyksessä käytetään myös synteettisiä sytokiniineja, kuten kinetiiniä ja 6-bentsylaminopuriinia (BAP, BA). Gibberelliinit ovat kasvihormoneita, jotka aktivoivat solunjakautumista. Mikrolisäyksessä käytetään GA₃-gibberelliinihappoa, joka muiden

kasvusäätteiden kanssa edistää verson pituuskasvua. Muita kasvua sääteleviä aineita mikrolisäyksessä ovat esimerkiksi adeniinisulfaatti, abskissihappo (ABA), etyleeni, polyamiinit ja urean johdannaiset.

Yleisin mikrolisäyksessä käytetty kasvatusalusta lienee Murashigen ja Skoogin vuonna 1962 kehittämä ja kehittelijöidensä mukaan nimetty MS-alusta (Haapala & Niskanen 1992). MS-alustan suolakonsentraatio on kuitenkin osoittautunut liian korkeaksi joillekin puuvartisille kasveille ja niinpä Lloyd ja McCown kehittivät vuonna 1980 Woody Plant Mediumin (WPM-alusta) (Taulukko 1). Welanderin (1993) tutkimusten mukaan soveltuvin kasvatusalusta koivun mikrolisäyksen aloitukseen on muokattu N6-alusta. N6-alusta sisälsi makroravintoaineita Chu ym. (1975) mukaan ja mikroravintoaineita ja vitamiineja Murashige & Skoog (1962) mukaan. Kasvihormoneina kasvatusalustalla käytetään BAP ja NAA. Mikrolisäyksen aloituksen aikana useimmat nuoresta mikrolisäysmateriaalista otetut silmut kehittivät versoja. Aikuisesta mikrolisäysmateriaalista otetut silmut sitä vastoin yleensä heikkenivät kasvatusjakson loppua kohden. Welanderin (1993) mukaan paras kasvatusalusta koivunversojen lisäämiseen on WPM-alusta, johon oli lisätty kasvihormoneja BAP ja NAA. WPM-alustalla tuotetut versot olivat ohuita ja niillä oli pienet lehdet, kun taas N6-alustalla tuotetut versot olivat jäntevämpiä ja niillä oli isommat lehdet.

Taulukko 1. Kasvien mikrolisäyksessä yleisimmin käytettyjen MS- ja WPM-alustojen koostumukset. MS: Murashige Skoog alusta, WPM: Woody plant medium alusta.

	MS (mg/l)	WPM (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	400
KNO ₃	1900	
Ca(NO ₃) ₂ *4 H ₂ O		556
CaCl ₂ *2 H ₂ O	440	96
MgSO ₄ *7 H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
K ₂ SO ₄		990
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
FeSO ₄ *7 H ₂ O	27,8	27,8
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
MnSO ₄ *4 H ₂ O	22,3	22,3
ZnSO ₄ *4 H ₂ O	8,6	
ZnSO ₄ *7 H ₂ O		8,6
KJ	0,83	
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,025	0,25
CoCl ₂ *6 H ₂ O	0,025	
Myoinositoli	100	100
Nikotiinihappo	0,5	0,5
Pyridoksiini HCl	0,5	0,5
Tiamiini HCl	0,1	1
Glysiini	2	2

2.2.5 Juurtuminen

Kasvatusalustan matalat suola- ja aukiinipitoisuudet parantavat juurtumista, ja ensimmäiset juuret ilmestyvät yleensä 7-10 päivässä juurrutusalustalla (Welander 1993). Juurtumisen kannalta on tärkeää, että käytettävät versot ovat hyvässä kasvuvaiheessa, kun ne siirretään lisäsalustalta juurrutusalustalle. Juurrutettavien versojen olisi hyvä olla 1-2 cm pitkiä. WPM-alustalla, jossa makroravintoaineiden määrä on vähennetty viidennekseen ja alustaan on lisätty 0,1 mg/l IBA, juurtuminen yleensä onnistuu 95-100 %:sesti. WPM- ja N6-alustoilla on huomattu suuria eroja juurten morfologiassa. N6-alustalla juuret ovat lyhyitä ja paksuja, kun taas WPM-alustalla juuret ovat pitkiä ja ohuita ja ne haaroittuvat enemmän. Särkilahden (1988) tutkimuksessa juurrutusalustana käytettiin samaa MS-alustaa kuin rauduskoivun mikrolisäyksen aloituksessa ja versojen kasvatuksessa sillä erotuksella, että juurrutusalusta ei sisältänyt BAP:ia ja NAA:n määrää oli lisätty. Versot siirrettiin juurrutusalustalle ja niiden leikkauspintaan muodostui punaisia juurenkärkiä 4-5 päivässä. Kahden viikon kuluttua jokaiseen versoon oli kehittynyt 4-8 primäärijuurta. Juuret eivät olleet tuolloin vielä haarautuneet, mutta ne olivat erittäin karvaisia. Juurrutusalustalle siirretyistä versoista 94 % juurtui.

2.3 Mykoritsasymbioosi

2.3.1 Mikä on ektomykoritsa?

Mykoritsasienen ja isäntäkasvin välinen suhde on luokiteltu mutualistiseksi symbioosiksi (Brundrett 2004). Mutualismi tarkoittaa, että yhteydessä olevilla kahdella tai useammalla elävällä organismilla on yhteinen etu. Isäntäkasvi saa mykoritsasienen avulla vettä ja ravinteita kasvuun varten ja mykoritsasieni puolestaan saa kasvilta hiilihydraatteja omaa kasvuun ja lisääntymistään varten. Kumpikin osapuoli siis hyötyy vuorovaikutussuhteesta. Symbioosilla sitä vastoin viitataan siihen, että isäntäkasvi ja mykoritsasieni muodostavat kiinteän mykoritsarakenteen (Hartigin verkko), jonka kautta ne ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Ektomykoritsat

voivat myös toimia mekaanisena suojana patogeenisii sieniä ja sukkulamatoja vastaan (Petersen ym. 2004) Lisäksi jotkut ektomykoritsat voivat sitoa raskasmetalleja itseensä ja siten suojella kasveja näiden aineiden myrkyllisiltä pitoisuuksilta. Ektomykoritsat myös suojelevat kasvin juuria kuivumiselta.

Maaekosysteemien kaksisirkkaisista kasveista 83 % ja yksisirkkaisista kasveista 79 % muodostaa symbioosin mykoritsan kanssa, joten juurten mykoritsattomuus on harvinainen tilanne luonnossa (Taiz & Zeiger 2010). Mykoritsat on perinteisesti jaettu kahteen päätyyppiin: ektomykoritsoihin ja endomykoritsoihin (Petersen ym. 2004). Endomykoritsoja on useita eri tyyppisiä, kuten arbuskelimykoritsat, ericoid-mykoritsat, arbutoid-mykoritsat, monotropoid-mykoritsat, ectendo-mykoritsat ja orchid-mykoritsat. 80 % kasvilajeista muodostaa mykoritsan arbuskelimykoritsan kanssa. Arbuskelimykoritsoja muodostaa muutamat keräsieniin (Glomeromycota) kuuluvat sienisuvut. Ericoid-mykoritsoja muodostuu kanervakasveilla ja niitä muodostaa muutama kotelosieniin (Ascomycota) kuuluva sieni. Arbutoid-mykoritsoja ja monotropoid-mykoritsoja muodostuu Ericales –lahkon jäsenillä. Ectendo-mykoritsoja muodostuu männyillä ja lehtikuusilla ja niitä muodostaa pieni ryhmä keräsieniin kuuluvia sieniä. Orchid-mykoritsoja muodostuu kämmekkäkasveilla ja niitä muodostaa useat kantasieniin (Basidiomycota) kuuluvat sienet. Ektomykoritsoja muodostavista sienistä suurin osa kuuluu kantasieniin ja muutama sienilaji kuuluu kotelosieniin (Smith & Read 2008). Lisäksi ektomykoritsoja muodostaa yhtymäsieniin (Zygomycota) kuuluvan *Endogone* –suvun sienet. Ektomykoritsoja muodostuu pohjoisen pallonpuoliskon boreaalisella kasvillisuusvyöhykkeellä mm. koivujen, tammien, leppien, kuusien, mäntyjen, lehtikuusien, pyökkien ja haapojen kanssa. Ektomykoritsat eroavat endomykoritsoista siten, että ektomykoritsat muodostavat tyypillisesti paksun vaipan sienirihmastoja juurien ympärille, kun taas endomykoritsat eivät muodosta kompaktia vaippaa (Petersen ym. 2004). Ektomykoritsat eroavat endomykoritsoista myös siten, että endomykoritsoille ei muodostu Hartigin verkkoa.

Mykoritsat muodostuvat hienoista, putkimaisista filamenteista, joita kutsutaan sienirihmoiksi (Taiz & Zeiger 2010). Sienirihman massa muodostaa sienien vartalon, jota kutsutaan sienirihmastoksi. Ektomykoritsat muodostavat tyypillisesti paksun

suojuksen (vaipan) sienirihmasto isäntäkasvin juurien ympärille ja osa sienirihmastosta tunkeutuu kortikaalisolujen väliin. Ektomykoritsan sienirihmat eivät tunkeudu kortikaalisoluihin vaan muodostavat niiden ympärille verkoston, jota kutsutaan Hartigin verkoksi. Usein sienirihmaston määrä on niin valtava, että sen massa vastaa juurien massaa. Sienirihmasto myös laajenee maaperään muodostaen yksittäisiä sienirihmoja. Juurisysteemin kapasiteetti ravintoaineiden imeytymiseen paranee yksittäisten maaperään laajenevien sienirihmojen ansiosta, koska sienirihmat ovat paljon ohuempia kuin kasvin juuret ja ne ylettävät hankkimaan kauempaa ravintoaineita. Maaperään laajenevat sienirihmat muodostavat myös tärkeitä yhteyksiä sekä maaperän että ektomykoritsoja muodostavien sienten itiöemien kanssa (Smith & Read 2008). Maaperään laajenevat sienirihmat eroavat toisistaan morfologian, värin ja sisäisen rakenteen osalta (Petersen ym. 2004).

Hartigin verkossa tapahtuu ektomykoritsojen pääasiallinen ravinteiden vaihto (Petersen ym. 2004). Hartigin verkon sienirihmojen kautta sieni absorboi suurimman osan sokereista ja ravintoaineet ja vesi siirtyvät juuren soluille. Sisemmän vaipan sienirihmojen haarojen uskotaan myös toimivan ravintoaineiden vaihdossa. Sienet pystyvät absorboimaan glukoosia ja fruktoosia juurien soluista ja muuntamaan ne liukoiksi hiilihydraateiksi, kuten trehaloosiksi ja mannitoliksi, ja liukenemattomaksi hiilihydraatiksi, kuten glykokeeniksi. Nämä yhdisteet voidaan varastoida joko väliaikaisesti tai pidempi-aikaisesti vaipan sienirihmoihin. Vaipan sienirihmoihin voi kerääntyä myös muita yhdisteitä, kuten rasvoja, proteiineja, fenoleita ja polyfosfaatteja. Ektomykoritsojen ulkoinen sienirihmasto voi imeä fosfaattia ja antaa sen kasvien käyttöön (Taiz & Zeiger 2010). Lisäksi on ehdotettu, että ektomykoritsat voivat kasvaa nopeasti maaperän orgaanisessa karikkeessa ja hydrolysoivat orgaanista fosforia juuriin kuljetusta varten (Smith & Read 2008). Ektomykoritsoilla epäorgaaninen fosfaatti voi siirtyä diffuusion avulla Hartigin verkon sienirihmasta isäntäkasvin juuren kortikaalisoluihin. Jotkut mykoritsajuureissa tapahtuvat proteiinisynteesin muutokset voidaan yhdistää ravintoaineiden vaihtoon, jota tapahtuu isäntäkasvin ja sienien välillä (Anderson 1992). Isäntäkasvista virtaa hiilihydraatteja sienelle ja sienestä epäorgaanisia ioneja, erityisesti fosfaattia, isäntäkasviin. Tietyt mykoritsasienet voidaan yhdistää lisääntyneeseen fosfaattimetaboliaan, jota tapahtuu mykoritsassa. Luultavasti entsyymien, kuten kinaasien, aktiivisuutta tarvitaan sienissä, jotta varastoituneen

fosfaatin depolymerisaatio tehostuisi. Ravintoaineiden vaihto sienen ja kasvin välillä vaatii kulkemista sienen soluseinän ja solukalvon läpi sekä kasvin soluväliaineen ja solukalvon läpi. Kasvin typpimetabolia on myös herkkä mykoritsan muodostumiselle. Mykoritsasienet muuntavat maaperän ammoniumionit aminohapoiksi, jotka kuljetetaan kasviin. Ektomykoritsoilla glutamiini kuljetetaan rajapinnan yli. Ektomykoritsasta aiheutuu merkittävä hiilen menetys isäntäkasville (Smith & Read 2008). Ektomykoritsa lisää yhteyttämistuotteiden kuten sokerin kulutusta (Loewe ym. 2000). Ektomykoritsojen korkea hiilihydraattien kulutus voi heikentää isäntäkasvin verson kasvua.

Hartigin verkkoa, joka koostuu labyrinthimaisesta sienirihmasta solujen välissä, käytetään ektomykoritsan tunnusmerkkinä (Brundrett 2004). Hartigin verkon tiheys ja isäntäkasvin kasvureaktiot tiettyihin sienikantoihin tukevat väitettä, että Hartigin verkko olisi ensisijainen paikka ravintoaineiden vaihtoon isäntäkasvin ja sienen välillä. Ektomykoritsat voidaan jakaa kahteen peruskategoriaan morfologian perusteella. Lehtipuiden (esim. myrttikasvit, koivukasvit, pajukasvit, pyökkikasvit ja dipterokarpuskasvit) ja havupuiden ektomykoritsoissa on hieman morfologisia eroja. Lehtipuilla, kuten rauduskoivulla, Hartigin verkko rajoittuu epidermaalisoluihin, kun taas havupuilla, kuten männyillä, Hartigin verkko valloittaa useita solukerroksia kortikaalissa. Näihin kategorioihin on kuitenkin muutamia poikkeuksia. Esimerkiksi ruusukasveihin kuuluvalla *Dryas integrifolia*:lla on kortikaalinen Hartigin verkko. On myös mahdollista, että Hartigin verkkoa ei kehity lainkaan, kuten esimerkiksi *Pisonia grandis* -puulla (Petersen ym. 2004). Tällöin sisempi vaippa toimii sienen ja juurien epidermaalisolujen yhtymäpaikkana.

2.3.2 Ektomykoritsasymbioosin spesifisyys ja inokulaatioprosessi

On arvioitu, että 5000-6000 sienilajia muodostaa ektomykoritsoja (Molina ym. 1992, Smith & Read 2008). Kasveilla vaikuttaa olevan vain vähän spesifisyyttä sieniä kohtaan. Lähes kaikki ektomykoritsojen kanssa symbioosin muodostavat kasvit voidaan yhdistää moniin sieniin. On arvioitu että yksi kasvilaji voidaan yhdistää tuhansiin

sienilajeihin kasvin levinneisyysalueella. Kasvien spesifisyyden puuttuminen sieniä kohtaan on hyödyllistä, koska se lisää juurien mahdollisuutta löytää sopiva symbiontti. Lisäksi erilaisia fysiologisia ominaisuuksia omaavien sienilajien kanssa yhdistyminen voi tarjota mahdollisuuden laajempaan määrään ravintoaineita. Myös sienillä vaikuttaa olevan vain vähän spesifisyyttä kasveja kohtaan, mutta viime aikoina on selvinnyt, että sienillä on havaittavissa enemmän erikoistumista tiettyjä kasvilajeja kohtaan.

Luonnossa ilmenee suknessiota, jolloin tietyn alueen eliöyhteisö kehittyy (Smith & Read 2008). Sienet jaetaan alkuvaiheen ja loppuvaiheen sieniin. Alkuvaiheen sienet kuten tympöset (*Hebeloma*), risakkaat (*Inocybe*) ja lohisienet (*Laccaria*) muodostuvat nuorten puiden ympärille ensin ja loppuvaiheen sienet kuten rouskut (*Lactarius*), tatit (*Leccinum*) ja haperot (*Russula*) ilmestyvät paikalle myöhemmin, vuosien kuluttua. Alkuvaiheen sienet pystyvät infektoimaan luonnonvaraisessa tai häiriintyneessä kasvupaikassa kasvavien puiden juuria ja loppuvaiheen sienet voivat infektoida versoja levittäytymällä metsän aikuisista juurista. Metsättömässä ympäristössä sienet, jotka voivat muodostaa mykoritsoja itiöiden avulla ovat tärkeässä asemassa. Sienien leviämiseröillä (itiöillä tai sienirihman avulla) on sekä biologinen että ekologinen merkitys.

Ektomykoritsojen kehityksen alkuvaiheeseen vaikuttaa inokulaation lähde (Smith & Read 2008). Luonnossa inokulaatio voi tapahtua kahdella eri tavalla. Primäärijuuresta kausittain kasvavat lateraaliset juuret infektoituvat joko primäärijuuren Hartigin verkon avulla kuten männyillä tai primäärijuurta peittävän sisemmän vaipan avulla kuten eukalyptuksella. Molemmissa tapauksissa lateraaliset juuret infektoituvat samalla sienellä, joka muodostaa mykoritsan primäärijuuren kanssa. Sitä vastoin tapauksissa, joissa lateraaliset juuret kasvavat inokuloimattomasta primäärijuuresta tai siemenestä itää kokonaan uusi juuriverkosto, on mahdollista, että juuret infektoi maaperässä kasvavan sienin itiö.

Ritsosfäärissä juurten erittämät yhdisteet vaikuttavat mykoritsasienten kasvuun ja toimintaan (Anderson 1992). Juurten eritteet ohjaavat sienten itiöiden itämistä ja

ituputkien kasvua. Lisääntynyt haaroittuminen ja sienirihman suuntautuminen juurta kohti voivat vahvistaa myöhempää infektiota. Ritsosfäärin ravinteita käyttää myös muut mikrobit, joten itiöiden ja sienirihman selviytyminen kilpailussa on avainasemassa mykoritsojen muodostuksessa. Sienirihman liittymisessä juuren pintaan on mukana useita eri mekanismeja. Nämä mekanismit sisältävät mm. varaus-interaktioita, lektiini-hiilihydraatti-tunnistuksen ja hydrofobista sitoutumista. Juurien pinta vaikuttaa selvästi ituputken kasvuun, mikä on tärkeää infektion kannalta. Ituputki voi jatkaa kasvuaan juuren pinnalla tai se voi käydä läpi morfologisen erilaistumisen tuottaakseen infektorakenteen (appressoriumi). Ei tiedetä kuinka yhteys juuren kanssa vaikuttaa appressoriumin ajoitukseen ja sijaintiin mykoritsasienillä. Juuren sisään tunkeutuminen on kolmas taso mykoritsasienen ja juuren interaktiossa. Sienirihman kasvu juuren sisään mahdollistaa ravintoaineiden vaihdon, mikä on välttämätöntä symbioosin muodostumiselle. Ektomykoritsoilla sienirihma haarautuu kasvien soluseinissä, mutta ei tunkeudu soluseinien läpi. Sienirihmojen levittäytyminen epidermaali- ja kortikaalikerrokseen Hartigin verkon muodostamiseksi vaihtelee ja sitä käytetään usein merkinä ektomykoritsan muodostumisesta.

Keinotekoisilla kasvatusalustoilla, kuten agargeeleillä tai nesteillä, ektomykoritsasienien sienirihmasto näyttää kasvavan tiheänä ja kuohkeana, mutta erilaistumattomana muotona (Smith & Read 2008). Kasvutapa eroaa tavasta, jolla ektomykoritsasienet kasvavat luonnossa kasvien yhteydessä. Sekakoosteisilla luonnollisilla kasvualustoilla on havaittavissa huomattavaa morfogeettistä muovautuvuutta sekä sienirihman kärjessä että muissa kehittyvissä osissa. Sienirihman liittyminen infektoimattomaan juureen aloittaa ektomykoritsan muodostumisen. Tämä mekanismi toimii esimerkiksi silloin, kun versoja sopeutetaan sienirihmastoverkoston.

Grellier ym. (1984) käyttivät tutkimuksessaan pulkkosientä (*Paxillus involutus*) infektoimaan mikrolisätyn rauduskoivun juuria. Pulkkosienet oli kerätty Länsi-Ranskasta koivujen läheisyydestä. Juurrutetut rauduskoivun versot siirrettiin pulkkosienellä inokuloituille kasvatusalustoille. Kasvatusalustat inokuloitiin ensimmäisessä menetelmässä siirtämällä agarpala sieniviljelmästä ja toisessa menetelmässä siirtämällä nestemäistä sienirihmastoseosta kasvatusalustalle.

Kolmannessa menetelmässä versot siirrettiin sieniviljelmään. Tutkimuksessa selvisi, että pulkkosieni vaikutti rauduskoivun kasvuun, sillä kokeen päättyessä ja inokulointitavasta huolimatta pulkkosienellä inokuloitujen rauduskoivujen versot olivat kaksi kertaa pidempiä kuin kontrolleina käytettyjen inokuloimattomien rauduskoivujen. Juurissa oli havaittavissa sama kasvustimulaatio, inokuloituilla rauduskoivuilla oli muodostunut paljon enemmän juuria kuin inokuloimattomilla.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Tutkimuksen tavoitteet

Työn tarkoituksena oli selvittää miten koivun genotyyppien (W008 ja Sand 1/48) väliset mahdolliset erot versojen ja juurten kasvussa muuttuvat eri sienikäsittelyissä (kontrolli, AM ja PI). Lisäksi tutkittiin onko näillä kahdella eri sienellä erilaiset vaikutukset versojen ja juurten kasvuun saman koivukloonin sisällä. Työhypoteeseina oli, että mykoritsaympätyt koivut kasvaisivat paremmin (sekä verso että juuret) kuin mykoritsattomat koivut ja että myös koivun genotyyppi ja sienialkuperä voivat vaikuttaa siihen miten suuri hyöty ympäyksestä puille on. Lisäksi yhtenä tarkoituksena oli kokeilla PCR-menetelmää, jolla mykoritsat voidaan tunnistaa kasvinäytteestä.

3.2 Koivun mikrolisäys ja mykoritsojen ympäys

Koivun mikrolisäykseen valittiin kaksi eri koivukloonaa W008 ja Sand 1/48. W008 koivukloonin on peräisin hylätyltä lyijy/sinkkikaivokselta Aberystwythistä, Walesista (Kopponen ym. 2001). Sand 1/48 koivukloonin alkuperää ei tunneta. Kummastakin koivukloonista lisättiin noin 1 cm mittaisia verson pätkiä, joissa oli mukana vain yksi lehti (versojen latvat leikattiin pois). Kumpaakin koivukloonaa lisättiin 10 purkkia ja jokaiseen purkkiin laitettiin kasvamaan 5 tainta. Kasvualustana käytettiin WPM-alustaa, jossa oli zeatiinia 1 mg/l ja PPM 2 ml/l.

Mykoritsainokulaatioon valittiin kaksi eri mykoritsalajia, pulkkosieni (*Paxillus involutus*) ja punakärpässieni (*Amanita muscaria*). Kumpikin mykoritsakanta on peräisin Itä-Suomen yliopiston Ympäristötieteen laitoksen omista sienikasvatuskannoista. Pulkkosieni (H87-mykoritsakanta) oli kerätty Oulusta ja se valittiin tutkimukseen mukaan, koska pulkkosienillä on aikaisemmin onnistuttu inokuloimaan rauduskoivuja (Grellier ym. 1984). Punakärpässien (H2-mykoritsakanta) alkuperää ei tunneta. Mikrolisätyihin koivuihin (W008 ja Sand 1/48) ympättiin joko pulkkosientä (PI-käsittely, 6 purkkia) tai punakärpässientä (AM-käsittely, 6 purkkia) ja 6 purkkia jätettiin inokuloimattomiksi kontrolleiksi. Kaksi 5 mm x 5 mm mykoritsakasvustopalaa upotettiin WPM-agariin. Kontrollissa puhtaasta

mykoritsakasvatusalustasta (Hagem-alusta) leikatut palaset upotettiin WPM-agariin. Kaikki sienikäsittely- ja kontrollinäytteet tehtiin kolmena rinnakkaisena. Jatkokasvatus tapahtui *in vitro* kasvatushuoneessa, niin että purkkien pohjat oli peitetty foliolla. Kasvatushuoneen valon intensiteetti oli $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valojakson pituus 19 h ja lämpötila 22 °C.

3.3 DNA:n eristys, puhdistus ja kloonauus

DNA:t eristettiin Qiagenin DNeasy Plant Mini Kitin ohjeen (Qiagen 2003-2011) mukaan puhtaista koivuklooneista W008 ja Sand 1/48 sekä mykoritsojen (pulkkosienen ja punakärpässien) puhtasviljelmistä. Koivut ja mykoritsat hienonnettiin jauheeksi morttelin avulla nestetyössä. Lisättiin 400 μl AP1-puskuria ja 4 μl RNAasi A:ta (100 mg/ml) ja vorteksoitiin voimakkaasti. Näytteitä inkuboitiin 10 min +65 °C. Inkuboinnin aikana näytteitä sekoitettiin muutaman kerran kääntelemällä putkea ylösalaisin. Lisättiin 130 μl AP2-puskuria, sekoitettiin ja inkuboitiin jäällä 5 min. Näytteet siirrettiin QIAshredder-pylvääseen ja sentrifugoitiin 2 min 13,2 rpm. Läpätullut lysaatti (450 μl) siirrettiin uuteen putkeen ja siihen sekoitettiin pipetoimalla 1,5 x tilavuus AP3/E-puskuria (660 μl). DNeasy mini spin -pylvääseen siirrettiin 650 μl näytettä, sentrifugoitiin 1 min 13,2 rpm. Läpätullut eluaatti heitettiin pois. Toistettiin sentrifugointi lopulla näytteellä ja jälleen heitettiin läpätullut eluaatti pois. DNeasy-pylväs siirrettiin uuteen putkeen ja lisättiin 500 μl AW-puskuria. Sentrifugoitiin 1 min 13,2 rpm ja heitettiin läpätullut eluaatti pois. Lisättiin uudelleen 500 μl AW-puskuria ja sentrifugoitiin 2 min 13,2 rpm, jotta membraani kuivuisi. Pylväs siirrettiin uuteen putkeen ja lisättiin 50 μl esikuumennettua (+65 °C) AE-puskuria suoraan DNeasy-pylvään kalvolle. Inkuboitiin 5 min huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin 1 min 13,2 rpm. Läpätullut eluaatti pakastettiin -20 °C:een.

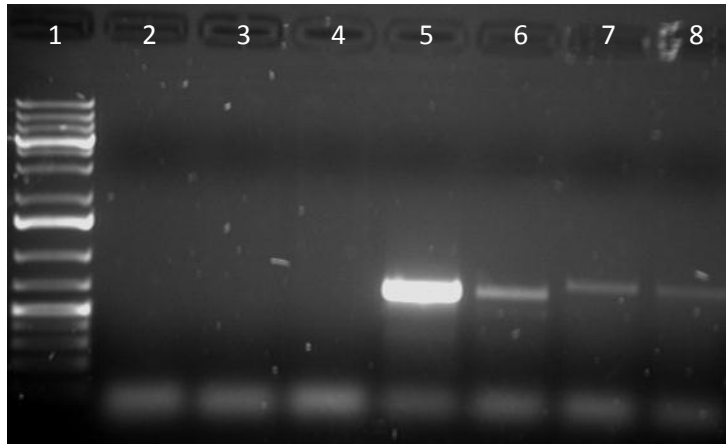
PCR-näytteet (polymeeriketjureaktio) valmistettiin kahtena rinnakkaisena (Taulukko 2). 0-kontrollin tarkoituksena oli varmistaa, että PCR-näytteiden valmistuksessa käytettävät komponentit eivät olleet kontaminoituneet. Alukkeina PCR-reaktiossa käytettiin ITS1- (TTCGTAGGTGAACCTGCGG) ja ITS4- (TCCTCCGCTTATTGATATGC) alukkeita. DNA:n monistamisessa käytettiin PCR:n (PTC-100 Programmable Thermal

Controller) ITS-ohjelmaa (Internal Transcribed Spacer). ITS-ohjelmassa alkudenaturaatio on +95 °C 2 min, minkä jälkeen tulee 30 sykliä. Yhteen sykliin sisältyy denaturaatio +95 °C 30 s, alukkeiden hybridisaatio (kiinnittyminen) +60 °C 30 s ja DNA:n synteesi +72 °C 30 s. Sykliä jälkeen on loppupidennys +72 °C 10 min.

Taulukko 2. PCR-näytteet: 0-kontrolli, puhtaiden koivukloonien W008 ja Sand 1/48 DNA-näytteet (5 µl), mykoriesojen (punakärpäsieni ja pulkkosieni) puhtasviljelmien DNA-näytteet, joita lisättiin joko 1 µl tai 5 µl. PCR-reaktioseos: Dream TaqGreen 2x master mix, aluke ITS1 (20 pmol/µl), aluke ITS4 (20 pmol/µl), vesi ja puhtaista koivuklooneista ja mykoriesojen puhtasviljelmistä eristetty DNA.

	0- kontrolli	Koivu W008	Koivu Sand 1/48	Puna- kärpäs- sieni 1 µl	Puna- kärpäs- sieni 5 µl	Pulkko- sieni 1 µl	Pulkko- sieni 5 µl
Dream TaqGreen	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
aluke ITS1	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
aluke ITS4	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
vesi	11,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	10,5 µl	6,5 µl	10,5 µl	6,5 µl
DNA	-	5 µl	5 µl	1 µl	5 µl	1 µl	5 µl

Geelielektroforeesia varten valmistettiin 1 % agarosigeeli TAE-puskuriin, johon lisättiin 50 µl 1 mg/ml etidiumbromidia. Geelielektroforeesissa käytetty molekyyli-markkeri oli GeneRuler 1 kB DNA ladder Plus (MBI Fermentas). Geelielektroforeesissa ajettiin vain toinen rinnakkaisista näytteistä 85 V (BioRad Power Pac 200). Geeli kuvannettiin UV-valossa Biometra BioDocAnalyze -laitteella (Kuva 1).



Kuva 1. Agarosigeeli, jossa puhtaiden koivukloonien ja mykoritsojen puhtasviljelmien DNA-näytteiden PCR-tuotteet. Kaivo 1 markkeri (GeneRuler 1 kB DNA ladder Plus), kaivo 2 0-kontrolli, kaivo 3 koivu W008, kaivo 4 koivu Sand 1/48, kaivo 5 punakärpässieni AM-kanta (PCR-reaktiossa DNA-näytettä 1 µl), kaivo 6 punakärpässieni AM-kanta (PCR-reaktiossa DNA-näytettä 5 µl), kaivo 7 pulkkosieni PI-kanta (PCR-reaktiossa DNA-näytettä 1 µl) ja kaivo 8 pulkkosieni PI-kanta (PCR-reaktiossa DNA-näytettä 5 µl).

PCR-tuotteen puhdistusta varten leikattiin agarosigeeliltä palat näytteistä punakärpäsieni AM-kanta (kaivo 5, DNA-näytettä PCR-reaktiossa 1 µl), pulkkosieni PI-kanta (kaivo 7, DNA-näytettä PCR-reaktiossa 1 µl) ja pulkkosieni PI-kanta (kaivo 8, DNA-näytettä PCR-reaktiossa 5 µl). Pulkkosieni-näytteiden palat yhdistettiin yhdeksi näytteeksi. Punakärpässieni AM-näytteen geelipala painoi 33 mg ja pulkkosienien PI-näytteiden geelipalojen yhteispaino oli 200 mg. Valittujen näytteiden PCR-tuotteet puhdistettiin GeneJET gel extraction kitillä (Fermentas) (Thermo Fisher Scientific Inc. and all its subsidiaries 2011a). Punakärpässieni AM-geelipalan päälle lisättiin 100 µl binding puskuria ja pulkkosieni PI-geelipalojen päällä 200 µl. Näytteitä inkuboitiin 60 °C:ssa, 10 min, välillä sekoittaen. Seos siirrettiin GeneJET puhdistuspylvääseen ja sentrifugoitiin 13,2 rpm, 1 min. Läpitullut lysaatti heitettiin pois. Lisättiin 700 µl pesupuskuria pylvääseen ja sentrifugoitiin 13,2 rpm, 1 min. Läpitullut lysaatti heitettiin pois. GeneJET pylväs sentrifugoitiin tyhjänä 13,2 rpm, 1 min. Kolonni siirrettiin uuteen 1,5 ml:n eppendorf-putkeen ja lisättiin 20 µl eluutiopuskuria ja sentrifugoitiin 13,2 rpm, 1 min. Puhdistetut PCR-tuotteet otettiin talteen.

Puhdistettujen PCR-tuotteiden kloonauksessa käytettiin CloneJET™ PCR Cloning kitin ohjeiden (Fermentas) (Thermo Fisher Scientific Inc. and all its subsidiaries 2011b) mukaista Sticky-End -kloonausta. Valmistettiin seos kloonattavien PCR-fragmenttien päiden tasoittamista varten ns. bluntaus-reaktioon (10 µl 2x reaktiopuskuria, 2 µl puhdistettua PCR-tuotetta, 5 µl vettä ja 1 µl DNA blunting-entsyymia). Seos vorteksoitiin lyhyesti ja sentrifugoitiin 5 s. Seosta inkuboitiin +70 °C, 5 min ja jäädytettiin jäällä. Ligaatiota varten seokseen lisättiin 1 µl pJET1.2/blunt cloning vektoria (50 ng/µl) ja 1 µl T4 DNA ligaasia (5 U/µl). Vorteksoitiin lyhyesti ja sentrifugoitiin 5 s. Ligaatioseosta inkuboitiin +22 °C, 30 min.

3.4 Transformaatio ja miniprepi

Kompetentit solut (*E. coli* DH5a) sulatettiin ja siirrettiin jäälle. 5 µl ligaatioseosta lisättiin kompetentteihin soluihin. Seosta pidettiin jäällä 5 min. Tämän jälkeen seosta pidettiin +42 °C vesihauteessa, 1 min. Sitten seos siirrettiin jäälle 1 min:ksi. Lisättiin 1 ml 1x LB-mediumia. Inkuboitiin sekoittajassa +37 °C, 40 min. Solut spinnattiin pohjaan ja päältä poistettiin 800 µl mediumia. Solut suspensoitiin putkeen jätettyyn 200 µl:aan LB-mediumia. Solut maljattiin LB-maljoille, joissa oli ampisilliinia 100 µg/ml. Toisille LB-maljoille maljattiin 50 µl soluja ja toisille 150 µl. Bakteereita kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa maljoilla. Seuraavana päivänä 50 µl:n maljoilla pesäkkeitä oli noin 10 kappaletta. 150 µl:n maljoilla pesäkkeitä oli reilummin. Kaikilta neljältä maljalta otettiin yksi pesäke kasvamaan 5 ml:aan LB-mediumia, jossa oli 100 µl/ml ampisilliinia. Pesäkkeitä kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa.

Sekvensointia varten valmistettiin miniprepi transformoiduista soluista. Solut sekoitettiin 250 µl:aan resuspensio-liuosta. Lisättiin 250 µl lyysaus-liuosta ja sekoitettiin hyvin. Tämän jälkeen lisättiin 350 µl neutralointiliuosta ja sekoitettiin välittömästi hyvin ja sentrifugoitiin 5 min. Supernatantti siirrettiin GeneJET spin -pylvääseen. Sentrifugoitiin 1 min ja heitettiin pois läpitullut lysaatti. Lisättiin 500 µl pesuliuosta, sentrifugoitiin 30-60 s ja heitettiin läpitullut lysaatti pois. Pesu toistettiin ja tyhjä spinpylväs sentrifugoitiin 1 min. Lisättiin 50 µl eluutiopuskuria pylvääseen. Inkuboitiin 2 min huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin 2 min. Puhdistetut plasmidi-

DNA:t otettiin talteen. Kummastakin mykoritsakannasta lähetettiin yksi plasmidi-DNA näyte sekvensoitavaksi. Saatuja ITS-sekvenssejä vertailtiin NCBI:n Blast-ohjelmalla tietokannassa oleviin sekvensseihin.

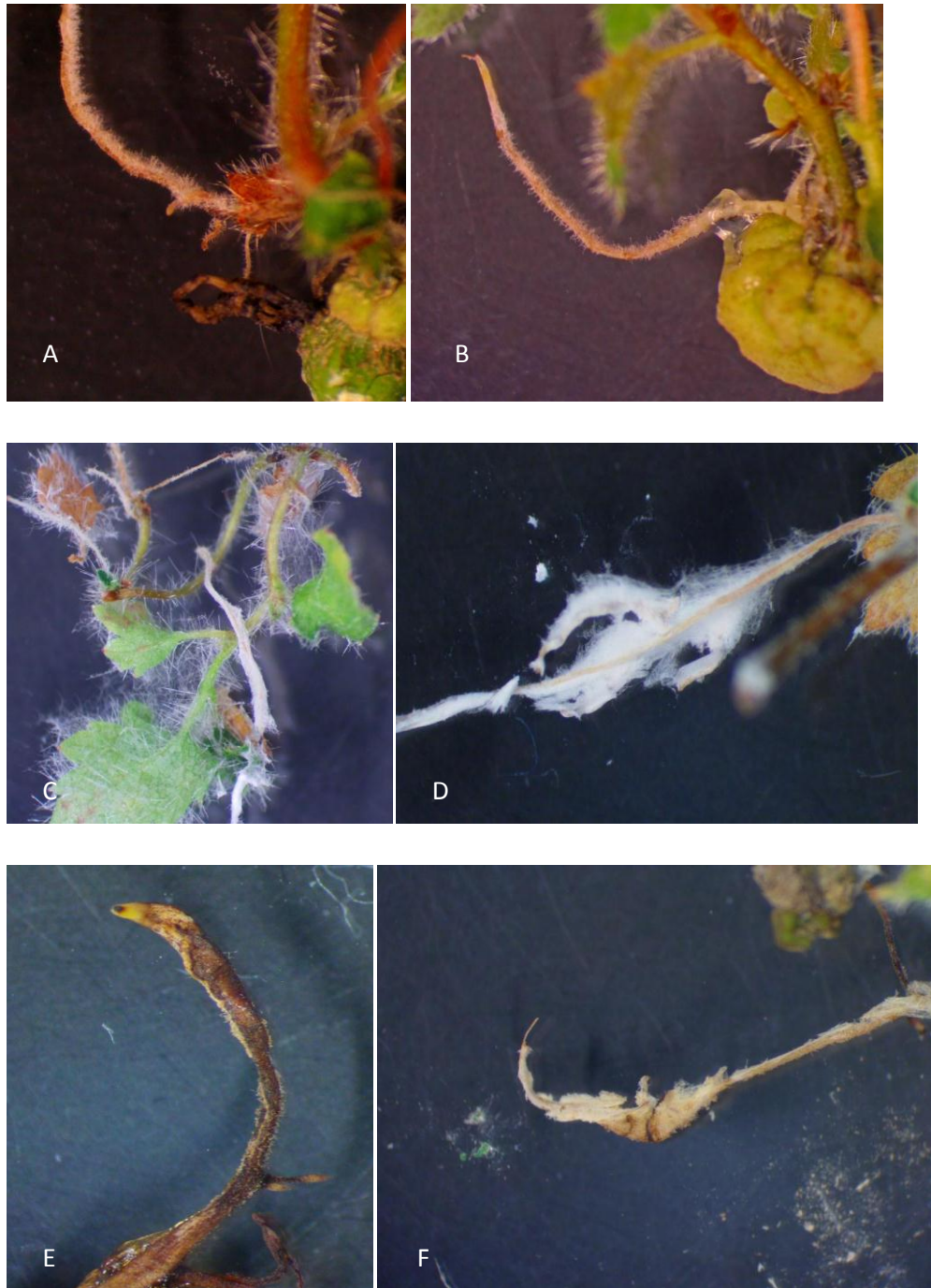
3.5 Aineiston tilastollinen testaus

Tässä työssä tutkittiin koivujen genotyyppien (W008 ja Sand 1/48) vaikutusta koivunversojen ja juurien kasvuun, sienikäsittelyiden (kontrolli, AM ja PI) vaikutusta koivunversojen ja juurien kasvuun sekä koivujen genotyyppien ja sienikäsittelyjen yhteisvaikutusta koivunversojen ja juurien kasvuun. Koivunversoista ja juurista mitattavia ominaisuuksia olivat lehtien lukumäärä, verson pituus, kuivapaino, juurien lukumäärä, juurien pituus, lyhytjuurien lukumäärä ja mykoritsan infektoitumisaste. Mittaukset tehtiin 5-6 purkista/sienikäsittely/koivukloonin. Testaus suoritettiin SPSS 14.0 -ohjelmalla käyttäen kaksi-suuntaista monimuuttuja-variانسianalyysiä (multivariate anova). Malli oli kaksisuuntainen, koska koivun genotyyppiä ja sienikäsittelyä käytettiin kiinteinä faktoreina. Lisäksi verrattiin kahta eri sienikäsittelyä (PI ja AM) post hoc testillä. Molemmissa testauksissa erot olivat tilastollisesti merkitseviä kun $p < 0,05$ ja tilastollisesti marginaalisesti merkitseviä kun $p < 0,1$.

4 TULOKSET

4.1 Sienikantojen puhtaus ja infektiostaaste koivuissa

AM-mykoritsakannasta saatu ITS-sekvenssi vastaa NCBI:n tietokannassa olevaa *Amanita muscaria* –sienen sekvenssiä. PI-mykoritsakannasta ei saatu ITS-sekvenssiä. PI-mykoritsakannasta saatu sekvenssi on kokonaan pJET1.2 kloonauksvektorin sekvenssi. Inokulaatio onnistui molemmilla sienikannoilla (kuva 2 A-F). *Amanita muscaria* –sienellä infektoitui 67 % koivuista, kun taas *Paxillus involutus* –sienellä infektoitui 33 % koivuista. Inokulaatio onnistui selvästi paremmin *Amanita muscaria* –sienellä. Inokuloimattomissa kontrollinäytteissä ei havaittu lainkaan sienirihmastoja ja juurissa oli runsaasti juurikarvoja.



Kuva 2 A-F. A. Inokuloimattoman (kontrollikäsitelly) W008-koivun juuret. B. Inokuloimattoman (kontrollikäsitelly) Sand 1/48-koivun juuret. C. W008 juuret inokuloitu *Amanita muscaria* -sienellä. D. Sand 1/48 juuret inokuloitu *Amanita muscaria* -sienellä. E. W008 juuret inokuloitu *Paxillus involutus* -sienellä. F. Sand 1/48 juuret inokuloitu *Paxillus involutus* -sienellä. Inokuloimattomissa juurissa näkyy runsaasti juurikarvoja. *Amanita muscaria* -sienellä inokuloituissa juurissa näkyy paksu kerros valkoista sienirihmastoaa. *Paxillus involutus* -sienellä inokuloituissa juurissa näkyy hieman vähemmän vaaleaa sienirihmastoaa. Kuvat: Anne Kasurinen

4.2 Koivun genotyyppien ja sienikäsittelyjen vaikutukset koivujen kasvuun

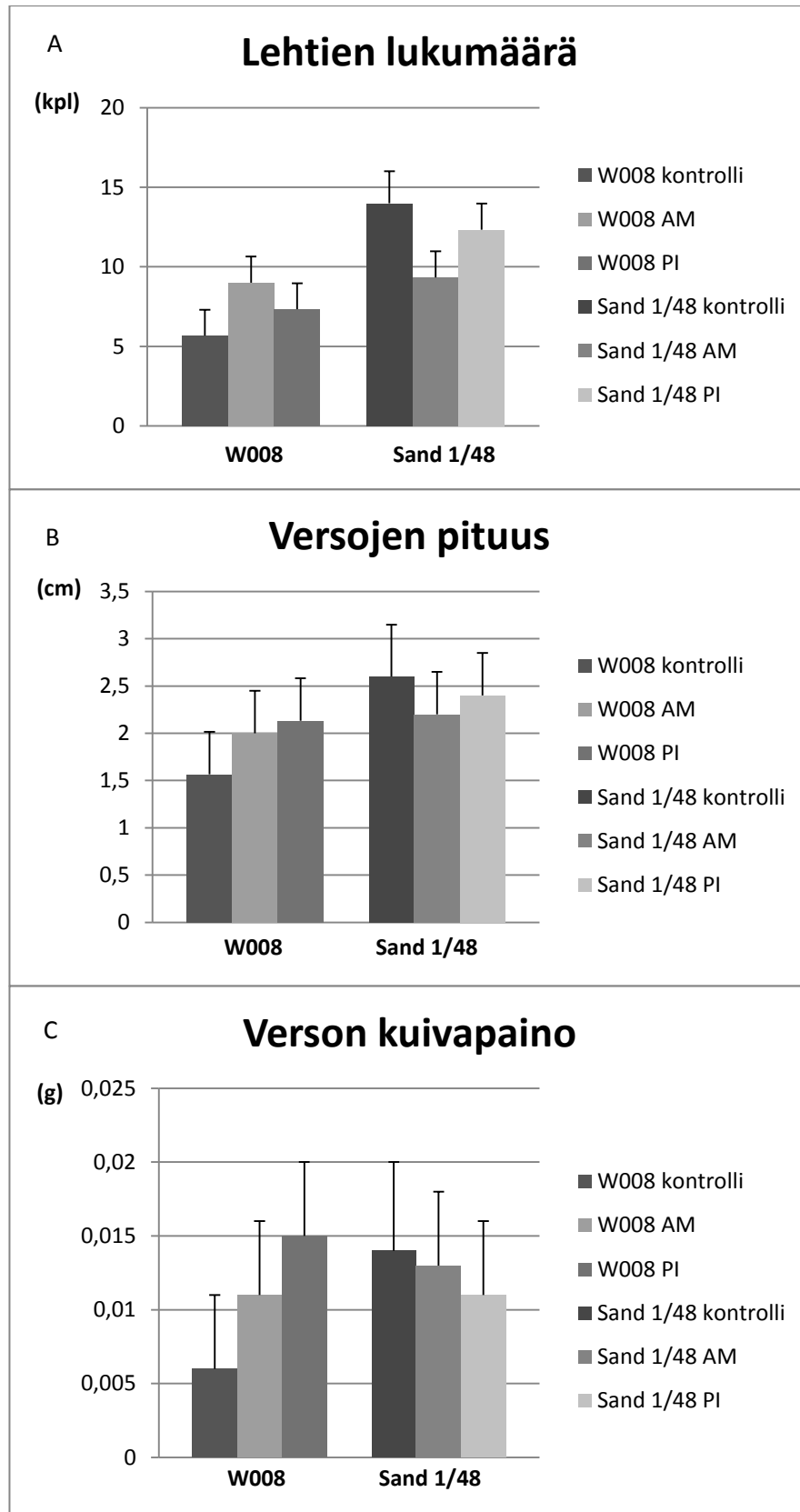
Koivujen genotyyppien (W008 ja Sand 1/48) ja sienikäsittelyiden (kontrolli, AM ja PI) välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää yhteisvaikutusta koivunversojen ja juurten kasvuun (Taulukko 3). Koivujen genotyypeillä (W008 ja Sand 1/48) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus lehtien lukumäärään ($p=0,007$) ja tilastollisesti marginaalisesti merkitsevä vaikutus juurien lukumäärään ($p=0,09$) (Taulukko 3). Sand 1/48 koivukloonin erosi W008 koivukloonista siten, että Sand 1/48 koivukloonilla oli selvästi enemmän lehtiä (12 kpl) kuin W008 koivukloonilla (7 kpl) kokeen päättyessä (Kuva 3A). Sienikäsittelyillä (kontrolli, AM ja PI) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus juurien lukumäärään ($p=0,006$). W008 koivukloonilla primäärijuurten määrä (3 kpl) oli suurempi kuin Sand 1/48 koivukloonilla (2 kpl) (Kuva 4A). Sienikäsittelyt lisäsivät primäärijuurten lukumäärää kummallakin koivukloonilla verrattuna kontrolleihin (Taulukko 3), mutta näiden kahden eri sienikäsittelyn (AM ja PI) välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa primäärijuurten määrässä (Taulukko 4) eli kumpikin sieni vaikutti samalla tavalla kloonien primäärijuurten muodostumiseen. Muissa mitatuissa kasvumuuttujissa ei nähty tilastollisesti merkitseviä kloonieroja tai sienikäsittelyn vaikutuksia (Taulukko 3 ja 4). Sienistä AM näytti infektoivan erityisesti Sand 1/48 kloonin paremmin verrattuna PI, mutta W008 kummatkin sienet infektoivat juuria yhtäläisesti. Sienikäsittelyjen keskinäinen vertailu ei kuitenkaan näyttänyt tilastollisesti merkitseviä eroja juurten infektoitumisasteissa (Taulukko 4 ja Kuva 4D).

Taulukko 3. Kaksisuuntaisen MANOVAn tulokset (p-arvot) eri sienikäsittelyiden (kontrolli, AM ja PI) ja koivugenotyyppien (W008 ja Sand 1/48) mukaan. Tulokset ovat tilastollisesti merkitseviä, kun $p < 0,05$ ja tilastollisesti marginaalisesti merkitseviä, kun $p < 0,1$.

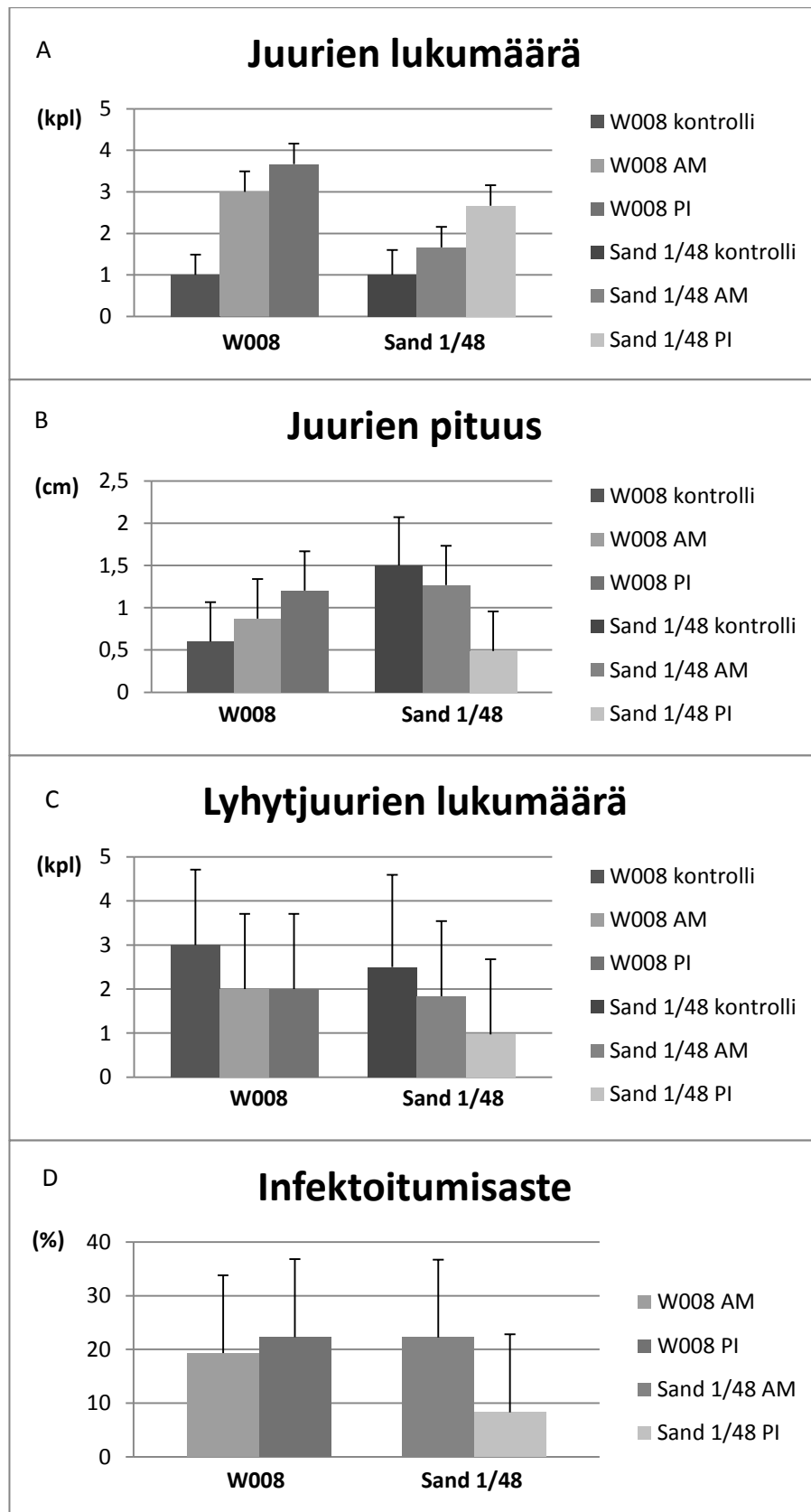
	klooni	sieni	klooni × sieni
Lehti kpl	0,007	0,9	0,11
Verson pituus	0,216	0,908	0,643
Verson kuivapaino	0,644	0,794	0,49
Juuri kpl	0,09	0,006	0,45
Juurien pituus	0,635	0,873	0,277
Lyhytjuuri kpl	0,704	0,785	0,968
Infektoitumisaste	0,772	0,413	0,832

Taulukko 4. Post hoc –testin tulokset (p-arvot) sienikäsittelyjen (AM ja PI) mukaan. Tulokset ovat tilastollisesti merkitseviä, kun $p < 0,05$ ja tilastollisesti marginaalisesti merkitseviä, kun $p < 0,1$.

	AM×PI
Lehti kpl	0,89
Verson pituus	0,906
Verson kuivapaino	0,93
Juuri kpl	0,203
Juurien pituus	0,851
Lyhytjuuri kpl	0,955
Infektoitumisaste	0,9



Kuva 3 A-C. Koivujen genotyyppien (W008 ja Sand 1/48) ja sienikäsittelyjen (kontrolli, AM ja PI) yhteisvaikutus lehtien lukumäärään, versojen pituuteen ja verson kuivapainoon. Kuvissa keskiarvot+keskihajonta käsittelyittäin (n=5-6/sienikäsittely)



Kuva 4 A-D. Koivujen genotyyppien (W008 ja Sand 1/48) ja sienikäsittelyjen (kontrolli, AM ja PI) yhteisvaikutus juurien lukumäärään, juurien pituuteen, lyhytjuurien lukumäärään ja infektoitumisasteeseen. Kuvissa keskiarvot+keskihajonta käsittelyittäin (n=5-6/sienikäsittely paitsi kuvassa 4D, jossa n=6/AM ja PI).

5 TULOSTEN POHDINTA

Tutkimuksessa onnistuttiin saamaan AM-mykoritsakannasta ITS-sekvenssi, joka vastasi tietokannoissa olevia *Amanita muscaria* -sienen sekvenssejä. Tämän tiedon avulla on mahdollista tunnistaa mykoritsa kasvinäytteistä. PI-mykoritsakannasta ei saatu ITS-sekvenssiä, vaan saatu sekvenssi oli kokonaan pJET1.2 kloonausvektorin sekvenssi. Ongelma on todennäköisesti ollut kloonauksessa ja ITS-DNA:n vähäisessä määrässä ligaatioreaktiossa. Jo agarosigeelillä oli havaittavissa, että punakärpässienestä oli saatu eristettyä ja monistettua DNA:ta enemmän kuin pulkkosienestä. Pulkkosienen DNA:ta on siis ollut kokoajan vähemmän, ja siksi haluttua ITS-sekvenssiä ei saatu. PCR-menetelmä ei toimi silloin, kun kasvinäytteestä ei saada monistettua tarpeeksi ITS-DNA:ta. Mykoritsainokulaatio pystytään varmistamaan myös mikroskopoimalla juurenkärjen poikkileikkauksesta vaippa ja Hartigin verkko (Turjaman ym. 2011).

Mykoritsainokulaatio onnistui molemmilla sienikannoilla (punakärpässieni ja pulkkosieni). Punakärpässienellä inokulaatioprosentti (67 %) oli kuitenkin selvästi parempi kuin pulkkosienellä (33 %). Kumpikin mykoritsa muodosti lajilleen tyypillisen sienirihmaston koivun juurien ympärille. Vaikka koivujen genotyyppien (W008 ja Sand 1/48) ja sienikäsittelyiden (kontrolli, AM ja PI) välille ei saatu tilastollisesti merkitsevää yhteisvaikutusta koivunversojen ja juurten kasvuun, saatiin kuitenkin selville, että koivujen genotyypeillä (W008 ja Sand 1/48) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus lehtien lukumäärään ja tilastollisesti marginaalisesti merkitsevä vaikutus juurien lukumäärään. Lisäksi saatiin selville, että sienikäsittelyillä (kontrolli, AM ja PI) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus juurien lukumäärään. Turjaman ym. (2011) havaitsivat tutkimuksessaan, että purkkeihin istutetuista *Shorea balangeran* -puun taimista 59-67 % inokuloitui ektomykoritsoilla (*Boletus* sp., *Scleroderma* sp. ja *Strobilomyces* sp.). Lisäksi he havaitsivat, että ektomykoritsoilla (*Scleroderma* sp. ja *Strobilomyces* sp.) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus ($p < 0,05$) *Shorea balangeran* verson pituuteen ja tuore- ja kuivapainoon. Myös ektomykoritsa *Boletus* sp. vaikutti tilastollisesti merkitsevästi verson pituuteen. Tulosten mukaan puiden inokuloitumisesta ektomykoritsoilla voisi olla hyötyä uudelleenmetsittämiseen. Alexanderin (1981) tutkimuksessa kangasrouskulla (*Lactarius rufus*) inokuloitui 48-68 % kasvatetuista sitkankuusista (*Picea sitchensis*) (Alexander 1981, Smith & Read 2008). Tutkimuksessa

havaittiin myös, että kangasrouskulla oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus ($p < 0,05$) verson pituuteen, verson ja juuren kuivapainoon ja kokonaiskuivapainoon, lateraalisten juurien pituuteen sekä juurien kärkien lukumäärään.

Tutkimuksessa havaittiin, että *Amanita muscaria* ja *Paxillus involutus* -mykoritsoilla inokuloituilla Sand 1/48 -koivuilla verson pituus oli lyhyempi kuin kontrolleina käytetyillä koivuilla. Myös mykoritsoilla inokuloitujen Sand 1/48 -koivujen kuivapaino ja lehtien lukumäärä oli alhaisempi kuin kontrolleina käytetyillä koivuilla. Syynä Sand 1/48 -koivukloonien versojen kasvun hidastumiseen voi olla mykoritsasienien aiheuttama hiilen menetys (Loewe ym. 2000).

Lähteet

- Ahuja, M.R., 1993. Micropropagation a la carte. Teoksessa: M.R. Ahuja, Micropropagation of woody plants, s. 3-10. 536 s. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Alexander I.J., 1981. The *Picea sitchensis*+*Lactarius rufus* mycorrhizal association and its effects on seedling growth and development. Trans. Br. Mycol. Soc. 76: 417-423
- Anderson Anne J., 1992. The influence of the plant root on mycorrhizal formation. Teoksessa: Michael F. Allen, Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process, s. 37-64. 534 s. Chapman & Hall, United States of America.
- Brundrett Mark, 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biol. Rev. 79: 473-495.
- Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.C., Chu C.Y. & Bi F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin. 18: 659–668
- Fischer A., Lindner M., Abs C., Lasch P., 2002. Vegetation dynamics in central European forest ecosystems (near-natural as well as managed) after storm events. Folia Geobotanica 37: 17-32
- Grellier B., Letouze R. & Strullu D.G., 1984. Micropropagation of birch and mycorrhizal formation in vitro. New Phytol. 97: 591-599
- Haapala Tapani & Niskanen Anna-Maija, 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. 1.painos. 93 s. VAPK-kustannus, Helsinki.
- Honda Hiroyuki & Kobayashi Takeshi, 2004. Large-scale micropropagation system of plant cells. Adv Biochem Eng Biotechnol 91: 105- 134
- Hynynen J., Niemistö P., Viherä-Aarnio A., Brunner A., Hein S., Velling P., 2010. Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth and *Betula pubescens* Ehrh.) in northern Europe. Forestry, Vol 83: 103-119

- Häggman H., Sutela S., Welander M., 2007. Micropropagation of *Betula pendula* Roth including genetically modified material. Teoksessa: S.M. Jain & H. Häggman, Protocols for micropropagation of woody trees and fruits, s. 153-162. 559 s. Springer, Netherlands.
- Jones O.P., Welander Margareta, Waller Barbara J., Ridout M.S., 1996. Micropropagation of adult birch trees: production and field performance. *Tree Physiol.* 16: 521-525
- Kopponen P., Utriainen M., Lukkari K., Suntioinen S., Kärenlampi L., Kärenlampi S., 2001. Clonal differences in copper and zinc tolerance of birch in metal-supplemented soils. *Environ Pollut.* 112: 89-97
- Lloyd, G. & McCown, B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Propagators' Soc.* 30:421–427
- Loewe Anja, Einig Werner, Shi Lanbo, Dizengremel Pierre, Hampp Rüdiger, 2000. Mycorrhiza formation and elevated CO₂ both increase the capacity for sucrose synthesis in source leaves of spruce and aspen. *New Phytol.* 145: 565-574
- Mikola P., 1954. Experiments on the rate of decomposition of forest litter. *Commun. Inst. For. Fenn.* 43: 1-50.
- Mikola P., 1985. The Effect of Tree Species on the Biological Properties of Forest Soil. *Natursvårdsverket. Rapport 3017, Statens naturvårdverk , Solna, Sweden.*
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM, 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. Teoksessa: M. F. Allen, *Mycorrhizal functioning.* s.357-423. Chapman & Hall, New York.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Petersen R. Larry, Massicotte Hugues B., Melville Lewis H., 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology.* 1.painos. 196 s. CABI Publishing, Kanada.

- Priha O., 1999. Microbial Activities in Soils Under Scots Pine, Norway Spruce and Silver Birch. Academic Dissertation, University of Helsinki. Finnish Forest Research Institute. Research papers 731, s. 1-50.
- Qiagen, 2003-2011. DNeasy Plant Mini Kit. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasyplantsystem/dneasyplantminikit.aspx#Tabs=t1>. Viitattu 18.12.2011.
- Simola L.K., 1985. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula f. purpurea*. *Scientia hortic.* 26: 77-85.
- Smith Sally E. & Read David, 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3.painos. 787 s. Elsevier Ltd, Great Britain.
- Särkilahti Eliisa, 1988. Micropropagation of a mature colchicine-polyploid and irradiation-mutant of *Betula pendula* Roth. *Tree Physiol.* 4: 173-179
- Taiz Lincoln & Zeiger Eduardo, 2010. Plant physiology. 5.painos. 782 s. Sinauer Associates, Inc.,Sunderland, Massachusetts.
- Thermo Fisher Scientific Inc. and all its subsidiaries, 2011b. CloneJET™ PCR Cloning Kit. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.fermentas.com/en/products/all/pcr-qpcr-rt-pcr/pcr-cloning/k123-clonejet-pcr-cloning>. Viitattu 18.12.2011.
- Thermo Fisher Scientific Inc. and all its subsidiaries, 2011a. GeneJET™ Gel Extraction Kit. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.fermentas.com/en/products/all/nucleic-acid-purification/kits/k069-genejet-gel-extraction>. Viitattu 18.12.2011.
- Turjaman Maman, Santoso Erdy, Susanto Agung, Gaman Sampang, Limin Suwido H., Tamai Yutaka, Osaki Mitsuru, Tawaraya Keitaro, 2011. Ectomycorrhizal fungi promote growth of *Shorea balangeran* in degraded peat swamp forests. *Wetlands Ecol Manage* 19:331–339
- Welander, M., 1988. Biochemical and anatomical studies of birch (*Betula pendula* Roth) buds exposed to different climatic conditions in relation to growth

in vitro. Teoksessa: J.W. Hanover & D.E. Keathley, Genetic manipulation of woody plants. s.79-99. Plenum Publishing Corporation.

Welander Margareta, 1993. Micropropagation of birch. Teoksessa: M.R. Ahuja, Micropropagation of woody plants, s. 223-246. 536 s. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.