

Kuusen lahottajasieniyhteisön tutkiminen DNA-menetelmillä

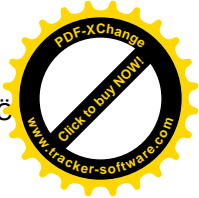
Matias Häyrynen

Opinnäytetyö
Kesäkuu 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma
Tekniikan ja liikenteen ala



JYVÄSKYLÄN AMMATTIKORKEAKOULU
JAMK UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



Tekijä(t) Häyrynen, Matias	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 1.6.2011
	Sivumäärä 51 + 2	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi Kuusen lahottajasieniyhteisön tutkiminen DNA-menetelmillä		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) Värtö-Niemi Merja		
Toimeksiantaja(t) Metsäntutkimuslaitos Rajala, Tiina, FT		
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin metsäntutkimuslaitoksella Vantaan toimipisteessä metsäpatologian osastolla. Tarkoituksena oli tutkia Padasjoen kuntaan kuuluvan Vesijaon luonnonsuojelualueen lahottajasienilajien monimuotoisuuden muutosta kaatuneiden kuusirunkojen lahotessa, sekä selvittää lahottajasienien lajit molekyylibiologisilla menetelmillä.</p> <p>Aluksi näytekiekoista poratusta puupurusta eristettiin DNA käyttäen kaupallista DNA-eristyskittiä. Sienien DNA:ta monistettiin jatkotutkimuksia varten PCR- menetelmällä ja sieniyhteisöjä voitiin tutkia denaturoivalla gradientti geeli elektroforeesilla (DGGE). DGGE:stä saatujen tulosten perusteella voitiin valita parhaiten lajiston monimuotoisuutta kuvaavat lajit. Näiden lajien DNA-sekvenssi selvitettiin sekvensoimalla, joka tapahtui yrityksessä nimeltä Macrogen. Sekvensoitujen lajien lajinimet määritettiin vertaamalla näytteiden sekvenssejä nukleotidisekvenssitietokantaan (NCBI). Näytekiekoista määritettiin myös muita muuttujia, kuten puun tiheys ja kosteus, ja niiden vaikutusta lajiston monimuotoisuuteen tarkasteltiin. Moniulotteista skaalausta käytettiin havainnollistamaan sienilajiston samankaltaisuutta lahoamisasteeltaan samanlaisissa puun rungoissa. Apuna oli käytössä tilastotiedeohjelma R.</p> <p>Lajiston monimuotoisuus saatiin selville, sekä tiheyden ja kosteuden vaikutus lajidiiversiteettiin. Lahoasteen kasvaessa lahopuiden tiheys pieneni sekä kosteusprosentti suureni. Samalla sienilajien lukumäärä kasvoi. Tietyillä lahoasteilla olevat näytteet näyttivät ryhmittyneen lähemmäs toisiaan moniulotteinen skaalaus -kuvaajassa. Tulokset tukivat hypoteesia, että lajisto muuttuu ja monipuolistuu lahosukcession edetessä.</p>		
Avainsanat (asiasanat) Kuusi, Lahottajasieni, DNA, PCR, DGGE		
Muut tiedot		

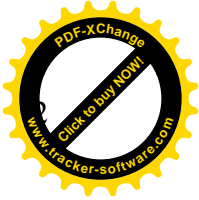


Author(s) Häyrynen, Matias	Type of publication Bachelor´s thesis	Date 1.6.2011
	Pages 51 + 2	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (X)
Title Researching the dead wood fungi on Norway spruce using the DNA methods		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) Värtö-Niemi Merja		
Assigned by Finnish Forest Research Institute Rajala, Tiina, PhD		
<p>This thesis has done in Finnish Forest Research Institute Vantaa forest pathology department. The purpose was to investigate the decayed fungi diversity of Vesijako nature park and to identify decay fungi species of molecular biological methods.</p> <p>First the saw dust was drilled from the wood samples. DNA was isolated using a commercial DNA-isolation kit. Fungi DNA was amplified using further analysis by PCR and fungal communities could be analysing with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). From the he results that DGGE gave could be chosen the species that describe the species diversity to best. The DNA-sequence from these species analysed. Sequence analyses made company Macrogen. Sequenced species was named by comparing the sequences of samples to the sequence database (NCBI). From the samples were also determined by other variables, example wood density and moisture, and the samples impact to the species diversity. Multidimensional scaling was used to illustrate the similarity between the state of decay of the speacis. Available was statistics program R.</p> <p>Species diversity was settle and the density and humidity impact to the diversity. When the density of trees decreased the state of decay was increased. The moisture of the trees was increased when the state of decay was increased.. In the same time fungal species increased in number. In the multi dimensional scaling graph certain levels of decay in the samples seemed to be clustered closer together. The results supported the hypothesis that the species will change and versatile when the succession of the decay proceeds.</p>		
Keywords Norway spruce, Decayed fungi, DNA, PCR, DGGE		
Miscellaneous		



SISÄLTÖ

1 LAHOPUUN MONIMUOTOINEN SIENIYHTEISÖ	3
2 METSÄN PIENET ELÄJÄT	5
2.1 Metsän monimuotoisuus (diversiteetti)	5
2.2 Mikrobien vaikutus metsikköön	7
2.3 Sienet eliöinä.....	7
2.4 Lahoaminen ja lahoppuun merkitys.....	8
3 LAHOTTAJAT	10
3.1 Lahottajasienien toiminta ja ryhmittely.....	10
3.2 Lahottajasienien elinolovaatimukset	13
3.3 Lahottajasienilajeja	14
3.4 Lahottajasienten levintä.....	17
4 METSÄN TAUDIT	18
4.1 Taudinaiheuttajat	18
5 SIENTEN MONIMUOTOISUUDEN TUTKIMINEN.....	19
5.1 DNA-Eristys	20
5.2 Polymeraasiketjureaktio	21
5.3 Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi (DGGE)	26
6 TYÖN SUORITUS	26
6.1 Esikäsittely.....	26
6.2 Tiheyden ja kosteuden määrittäminen	31
6.3 DNA- eristys	32
6.4 Näytteiden monistus	35
6.5 Monistuksen tarkistus elektroforeesilla	37
6.6 Näytteiden denaturoiva gradienttigelielektroforeesi	37
7 TULOKSET	42
7.1 Puun laadun muutos lahosuknessiossa.....	42
7.2 Sieniyhteisörakenteen muutos lahosuknessiossa	43
7.3 Sienilajisto lahoppuussa	45
8 PÄÄTELMÄT	46
LÄHTEET	49
LIITTEET	52
Liite 1. Sekvensoitavat näytteet.....	52
Liite 2. Kuva DGGE- geelistä sekvensointia varten puhdistetuista näytteistä.	53

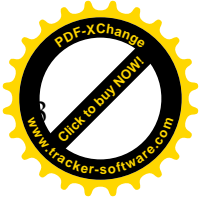


KUVIOT

KUVIO 1. Polymeraasiketjureaktion kulku	24
KUVIO 2. Kopioitava DNA-alue	25
KUVIO 3. Piirros koealasta	28
KUVIO 4. Vesijaon luonnontilassa oleva koeala	29
KUVIO 5. Näytekiekon poraussuunnat 1 ja 2	30
KUVIO 6. Osa lahopuunäytteistä	30
KUVIO 7. Lahopuukiekosta sahattu tiheysnäyte punnituksessa ...	31
KUVIO 8. Lahopuiden tiheys lahoasteen funktiona	42
KUVIO 9. Lahopuiden kosteus lahoasteen funktiona	42
KUVIO 10. DGGE-geelikuva	43
KUVIO 11. Lahopuiden NMDS- sovitus	44
KUVIO 12. Sieniyhteisörakenteen muutos lahosuknessiossa (keskiarvo±keskihajonta SD)	44

TAULUKOT

TAULUKKO 1. PCR-alafaasiseoksen ainemäärät yhtä reaktiota kohden	36
TAULUKKO 2. PCR-yläfaasiseoksen ainemäärät yhtä reaktiota kohden	36
TAULUKKO 3. Työssä käytetty PCR-ohjelma	36
TAULUKKO 4. DGGE liuosten (0- % ja 100- %) aineelliset koostumukset	37
TAULUKKO 5. Gradienttigelin aineelliset koostumukset	38
TAULUKKO 6. PCR-tuotteen puhdistus vaiheet	41
TAULUKKO 7. Lahottajasiementen latinankieliset sekä suomenkieliset lajinimet	45



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin metsäntutkimuslaitoksella Vantaan toimipisteessä vuoden 2010 tammikuusta kesäkuulle. Työn tekeminen oli erittäin mielekästä ja tahdon erityisesti kiittää työn ohjaajaani FT Tiina Rajalaa sekä FT Raisa Mäkipäätä erinomaisesta ohjauksesta sekä neuvoista. Tahdon myös kiittää muita laitoksen tutkijoita. FT Mikko Peltoniemeä ja FT Leena Hambergia avustuksesta monimuuttujamenetelmänalyysihin, sekä koko muuta metsäpatologian osaston henkilökuntaa loistavasta porukkahengestä, sekä yhteisistä hetkistä.

Vantaalla 30.5.2011

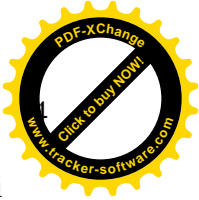
Matias Häyrynen

1 LAHOPUUN MONIMUOTOINEN SIENIYHTEISÖ

Puun lahoaminen luonnossa on metsäekosysteemin toiminnan kannalta välttämätöntä, koska siinä vapautuu kuolleeseen puumateriaaliin sitoutuneita ravinteita sekä hiiltä organismien uudelleen käytettäväksi.

Lahoaminen on merkki metsien hyvinvoinnin tasosta, mutta lahoaminen aiheuttaa myös paljon taloudellista vahinkoa sekä metsissä että rakennuksissa. Lahottajasierien myönteiset vaikutukset ovat kuitenkin vahingollisia vaikutuksia suuremmat. Ne hajottavat esimerkiksi maahan pudonneen oksan tai kaatuneen puun vaikeasti sulavia molekyylejä muille maaperän mikrobeille kelpaaviksi yhdisteiksi, mikä mahdollistaa metsäekosysteemissä ravinteiden kierron. Lahottajasierien ovat siten avainasemassa metsien ravinnetasapainon ylläpidossa.

Metsien monimuotoisuus ja sen ylläpitäminen ovat viime vuosina olleet entistä enemmän sekä tutkimuksen kohteena että metsien käsittelyn tavoitteena. Luonnontilaisen kaltaisissa metsissä on paljon lahoavaa puuta, joka luo monimuotoisuutta tarjoamalla elinympäristön monille sienille, hyönteisille, sammalille ja jäkälille.



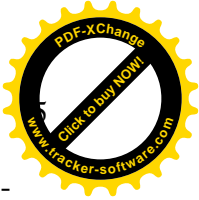
Lahopuulla eläviä makrosieniä tunnetaan Suomessa noin 1500, mutta niiden lisäksi monet huonommin tunnetut sienet ovat riippuvaisia lahopuusta (Siitonen. 2001). Lahopuussa elävät sienilajit ovat hyvin keskeisiä metsien monimuotoisuudelle. Kaiken kaikkiaan lahottajasienilajien monimuotoisuudesta ja lajien elinympäristöjen vaatimuksista on vain vähän tietoa. Silmin havaittavat sienilajit, kuten käävät, ovat perinteisesti olleet tutkimuksen kohteina mutta niiden lisäksi lahopuulla elää paljon huonosti tunnettuja sieniä, joiden havainnointi ilman DNA-tekniikoita on vaikeaa tai jopa mahdotonta. Eri sienilajien ja niiden monimuotoisuuden vaikutus puun lahoamisnopeuteen tunnetaan myös huonosti.

Lajiston monimuotoisuuden vaihtelu lahoamisen edetessä on yksi oleellisia kysymyksiä ekologiassa. Lahosuknessiossa hajotettava resurssi tasaisesti vähenee ja laatu muuttuu. Oletettavasti samalla muuttuu hajoavassa substraatissa elävä sienilajisto. Kuollut maapuu tarjoaa hyvän mahdollisuuden tutkia lahottajasienien runsauden vaihtelua ja yhteisörakennetta lahosuknessiossa.

Metsäntutkimuslaitoksella Vantaan yksikössä on tutkittu vuodesta 2008 kolmen eri koealan, Röstrandin, Lopen sekä Lapinjärven lahottajasienien monimuotoisuutta. Vuonna 2009 tutkimukseen lisättiin kaksi koealaa, Petäjäjärvi sekä Vesijako. Kaikki viisi koealaa kuuluvat yhteistutkimukseen nimeltä ”Sienilajiston monimuotoisuus ja suknessio lahoavalla puulla”. Vesijaon sekä Petäjäjärven tutkimuskohteet ovat viimeisiä ja ne on aloitettu vuonna 2009. Kaikki koealat ovat luonnontilassa olevia, kuusi-valtaisia metsiköitä, joissa metsää ei hoideta ja niissä on paljon lahopuuta. Tutkimusrahoitus on saatu Suomen Akatemialta vuosille 2008 – 2011. Tutkimus on osa isompaa metsäntutkimuslaitoksen hanketta nimeltä ”Ihmistoiminnan vaikutus metsien hiilitaseeseen ja monimuotoisuuteen”, joka on alkanut vuonna 2006.

Metsäntutkimuslaitoksen tutkimuksen tarkoituksena on analysoida lahopuussa elävän sienilajiston muutosta lahoamisen alusta lahoamisen loppuun, sekä sienilajiston suhdetta puun laatuun. Tutkimuksessa testataan hypoteesia, että lahottajasienilajien monimuotoisuus on huipussaan siinä hajoamisen vaiheessa, kun hajoamisnopeus on suurin.

Tämä opinnäytetyö keskittyi Vesijaon koealan näytteisiin. Tavoitteenani oli selvittää koealan lahopuunäytteiden lahottajasieniyhteisöjen monimuotoisuus DNA- menetelmillä, sekä puun tiheyden ja kosteuden vaikutus sienilajidiversiteettiin. Yhteensä



108:sta eri lahovaihetta edustavasta kuusirungosta eristettiin totaali-DNA, josta monistettiin sienien DNA PCR-tekniikalla. Sienilajit eroteltiin DGGE (denaturoiva gradienttegelelektroforeesi) sormenjälkianalyysillä ja lajisto tunnistettiin DNA-sekvenssoinnilla. Myöhemmin puunäytteistä tullaan vielä määrittämään hiili-, typpi- ja ligniinipitoisuudet mutta ne eivät sisältyneet tähän opinnäytetyöhön.

Työ suoritettiin metsäntutkimuslaitoksella Vantaan toimipisteessä metsäpatologian osastolla.

2 METSÄN PIENET ELÄJÄT

”Everything happens for a reason”

John Locke

2.1 Metsän monimuotoisuus (diversiteetti)

Biodiversiteetti eli luonnon monimuotoisuus käsittää laajimmillaan kaiken elollisen kirjjon, jota maapallolla esiintyy. Metsän monimuotoisuudella tarkoitetaan kaikenlaista vaihtelua metsäluonnossa. Monimuotoisuutta ovat eläin-, kasvi- ja sienilajien runsaus, elinympäristöjen vaihtelevuus sekä lajien sisäisen perinnöllisen aineksen rikkaus. Luonnon monimuotoisuuden vaalimisessa kotimaisilla puulajeilla on suuri merkitys. Myös kuollut puusto ja sen jättäminen metsään edistää monimuotoisuutta, koska huomattava osa uhanalaisista metsälajeista on riippuvainen lahopuusta. (Metsäverkko 2011, verkkosivut)

Metsäluonnon monimuotoisuudella tarkoitetaan erilaisten metsäympäristötyyppien, eliöyhteisöjen, ekosysteemien sekä metsissä elävien eliölajien ja niiden geneettisen perimän runsautta ja monipuolisuutta. Monimuotoisuutta pyritään säilyttämään mm. perustamalla luonnonsuojelualueita, turvaamalla uhanalaisten lajien elinympäristöjä ja ottamalla huomioon monimuotoisuustavoitteet metsätaloudessa. Talousmetsissä monimuotoisuutta vaalitaan säilyttämällä luonnontilaisina metsälain mukaiset, erityisen tärkeät elinympäristöt ja luonnonsuojelulain mukaiset metsäiset luontotyytit sekä muut arvokkaat luontokohteet. (Siitonen 2001, 57)

Luonnon monimuotoisuuden määrän tai tason arviointi on vaikeaa, koska yksittäisellä luvulla voidaan kuvata vain yhtä osatekijää. Yhtä ainoaa arvoa tai lukua biodiversitee-



tille ei voida antaa. Jos lasketaan pelkästään lajien lukumäärää, muutama vuosi metsänhakuun jälkeen lajimäärä alueella voi olla korkeampi kuin alkuperäisessä metsässä. Lajit ovat aivan erilaisia lähtötilanteeseen verrattuna, sillä mukana on sekä metsäettä avomaan lajeja. Lisäksi niiden runsaussuhteet ovat muuttuneet. (Metsäteollisuuden tietopalvelu, 2011, verkkosivut)

Suomalaisella metsäntutkimuksella on alusta alkaen ollut kiinteä suhde biologisiin tieteisiin, varsinkin kasvitieteeseen. Monimuotoisuuden säilyttämisessä keskeisenä tavoitteena on luontaisen lajiston säilyttäminen. Olennaista tutkimuksissa on tehdä vertailuja luonnonmetsien ja talousmetsien välillä.

Usein monimuotoisuudesta erotetaan seuraavat kolme tasoa: geneettinen eli perinnöllinen monimuotoisuus, lajistollinen monimuotoisuus ja maisemallinen eli elinympäristöjen monimuotoisuus. (Hotanen, Nousiainen, Mäkipää, Reinikainen & Tonteri. 2008, 37)

Geneettisellä monimuotoisuudella tarkoitetaan jonkin yksittäisen eliölajin perimän vaihtelua joko populaation sisällä tai eri populaatioiden välillä. Esimerkiksi monista puulajeista tavataan erilaisia muotoja ja muunnoksia. (Hotanen ym. 2008, 37)

Lajistollinen monimuotoisuus yksinkertaisimmillaan tarkoittaa esimerkiksi metsikössä esiintyvien lintulajien lukumäärää. Voidaan vertailla kahta samankokoista mutta erityyppistä metsää. Lajistollista monimuotoisuutta voidaan tutkia joko tiettyjen lajiryhmien osalta tai koko eliölajiston osalta. Jälkimmäinen tarkastelutapa on hankala, koska kaikkien eliölajien tutkiminen ja tunnistaminen on aikaa vievää ja vaikeaa työtä. Tämän vuoksi yleensä tutkitaan vain osa lajistosta: tutkitaan joku tietty lajiryhmä. (Hotanen ym. 2008, 36)

Käsite maisemallinen ja elinympäristöjen monimuotoisuus pitää sisällään mm. metsikkökuvioiden lukumäärän ja koon, ikäjakauman, puulajisuhteet sekä metsälain ja luonnonsuojelulain tarkoittamat arvokkaat elinympäristöt. Tarkastellaan siis metsässä esiintyvää vaihtelua suuressa mittakaavassa. (Hotanen ym. 2008, 36)

Lisäksi voidaan puhua rakenteellisesta monimuotoisuudesta sekä toiminnallisesta monimuotoisuudesta. Rakenteellisessa monimuotoisuudessa tarkastellaan pelkän lajilukumäärän lisäksi myös eliöyhteisön lajien runsaussuhteita. Toiminnallisella monimuotoisuudessa tarkoitetaan puolestaan erilaisten luonnon häiriö- ja sukkessioprosessien



(metsäpalot, kuolleen puuston lahoaminen) esiintyminen ja jatkuvuus. (Hotanen ym. 2008, 37)

2.2 Mikrobien vaikutus metsikköön

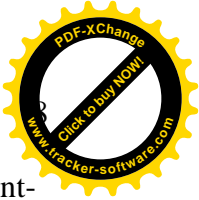
Mikrobeilla on keskeinen asema metsän ravinteiden kierrossa. Ne vaikuttavat lisäksi hyvin monin eri tavoin muiden eliöiden selviytymiseen mm. aiheuttaen tauteja tai niiltä suojusten. (Muller. 2001, 174)

Metsän hyvinvointi ja biomassan tuotto ovat todennäköisesti kytköksissä mikrobiston monimuotoisuuteen. Mahdollisia uhkatekijöitä metsän mikrobiodiversiteetille ovat lisääntyvä UV-säteily, lahopuun vähyys talousmetsissä sekä ilman epäpuhtaudet. (Muller. 2001, 174)

Metsämme jaotellaan kangasmetsiin ja lehtoihin. Kangasmetsiä on maamme metsistä valtaosa. Ne luokitellaan eri ravinneisuutta vastaaviin metsätyyppeihin pintakasvillisuuden mukaan. Havumetsät ovat yleensä metsätyypiltään tuoreita kankaita (MT) tai lehtomaisia kankaita (OMT). (Hotanen ym. 2008, 36) Useissa maailman maissa metsät luokitellaan niissä kasvavien puulajien perusteella. Meillä Suomessa puulajeja on kuitenkin vain muutamia, ja ne voivat kasvaa varsin monenlaisilla kasvupaikoilla. Esimerkiksi mänty pystyy kasvamaan toisaalta kaikkein karuimmilla kalliomailla ja toisaalta rehevissä lehdoissa. (Hotanen ym. 2008, 36)

2.3 Sienet eliöinä

Sienet ovat aitotumallisia eliöitä eli eukaryootteja. Ne sisältävät aidon tumän, jossa kromosomit sijaitsevat. Suurelle osasta ihmisiä sana "sieni" tuo mieleen lakkisienten syötävän osan eli itiöemän. Biologiassa sieni on kuitenkin paljon laajempi käsite. Maanpäällinen itiöemä on kanta- ja kotelosienien suvullinen lisääntymisrakenne. Metsässä suuri osa sieniorganismista kuitenkin kasvaa maan alla tai lahoavassa materiaalissa haaroittuvana rihmastona, joka voi ulottua useiden neliömetrien alalle. Sienten voivat lisääntyä suvullisesti tai suvuttomasti ja solut jakautuvat meioottisesti ja miotoottisesti. Sienten soluseinä sisältää kitiniä ja selluloosaa. Sienillä ei ole viherhiukkasia, joten ne eivät pysty yhteyttämään ja ovat näin ollen toisenvaraisia. Tarvitsemansa



energian sienet saavat joko hajottamalla kuollutta tai elävää materiaalia, tai symbiont-
tiselta isäntäkasviltä. (Kasanen. 2009, 20)

Metsäympäristössä sienilajisto vaihtelee paljon puuston iän ja lajikoostumuksen, to-
pografian, lämpö- ja kosteusolojen sekä maaperän ravinneisuuden ja happamuuden
mukaan, sillä sienillä on kasvien tapaan lajityypilliset kasvuoptiminsa elinympäristön
suhteen. Esimerkiksi männyn mykorritsalajisto poikkeaa olennaisesti kuusen mykor-
ritsalajistosta, ja männikössä neulaskariketta hyödyntävät eri lajit kuin kuusikossa.
Koivikossa, haavikossa, lepikossa ja tuomiviidassa on kussakin oma tyyppillinen sieni-
lajistonsa. Tammella, vaahteralla, pähkinäpensaalla jne. on niin ikään pääosin omat
mykorritsa- ja lahottajasienensä. (Kasanen 2009, 21)

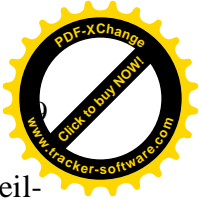
Monet kaatuneiden puunrunkojen luonnollisten lahoamislinjojen peruslajeista ovat
metsänhoidon vuoksi rajusti vähentyneet, sillä hoidetuissa metsissä ei ole riittävästi
lahopuuta, etenkin suuria runkoja. Kuollutta ja lahoavaa puuainesta hyödyntävien
lajien viimeisiä turvapaikkoja ovat suojelualueilla sijaitsevat vanhat luonnontilaiset
metsät. (Renvall 2005, 37)

Sienillä on suuri merkitys metsäekosysteemissä, sillä ne lahottavat puuainesta ja ovat
tällöin hyvin suuressa asemassa ravinteiden kiertokulussa metsässä. Sienillä on tärkeä
rooli myös metsän perustuotannossa, sillä suurin osa kasvilajeista muodostaa sienijuu-
ren eli mykorritsan. Mykorritsaksi kutsutaan sienen ja puun välistä symboosia, jossa
sieni antaa isäntäpuulleen maasta ravinteita ja vastavuoroisesti saa puulta hiiltä ener-
gian lähteeksi. (Kasanen. 2009, 19,20)

2.4 Lahoaminen ja lahopuun merkitys

Puun biologista hajoamista nimitetään lahoamiseksi. Lahotessa puuainesta pilkkoutuu,
jolloin puun huokoisuus kasvaa, tiheys pienenee ja puun väri voi muuttua. Suurin osa
lahottajaorganismeista on sieniä. Ne hajottavat entsyymeillään puun hiilihydraatteja,
pektiiniä ja ligniinejä. (Mäkinen ym. 2006)

Puun alkaessa lahota ensimmäiseksi lahoavat helposti ja nopeasti hajoavat yhdisteet
kuten sokerit, jonka jälkeen hajoavat selluloosa ja hemiselluloosa. Lopuksi hajoaa
vaikeasti hajoavaa ligniiniä. Hajoamisnopeus on kuusella n. 60-80 vuotta (Mäkinen
ym. 2006). Aluksi hajoaminen on hidasta puun vielä kuivaessa, jolloin puu ei pääse



koskettamaan maata. Tämä on myös epäsuotuista elinympäristö sienille. Keskivaiheilla hajoaminen on nopeimmillaan, jolloin koko puu on maakosketuksessa. Lopuksi hajoaminen taas hidastuu kun jäljellä on enää vaikeasti hajoavat yhdisteet kuten ligniini. (Hotanen ym. 2008, 36).

Lahottajien merkitys luonnon ravinnekierrossa on erityisen tärkeä, sillä ilman niitä kuolleen puun tai muun organismin sisältämät ravinteet jäisivät käyttämättä. Tällöin hajoamatonta materiaalia kasaantuisi luontoon suuret määrät. Metsäekosysteemissä tärkein hajotettava materiaali on kuolleet puut sekä lehti- ja neulaskariker. (Muller 2001, 174)

Lahopuulajeihin kuuluu paljon sieniä, etenkin kääpiä ja orvakkaita sekä jäkäliä, sammalia ja hyönteisiä. Näitä lahopuusta riippuvaisia lajeja eli saproksyylejä on eri eliöryhmissä arvioitu olevan Suomessa yhteensä noin 4000-5000 lajia. Lahopuulla eläviä sienilajeja tunnetaan noin 1500 mutta todellinen sienilajilukumäärä on todennäköisesti paljon suurempi. Lahopuut siis tarjoavat elinympäristön monille eliöille mutta lisäksi lahonneet rungot ovat puuston uudistumiselle tärkeä taimettumisalusta. (Siitonen 2001, 57)

Metsäntutkimuslaitoksen mukaan reilun kymmenen vuoden aikana lahopuun määrä Suomen talousmetsissä on kasvanut uusien metsänhoitosuosituksen ansiosta. Korjuualueille nykyisin jätettävät säästöpuut kuolevat ja kaatuvat aikanaan ja muodostavat lahopuuta pitkälle tulevaisuuteen. (Metsäteollisuuden tietopalvelu, 2011). Etelä-Suomessa kuollutta puuta on nyt keskimäärin $3,2 \text{ m}^3/\text{ha}$, kun määrä 1990-luvun lopussa oli $2,8 \text{ m}^3/\text{ha}$. Pohjois-Suomessa lahopuuta on tuplasti enemmän, keskimäärin $7,6 \text{ m}^3/\text{ha}$. Sen sijaan luonnontilaiset metsät ovat vähentyneet, mikä selvästi vähentää lahopuun määrää metsissämme, sillä luonnontilaisissa metsissä lahopuuta on enemmän kuin talousmetsissä: $20\text{-}130 \text{ m}^3/\text{ha}$ riippuen kasvupaikasta ja sijainnista. Sopivien elinympäristöjen väheneminen onkin uhka monelle lahopuusta riippuvalle eliölle ja esimerkiksi kääpäsienistä jopa 37% on luokiteltu vaarantuneiksi tai uhanalaiseksi (Siitonen 2001).

Lahopuun määrä luonnonmetsissä riippuu periaatteessa kolmesta eri tekijästä. Kasvu-
paikan puuntuottokyvystä, joka vaikuttaa lahopuun muodostumisnopeuteen, kuollei-



den puiden lahoamisnopeudesta sekä häiriöistä, jotka vaikuttavat lahoppuun muodostumisnopeuteen ja metsikön sukkessioon. (Siitonen 2001, 57)

Tieto lahoppuun tilavuudesta on oleellisen tärkeä tarkasteltaessa lahottajasienilajien määrää. Puun lahotessa pidemmälle sen tiheys pienenee ja täten myös sen lahottajasienilajiston diversiteetti kasvaa. Käytännössä lahoppuun tilavuus saman metsikön sisällä pysyy harvoin pitkiä aikoja tasapainossa, ja eri sukkessiovaiheiden välillä voi olla jopa kymmenkertainen ero kuolleen puuston tilavuudessa. (Siitonen 2001, 57)

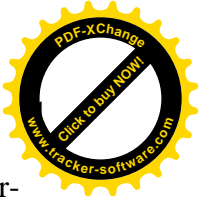
Vaikka lahoaminen onkin luonnollinen ja elämän kiertokulun kannalta oleellinen prosessi, talousmetsässä lahoaminen voi olla haitta ja vähentää saatavia hakkuutuloja. Useimmissa tapauksissa lahoaminen alkaa rungon tyviosasta; juurikäävän aiheuttama tyvilaho, vanhojen puiden lahot, ihmisten ja eläinten aiheuttamat tyvi- ja juurivauriot. Talousmetsässä lahoaminen on erityisesti vanhojen puustojen ongelma. Ohjeellista kiertoaikaa vanhempien kuusikoiden lahovikaisuus Pohjois-Suomessa on suorassa lineaarisessa suhteessa puuston ikään. (Kasanen 2009, 21)

3 LAHOTTAJAT

3.1 Lahottajasienien toiminta ja ryhmittely

Lahottajat ovat metsäekosysteemin toimivuuden ja metsän ravinteiden kierron kannalta erittäin tärkeä eliöryhmä. Lahottajasienet ovat tyypillisiä mädänsyöjiä eli saprotrofeja. Selkeästi kuolleen puuaineksen lahottamiseen erikoistuneet lahottajasienet eivät pysty yksin esiintyessään vaurioittamaan elävää puuta. Eläviin puihin iskeytyvät sienet aiheuttavat tauteja ja niitä kutsutaan patogeneiksi. Useat ja merkittävimmät metsäpuiden patogeenit osallistuvat myös puiden lahottamisprosessiin ja metsänpuiden taudinaiheuttajan ja lahottajan ero on usein vaikeaa tunnistaa. Lahottaja sienet luokitellaan päätyyppien mukaa rusko-, valko- ja katkolahottajiin sekä sinertymäsieniin. (Kurkela. 1994, 266)

Ruskolahottaja (engl. brown-rot) hajottaa pääasiallisesti puun polysakkarideja eli selluloosaa. Ruskolahottaja voi myös aiheuttaa muutoksia ligniiniä-yhdisteissä vaikka ei merkittävästi pystykkään hajottamaan ligniiniä. Ruskolahottajasienen seurauksena puu muuttuu ruskeaksi ja hauraaksi. Lisäksi puun lujuus heikkenee. Ruskolahottaja on



pääosin havupuiden lahottajasieni. Ruskolahossa puu muuttuu ensin väriltään keller-täväksi tai ruskeaksi ja lahoaminen tapahtuu tasaisesti. Kuivaessaan puu kutistuu ja halkeilee. Ruskolahon valtaama puu muistuttaa paljon hiiltynyttä puuta. Puu menettää lujuutensa hyvin nopeasti jo lahon alkuvaiheessa. Pitkälle lahonnut puu voidaan mur- rentaa sormissa pieneksi jauheeksi. Ruskolahossa alussa hajoamien alkaa solujen si- sältä hajottaen selluloosan. Jäljelle jäävät ruskeat ligniiniaineet. 27 % ruskolahottajista on erikoistunut lahottamaan lehtipuita ja noin 58 % lahottamaan havupuita. (Kurkela 1994, 266; Niemelä 2005, 13)

Valkolahottajat (engl. white-rot) ryhmään kuuluvat lahottajasienet tuhoavat niin lig- niiniä kuin polysakkaridejakin, -pääasiallisesti kuitenkin ligniiniä. Useimmat valkola- hosienet suosivat lehtipuita. Puuaines muuttuu vaaleaksi ja pehmeäksi. Lisäksi puun lujuus heikkenee. Valkolaho on saanut nimensä siitä, että ligniinin hajotessa puuaines vaalenee. Valkolahosienet lahottavat sekä havu- että lehtipuita. Valkolahoa aiheutta- via patogeenejä ovat esimerkiksi juurikäpää, mesisieni, männynkäpää sekä taulukää- pä. Useimmat valkolahottajat ovat kantasieniä, mutta joillakin lehtipuilla esiintyy val- kolahoa aiheuttavia kotelosieniä. Valkolahon tunnistaa väristä, mutta vielä väriä pa- rempi tunnistusmerkki on pitkälle lahonneen puun rakenne. Alkuvaiheessa olevaa val- kolahoa on vaikea havaita, sillä puu säilyttää lahoamisen alkaessa lujuutensa vielä jonkin aikaa. Valkolahottavat valtaavat kuitenkin puun solukon läpikotaisin ja hyvin nopeasti. Usein valkolahossa on mustia sekä tummanruskeita alueita lahoalueen ja terveen puun rajalla. Nämä ns. pseudosklerootiot tekevät puuaineen marmorimaiseksi, jolloin joskus puusta tehdyissä astioissa sekä koriste-esineissä saattaa näkyä alkuvai- heessa olevaa valkolahoa. (Fengel & Wegner 1989, 385)

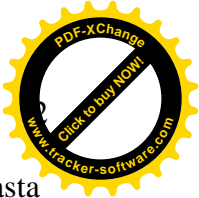
Erityyppisiä valkolahottajia ovat

taulukääpä (*Fomes Formentarius*)

silkkivyökääpä (*Trametes Versicolor*)

männynkäpää (*Phellinus Pini*).

Valkolahoa tunnetaan monta erityyppiä. Useilla valkolahottajilla on kyky hajottaa se- lektiivisesti ligniiniä, mutta lahotusaktiivisuus jakautuu puussa epätasaisesti. Valkola- hottajat hajottavat ensiksi puun ligniinejä. Usein puu muuttuu vielä vaaleammaksi kuin normaali puuaines. Lahon alkuvaiheessa puun lujuus heikkenee, mutta myö-



hemmin puuaines pehmenee ja alkaa halkeilla. Tässä vaiheessa suuri osa selluloosasta on myös hajonnut ja lopuksi puuaines muuttuu kuitumaiseksi massaksi. Valkolahottajat ovat avainasemassa kehitettäessä biologista puumassan valmistusprosessia. Lahottajasieni, joka on hyvin tehokas ligniinin hajottaja, mutta samalla jättää selluloosakuidut koskemattomiksi on tässä tilanteessa paras. Valkolahottajat kuitenkin hajottavat ligniiniä saadessaan energiaa hiilihydraateista, jolloin valkolahoprosessissa tapahtuu ligniinin ja selluloosan yhtäaikaista hajoamista. (Kurkela. 1994, 266, 267)

Katkolahottajiin (engl. soft-rot fungi) kuuluvien lahottajasienten entsyymit pystyvät muokkaamaan soluseinän komponentteja. Katkolahottajien hajottamisnopeus ja selektiivisyys riippuu paljon lahottajasienityypistä. Katkolahottajia esiintyy havu- ja lehtipuissa. Sienen toiminnan seurauksena puumateriaalin lujuus heikkenee. (Fengel & Wegener 1989, 394)

Katkolahottajan saastuttama puu säilyttää alkuperäisen muotonsa hyvin pitkään. Lahottajasienten hyyfit läpäisevät lahoamisen alkaessa solujen seinät jonka jälkeen entsymaattinen hajotus lisääntyy hyvin nopeasti. Katkolahoa aiheuttavat monet kotelosienet (Ascomycota) ja vaillinaissienet (Deuteromycota). Katkolahottaja käyttää nopeasti puun liukoiset sokerit. Katkolahottajat tarvitsevat vähemmän happea toimiakseen kuin kantasienet. Tämän vuoksi kaikki kyllästysaineet eivät aina estä katkolahottajien pääsyä puuhun. Esimerkiksi painekyllästetyissä pylväissä on tavattu katkolahottajia. (Kurkela 1994, 267)

Sinistymäsieni (engl. blue-stain fungi). Esiintyy pääosin havupuissa. Sinistymäsieni voi rajoitetusti hajottaa polysakkarideja. Tyypillisin tämän sienityypin aiheuttama vaurio on sininen tai musta värjäytymä. (Fengel & Wegener 1989, 374)

Lahottajasienet jaotellaan esiintymisen mukaan metsälahottajiin, varastolahottajiin sekä puurakenteiden lahottajiin. Metsälahottajat elävät pääsääntöisesti metsässä pystyissa, vaikka sienten elämä tavallisesti jatkuukin vielä puun kaatumisen jälkeen. Osa metsälahottajista on puita tappavia taudinaiheuttajia, mutta suurin osa on kuitenkin vain kuolleessa puuaineksessa eläviä saprofyyttejä. Varastolahottajiin kuuluvat sienet elävät kaadetuissa puissa, puutavarassa ja jossakin määrin kosteudelle alttiina olevissa puurakenteissa. Puurakenteiden lahottajasienet elävät rakennusten puuosissa, missä kosteus on sienten kehitykselle riittävä. (Fengel & Wegener 1989, 374)



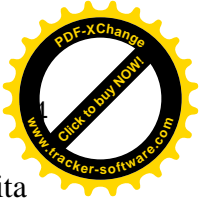
3.2 Lahottajasienien elinolo vaatimukset

Monet lahottajasienilajit ovat hyvin erikoistuneita, ne elävät vain tietyn puulajin ja -koon lahoppuulla, joka on tietyssä, niille sopivassa lahoamisen asteessa. Kun lahoaminen edistyy pidemmälle, niiden tulisi löytää lähistöltä uusi, sopivaa lajia ja lahoastetta edustava puu. (Kasanen 2001, 21)

Myös paikan pienilmastolla on lahoamisprosessille tärkeä merkitys ja lahoamisnopeus on riippuvainen sekä lämpötilasta että puun sisältämästä vesimäärästä.. Mikäli lahopuu kuivuu liikaa, se voi muuttua hyödyttömäksi esimerkiksi monelle kääpäälajille. Lahoaminen on yleensä nopeinta lämpötilan ollessa noin +25 astetta ja puun ollessa puolikuiva, jolloin puun painosta 70-80 % on vettä. Lahoamista ei tapahdu alle 0-asteen lämpötiloissa eikä enää kun lämpötila nousee yli +40:n asteen. Lahoamista ei myöskään tapahdu kun kosteusprosentti on yli 25 - 70 prosentin. (Kasanen 2001, 21)

Lahottajasienet tarvitsevat elääkseen myös vettä, happea, lämpöä ja ravinteita. Lämpötilan on useasti oltava reilusti nollan yläpuolella. Useimmat sienet kasvavatkin nopeimmin +15 ja + 25 Celsiusasteen välillä, mutta jotkin sienilajit pystyvät kasvamaan lämpötilan ollessa lähes nolla. Sienet tarvitsevat oikean lämpötilan, jotta niiden sienirihmastot kasvaisivat. Kosteuden tarpeellisuus ja merkitys on lahottajasienillä kahdenlaista. Lahoamisen alkuunpääsyyn tarvitaan aina kosteutta, mutta liiallinen kosteus solukoissa puolestaan on sienille haitallista solukon hapen puutteen vuoksi. Lahoamisen alettua sieni selviää puun sisältämän kosteuden avulla, sillä orgaanisen puuaineksen lahoamisprosessissa vapautuu hiilidioksidia, ravinteita ja vettä. (Kasanen 2001, 21)

Kosteus on arvioidusti yksi tärkeimmistä puun lahoamista estävistä tekijöistä. Sienilajeilla on erilaiset kosteusvaatimukset, jolloin lähes kaikkiin kosteusolosuhteisiin löytyy joku lahottajasieni joka pystyy elämään siinä vallitsevassa kosteudessa. Happea täytyy olla sienien saatavilla riittävästi, jotta se pystyy elämään. Puun lahoaminen hidastuu huomattavasti sen ollessa suojassa sateelta, mutta ei estä lahoamista. On myös olemassa sienilajeja kuten ratapölkky-sieni (*Lentineus lepideus*) ja aidaskääpä (*Gloephyllum sepiarium*), jotka viihtyvät hyvin kuivissa olosuhteissa ja kuivassa puuaineksessa. (Kasanen 2001, 21)



Lahottajat ovat olosuhteiden pakosta kehittyneet ja täten tottuneet sietämään korkeita hiilidioksidipitoisuuksia. Lahottavat kantasienet eivät kuitenkaan tule toimeen täysin anaerobisissa olosuhteissa. Korkea hiilidioksidipitoisuus lisää monen lahottajasienen itiöiden itävyyttä, sekä rihmaston kasvua. Hiilidioksidipitoisuuden ollessa 10-20 prosenttia rihmaston kasvu kiihtyy, mutta yli 30 %:n pitoisuus sen sijaan hidastaa kasvua. Hiilidioksidipitoisuus myös vaikuttaa lajienväliseen kilpailuun lahoavassa puussa. Kuitenkin, vaikka hiilidioksidipitoisuus vaikuttaa sienirihmaston kasvuun on paras mahdollinen pitoisuus lähellä normaalin ilman pitoisuutta. (Kurkela. 1994, 271)

Kantasienet eivät pysty kasvamaan täysin anaerobisissa olosuhteissa, mutta happipitoisuus voi olla hyvin alhainen puun sydänpuussa. Voidaan olettaa, että sydänpuun lahottajat pystyvät kasvamaan mantopuun lahottajia alhaisemmissa happipitoisuuksissa. (Kurkela. 1994, 272)

3.3 Lahottajasienilajeja

Alla on lueteltu joitakin hyvin tunnettuja lahottajasienilajeja. Suluissa on sienilajin latinankielinen nimi, jossa ensimmäinen sanan viittaa sienisukuun ja jälkimmäinen lajiin suvun sisällä. (Kurkela. 1994, 277)

Katkokääpä (*Amyloporia xantha*)

Katkokääpä on yleinen keloapuilla jotka ovat kaatuneina maassa.

Rivikäpä (*Antrodia serialis*)

Rivikäpä on yleinen pohjoisella pallonpuoliskolla olevilla havupuilla. Lahottaa kaatuneita runkoja metsässä sekä puurakenteita.

Kelokääpä (*Antrodia sinuosa*)

Kelokääpä lahottaa yleisimmin metsään kaatuneita havupuita sekä puurakenteita.



Mesisieni (*Armillaria*)

Mesisieni on yksi pahimmista havupuiden juuristotautien aiheuttajista. Se muodostaa ilmassa leviäviä itiöitä, jonka vuoksi ne voivat levitä laajalle alueelle ilmassa.

Pörrökääpä (*Cerrena unicolor*)

Lahottaa tavallisimmin kuollutta kuorellista lehtipuuta. Pörrökääpä on Suomessa yleinen.

Pohjankääpä (*Climacocystis borealis*)

Pohjankääpä esiintyy yleisimmin kuusella. Pohjankääpä on yleinen vanhojen kuusten lahottaja. Kuusipuussa laho kuivaa lahoa.

Kellarisieni (*Coniophoa puteana*)

Kellarisieni muistuttaa elintavoiltaan paljon lattiasientä, mutta vaatii enemmän ulkoista kosteutta kasvaakseen.

Sokkelokääpä (*Daedalea querina*)

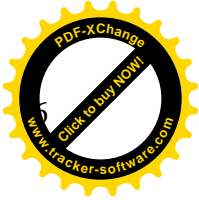
Sokkelokääpä esiintyy lahoissa tammissa tai tammen kannoissa.

Häränkieli (*Fistulina hepatica*)

Häränkieli toimii tammen lahottajana. Taulukäävän kaakaon ruskean värisen lahon takia puu on hyvin haluttua materiaalia koristetarkoituksiin.

Taulakääpä (*Fomes fomentarius*)

Taulakääpä esiintyy yleisimmin lehtipuilla mutta on merkittävä koivulla. Taulakääpä on yleinen koko Suomessa. On merkittävä lahottaja koivulla. Laho on yleensä kirjavaa.



Kantokääpä (*Fomitopsis pinicola*)

Kantokääpä esiintyy havupuilla mutta ylisimmin lehtipuilla. Kasvaa tavallisimmin kannoissa. Kantokääpää tavataan vanhoissa kuusikoissa, jotka elävät elävienkin kuusten rungoissa. Laho on kuusella usein sydän- ja männyllä pintalaho. Lahoalue on värittään ruskeaa.

Juurikääpä (*Heterobasidion annosum*)

Juurikääpä on myös mahdollisesti toinen pahimmista havumetisen juuristotautien aiheuttaja. Juurikääpä leviää maassa tai kasvien juurissa kasvattamalla rihmastoaan. Juurikääpä leviää maan kautta puusta toiseen puiden välisten juuriyhteyksien kautta. Juurikääpä muodostaa mesisien tapaan ritsomorfeja, jolloin sieni voi kasvaa pitkiä matkoja.

Ratapölkkyieni (*Lentinus lepideus*)

Ratapölkkyieni on luonnossa lahoa nähdään palaneiden havupuiden kannoilla.

Harmaaorvakka (*Phlebiopsis gigantea*)

Harmaaorvakka on tavallinen lahottaja kuolleessa havupuussa. Esiintyy erityisesti männyn kannoissa hakkuun jälkeen. Lahon päästessä alkuun on sienen diversiteetti lähes ylivoimainen muihin sieniin verrattuna.

Kuusenkääpä (*Poropadaedalea chrysoloma*)

Kuusenkääpää pidetään männynkäävän variaationa, vaikka lajina se onkin itsenäinen. Kuusenkääpä on merkittävä vanhan puuston lahottaja.

Lattiasieni (*Serpula lacrymans*)

Lattiasieni on ruskolahottaja ja kaikkialla tunnettu nopea puurakennusten lahottaja. Lahon väri on ruskeaa destruktiolaho. Lattiasieni tarvitsee kasvaakseen hyvin kosteaa puuta tai lähes 100 % ilman suhteellisesta kosteudesta.



Verinahakka (*Stereum sanguinolentum*)

Verinahakka esiintyy havu- että lehtipuilla. Verinahakka on yleinen kasvavien havupuiden ja erityisesti kuusen lahottaja. Esiintyy tavallisesti tuoreissa kannoissa. Verinahakka lahottaa kasvavia puita sekä puutavaraa. Laho on väriltään ruskeaa korrosiolahoa.

Silkkivyökääpä (*Trametes versicolor*)

Silkkivyökääpä esiintyy havu- ja lehtipuilla, mutta on harvinaisempi Suomessa. Silkkivyökääpä on tehokas puutavaran lahottaja, jota käytetään paljon valkolahon tutkimiseen.

Kuusenkynsikääpä (*Trichaptum abietinum*)

Kuusenkynsikääpä on valkolahottaja. Se on yleinen kuusipuilla koko Suomessa. Tarttuu elävään kuuseen sydänpuuhun ulottuvista haavoista. (Kurkela. 1994, 277-291)

3.4 Lahottajasienten levintä

Lahottajasienet voivat levitä kuolleeseen puuhun itiöiden avulla. Metsässä ilmassa on suuri määrä sienien itiöitä, yleisimpiä lahottajasienten itiöitä mahdollisesti lähes joka puolella. Myös hyönteiset ja muut pieneliöt voivat levittää sieni-itiöitä. Toinen tapa sienelle levitä lahoavaan puun runkoon on rihmaston avulla maasta. Osa lahoppuulla elävistä sienistä on kuitenkin levinnyt puuhun sen vielä eläessä.

Elävään puuhun lahottajasienet iskevät kaikenlaisien puun saamien vaurioiden kautta. Myrskyvauriot latvassa sekä juurissa sekä pakkashalkeamat antavat monille lahottajille sisäänpääsyreitit. Kuitenkin suurin osa puiden vaurioista on ihmisten itse aiheuttamia, esimerkiksi karsintavauriot sekä ajovauriot. Useimmat sydänpuun lahottajat tarvitsevat kasvaakseen puussa suuremman vaurion. Näiden tartunta tapahtuukin yleensä vain syvälle sydänpuuhun ulottuvista vaurioista, esimerkiksi vanhan puun oksan repeämästä. Muutamit juurilahottajat voivat lisäksi levitä metsässä puiden välisten juuriyhteyksien kautta tai maassa vapaasti kasvavien ritsomorfien eli sienirohmojen avulla. Selvitäkseen elävässä puussa sienten täytyy ensin infektoida eli tartuttaa



isäntäkasvinsa. Infektiovaihe on sienten elinvaiheista kriittisin, jolloin itiöt eivät yleensä selviä pitkään elinkelpoisena. Itämisaika, iturihman kasvattaminen sekä isäntäkasvin solukkoon tunkeutuminen pitää tapahtua nopeasti. Infektiota ei yleensä synny, koska suuri osa isäntäkasvin pinnalle levinneistä itämiskykyisistä itiöistä kohtaa isäntäkasvin puolustusmekanismien. (Kurkela. 1994, 274, 275)

4 METSÄN TAUDIT

4.1 Taudinaiheuttajat

Metsäpatologia on oppi metsän taudeista. Se on yleisen kasvipatologian erikoisala, joka tukeutuu myös moniin muihin tieteesiin. Siihen kuuluvat metsän ja puiden taudit, puutavaran pilaantuminen sekä puurakenteiden lahoaminen. Metsäpatologiaan ei lueta eläinten aiheuttamat vauriot metsälle, vaikka hyönteiset ym. pieneläimet saavat kasvissa aikaan voimakkaita tautitiloja ja usein hyönteisten tekemät vioitukset ovat taudinaiheuttajien eli patogeenien sisäänpääsyteinä. Kasvitauti on kasville haitallinen poikkeama normaalista fysiologisesta toiminnasta. Yksityiskohtaisemmin määriteltynä se on fysiologinen häiriö tai rakenteellinen epänormaalisuus, joka on tuhoisa kasville, sen osalle tai siitä saataville tuotteille. Metsäpuiden taudit ovat myös kasvitauteja. taudin ja vaurion ero voidaan selvittää seuraavasti: Tauti johtuu aiheuttajansa pitkäaikaisesta vaikutuksesta ja vaurion syntyyn tarvitaan vain jonkin tekijän hetkellinen vaikutus. (Kurkela 1994, s 1)

Tauti määritellään isäntäkasvissa näkyvien oireiden ja mahdollisesti samanaikaisesti ja samassa yhteydessä esiintyvän taudinaiheuttajan perusteella. Abioottisten taudinaiheuttajien määrittäminen vaatii tarkkoja ympäristötekijöistä tehtyjä havaintoja. Biottiset taudinaiheuttajat on perinteisesti määritetty morfologisten tuntomerkkien avulla. (Kurkela. 1994, 5, 6)

Abioottisia taudinaiheuttajia voivat olla

- ilmastolliset tekijät
- maaperätekijät
- mekaaniset tekijät.



Tauti voi olla yhden tai useamman tekijän aiheuttama. Usein abiottiset taudinaiheuttajat heikentävät kasvin, minkä jälkeen bioottiset tekijät voivat aiheuttaa taudin. Tällaista ilmiötä kutsutaan predispositioksi, joka nykyisemmin tunnetaan sanalla stressi. Presdispositio voi olla lyhytaikainen tai se voi kestää kasvin altistumishetkestä koko kasvin jäljellä olevan eliniän. (Kurkela. 1994, 5, 6)

Bioottisia taudinaiheuttajia voivat olla

- virukset
- bakteerit, mykoplasmat, riketsiat, sädesienet
- sienet
- levät
- loiskasvit
- eläimet. (Kurkela. 1994, 5, 6)

5 SIENTEN MONIMUOTOISUUDEN TUTKIMINEN

Itiöemän tunnistaminen

On perinteinen tapa ja sitä käytetään edelleen paljon arvioitaessa esim. metsien suoje-luarvoa. Tutkimusmenetelmänä se on halpa ja nopea. mutta edellytyksenä on, että tutkimushenkilökunta osaa tunnistaa sienilajit niiden itiöemien ulkonäön ja morfologian perusteella. Lisäksi tunnistuksessa vain murto-osa lajistosta selviää, koska kaikki sienet eivät tee helposti havaittavia itiöemiä puun pinnalle tai tekevät niitä harvakseltaan. (Rajala. 2011, haastattelu)

Maljaviljelyt

Maljaviljelyjä käytetään myös hyvin paljon. Tämä tapa on hyvin myös selektiivinen, sillä vain murto-osa sienistä kasvaa laboratorioissa valmistetulla keinotekoisella kasvatustalustalla. (Rajala. 2011, haastattelu)



DNA-menetelmät

Molekyylibiologisten menetelmien käyttö ympäristötutkimuksissa on kasvanut 90-luvulta asti. DNA- tutkimuksilla voidaan saada selville periaatteessa kaikki sienilajit. Huonona puolena DNA-menetelmissä ovat kalliit hinnat, sekä hitaus. Lajilleen tunnistus edellyttää, että käytössä on kattava ja luotettava geenipankki. Ongelma kuitenkin on se, että geenipankissa ei ole kaikkien sienilajien DNA-sekvenssejä ja siksi sekvenssit jäävät usein tuntemattomiksi. Esimerkiksi geenipankissa on lahottajasienistä pääasiassa vain hyvin tunnetut lajit, jotka muodostavat helposti havaittavia itiöemiä tai lajit, joita voidaan kasvattaa laboratoriossa. (Rajala. 2011, haastattelu)

5.1 DNA-Eristys

DNA:n eristämistapoja ympäristönäytteistä voidaan raportoida useita tekniikan kehityessä. DNA:n eristäminen voidaan erotella kahteen eri tyyppiin: 1. solujen erotus tutkittavasta näytteestä erityyppisten pesujen, sekä sentrifugointien avulla, minkä jälkeen solut voidaan hajottaa, 2. Suora hajotus, jossa solut hajotetaan muiden nukleiinihappojen, sekä komponenttien ollessa näytematriisissa mukana. Tämän jälkeen voidaan tietyt nukleiinihapot saada eristettyä nukleiinihappoutolla. Useimmiten erityksissä on käytössä kaupallisia kittejä. Molemmilla menetelmillä on niin edut kuin haitat. (Laanto, 2003)

DNA:n eristyksessä on tärkeää ottaa huomioon, mikä menetelmä on eristettävälle näytteelle sopiva. Millä menetelmällä nukleiinihapot saadaan eristettyä mahdollisimman puhtaasti, ettei eristyksen mukana siirry muitakin polynukleotideja kuten RNA:ta. Tärkein tekijä joka vaikuttaa halutun DNA:n saantoon on tarkkuus, jolla eristettävä kohdemikrobi saadaan hajotettua, sekä nukleiinihappojen tehokas erottelu näytteestä ja sen orgaanisista epäpuhtauksista. (Laanto, 2003)

Haluttaessa tutkia lajiston monimuotoisuutta mahdollisimman laajasti on välttämätöntä eristää DNA suoraan ympäristönäytteestä. Lajiston tutkiminen DNA-menetelmillä on kuitenkin hyvin hankalaa DNA:n hyvin pienen konsentraation vuoksi. Tutkimuksen mahdollistamiseksi on tutkittavaa DNA:ta saatava suuri määrä. Tämä on mahdollista polymeraasiketjureaktion avulla, jolloin haluttua osaa DNA:sta saadaan monistamalla jopa 10000- kertainen määrä alkuperäiseen konsentraatioon nähden. Ympäris-



tönäytteiden DNA on usein hyvin epäpuhdasta, jolloin ennen polymeerasiketjureaktiota näytteet on useasti puhdistettava. Jokainen puhdistuskerta vähentää haluttua DNA:ta, jolloin onkin ensisijaisen tärkeää optimoida puhdistusmenetelmä ja puhdistuksien määrä sopivaksi. (Laanto, 2003)

DNA juosteen koodaavat jaksot ovat usein konservoituneita eivätkä siis ilmennä tarpeeksi vaihtelua sienilajien välillä niiden erottamiseksi toisistaan. Näillä jaksoilla on kuitenkin merkityksensä etäisempien sukulaisuuksien sekä evoluution myötä tapahtuvan lajien polveutumisen eli fylogeniaan tutkimisessa. Ribosomaalisen DNA:n ITS-alueita (eng. internal transcribed spacer) on käytetty sienien tunnistukseen lajitasolla. (Laanto, 2003)

5.2 Polymeerasiketjureaktio

PCR eli polymeerasiketjureaktio on yksi tärkeimmistä molekyylibiologian menetelmistä, jolla esimerkiksi yksittäinen geeni tai mikä tahansa DNA-pätkä voidaan monistaa eksponentiaalisesti. PCR suoritetaan käyttäen erityistä PCR-laitetta, joka nostaa ja laskee lämpötilaa hyvin nopeasti. PCR:n avulla hyvin pienestä DNA-määrästä saadaan muutamassa tunnissa monistettua miljardikertainen määrä haluttua DNA:ta. DNA:n monistamiseksi on kehitetty monia erilaisia entsyymejä, jotka voivat olla hyvinkin herkkiä monistamaan kaikenlaisista DNA:ta. On myös kehitetty monia eri alukepareja jotka ovat spesifisiä vain tietyille DNA- jaksoille. Tällöin on mahdollista monistaa DNA:sta vain haluttu osa. (Suominen & Ollikka 1999, 107, 108)

PCR-reaktion ainesosat ovat

templaatti-DNA

alukkeet

polymeerasientsyymi

dNTP:t eli deoksinukleotidit

puskuriliuos

vesi.

Reaktiossa on tarkoitus kopioida templaatti- DNA:ta moninkertaisesti. Kopiotavan DNA:n puhtaus on ensiarvoisen tärkeää reaktion onnistumiselle ja sille kuinka hyvin



tuotetta saadaan reaktiossa. Reaktiossa käytetään alukkeita, jotka ovat 15–50 nukleotidia pitkiä DNA-jaksoja, jotka tunnistavat monistettavan DNA-alueen päät ja kiinnittyvät niihin emäsparisäännön mukaisesti. Alukkeet rajaavat monistettavan alueen, jolloin voidaan monistaa vain haluttua osaa DNA:sta. Alue rajataan sen 5'- ja 3'-päistä, joista lähtien polymeerasientsyymi monistaa halutun DNA-pätkän. (Suominen & Ollikka 1999, 107, 108, 109)

Reaktiossa käytetty entsyymi rakentaa alukkeista ja yksittäisistä dNTP-molekyyleistä (dATP, dTTP, dCTP ja dGTP) uuden DNA-juosteen, joka on samanlainen kuin monistettava DNA. Nukleotidien konsentraatio on yleensä reaktiossa sama. (Suominen & Ollikka 1999, 107, 108, 109)

PCR-reaktion kulku

Polymeerasiketjureaktiossa on käytännössä kolme eri vaihetta (ks. KUVIO 1.)

denaturaatiovaihe (Denaturation)

alukkeiden liittymisvaihe (Annealing)

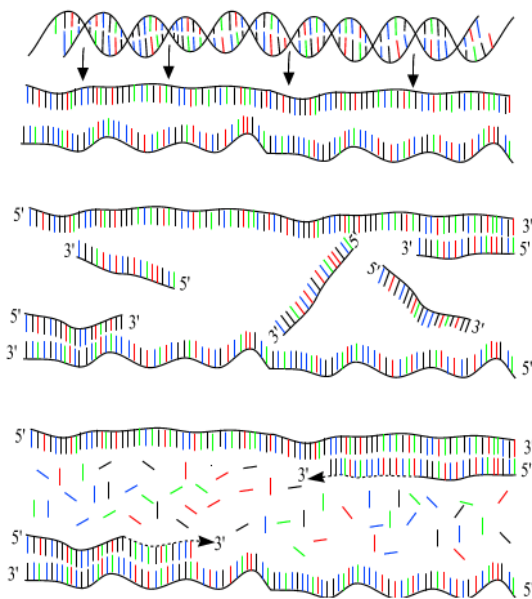
pidentymisvaihe (Extension).

Reaktion aikana DNA:n vastinjuosteet irtoavat korkean lämpötilan vaikutuksesta toisistaan. Alukkeet liittyvät itsestään yksijuosteiseen DNA:han niille sopiviin paikkoihin ja polymeerasi kiinnittyy 5'-päähän ja alkaa rakentaa uutta juostetta deoksinukleotideista 3'-suuntaan. Nämä vaiheet toistuvat reaktion aikana useasti, jolloin tarvittavan DNA:n kopioiden määrä kasvaa eksponentiaalisesti. (Suominen & Ollikka 1999, 107, 108, 109)

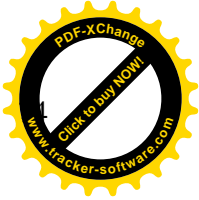
Denaturaatiovaiheessa reaktioseos kuumennetaan polymeerasista riippuen lämpötilaan, jolloin DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan korkean lämpötilan vaikutuksesta. Denaturaation lämpötila on noin 94 - 98 °C. Ennen varsinaisia toistettavia PCR-kierron vaiheita tehdään usein alkudenaturaatio, jossa lämpötila nostetaan pidemmäksi aikaa denaturaatiolämpötilaan. Alkudenaturaation tarkoituksena on aktivoida polymeerasi ja avata kopioitava DNA-molekyyli täydellisesti. Alkudenaturaatio on ns. lisädenaturaatio, joka tapahtuu ennen PCR-kierron toistettavaa denaturaatiota. (Katso KUVIO 1.) (Suominen & Ollikka 1999, 108, 109)

Alukkeiden liittymisvaiheessa reaktioseos kuumennetaan lämpötilaan jossa alukkeet liittyvät DNA:han. Sopiva lämpötila riippuu käytettävistä alukkeista ja on usein noin 55 - 60 °C (*melting temperature*, merkitään T_m). Liittymisvaiheessa tutkittavalle DNA-kohdalle spesifiset alukkeet kiinnittyvät yksisäikeiseen DNA:han emäsparisäännön mukaisesti. (Katso KUVIO 1.) (Suominen & Ollikka 1999, 107, 108, 109)

Pidentymisvaiheessa polymeraasi aloittaa DNA- vastinjuosteen luomisen toiselle yksijuosteiselle DNA:lle 5' → 3'-suunnassa. Polymeraasi kiinnittää alukkeista ja nukleotideista valmistetun juosteen pariaksi yksijuosteiselle DNA:lle. Pidennysvaiheen lämpötila on useasti 72 °C. Denaturaatio-, liittymis- ja pidennysvaiheet toistetaan useita kertoja, tyyppillisesti 20 - 40 kertaa. Näiden kierrosten jälkeen suoritetaan vielä loppeukstensio , joka kestää useasti noin 5 - 8 minuuttia. Tämän tarkoituksena on varmistaa, että polymeraasi rakentaa kaikki aloitetut DNA-kopiot loppuun asti eikä reaktioseokseen jää ylimääräisiä partikkeleita. (Ks. KUVIO 1) (Suominen & Ollikka 1999, 107, 108, 109)



KUVIO 1. Polymeraasiketjureaktion kulku. 1. vaihe: denaturaatio (denaturation). 2. vaihe: liittyminen (annealing). 3. vaihe: pidentyminen (extension). (KUVIO otettu: Googlen kuvahaku, PCR)



Polymeraasit

PCR:ssä käytetyt polymeraasit on alunperin eristetty termofiileistä bakteereista, nykyään niitä voidaan myös valmistaa synteettisesti. PCR- reaktion onnistumisen kannalta polymeraasin täytyy olla lämpöstabiili. Erilaisia entsyymejä on olemassa markkinoilla lukuisia varustettuna erilaisin ominaisuuksin. Joihinkin entsyymeihin on lisätty hot start -ominaisuus, jolloin niihin liitetty vasta-aine irtoaa ja ne alkavat toimia vasta denaturointi- lämpötilassa. Näin voidaan vähentää epäspesifisten tuotteiden määrää. (Suominen & Ollikka 1999, 107, 108)

Tässä opinnäytetyössä käytettiin Biotools- polymeraasia. Biotools- polymeraasin denaturointilämpötila oli 94 °C.

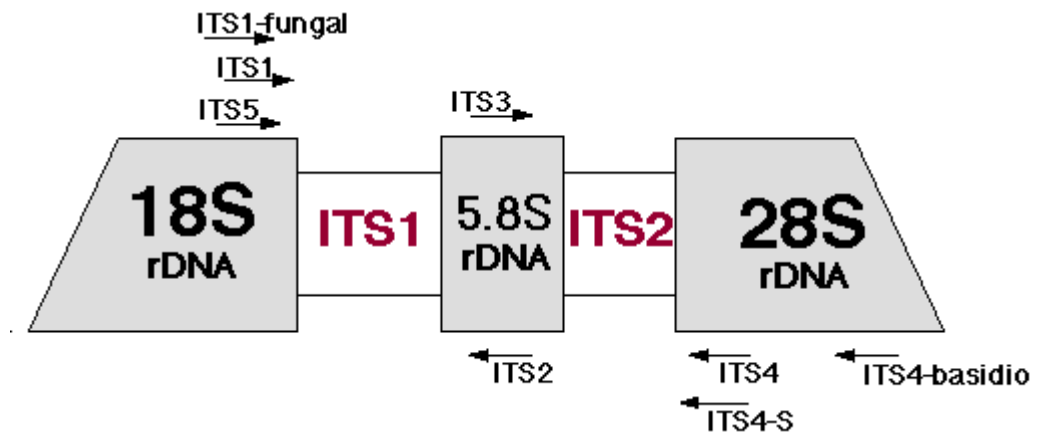
Templaatti

Monistettava DNA voi olla esimerkiksi genomista, mitokondriaalista, plasmidi-DNA:ta, cDNA tai vaikka PCR-tuote. Yleensä DNA:n koko ei ole kriittinen, mutta kuitenkin vaikuttava tekijä PCR- tuotteen vahvuuteen. Hyvin G+C -pitoinen templaatti aiheuttaa usein ongelmia PCR:ssä. Templaatin denaturaatiota voidaan tällöin tehostaa nostamalla alkudenaturointilämpötilaa ja pidentämällä denaturointiaikaa. (Suominen & Ollikka 1999, 107)

ITS-alukkeet

Sienten DNA:n kopioimiseen käytetään eniten ITS- alukkeita (**Engl.** internal transcribed spacer), koska eri lajien tunnistuksessa on evoluution kuluessa tapahtunut paljon mutaatioita ITS- alueilla. ITS- alukkeet sopivat hyvin lajien tunnistukseen, koska ITS-alueet vaihtelevat paljon eri sienilajien välillä. (Tiina Rajala haastattelu 2011). Ribosomit sisältävät koodaavia ja koodaamattomia jaksoja. ITS- alukkeet ovat tämän geeniklusterin koodaamattomia jaksoja.

Jaksoa jossa koodaavat ja koodaamattomat jaksot sijaitsevat kutsutaan ns. geeniklusteriksi. (ks. KUVIO 2.) Koodaamattomia alueita on vain eukaryoottisolussa, joita on vain sienillä, kasveilla sekä eläimillä. (Gardes & Bruns, 1993)



KUVIO 2. Kopioitava DNA-alue. ITS- alukkeiden liittyminen geeniin, sekä koodaavien 18S rDNA, 5.8S rDNA ja 28S rDNA jaksojen sijainnit. KUVIO otettu: <http://nature.berkeley.edu/brunslab/picts/results/its-map.GIF>

rRNA-geenien koodaamattomina jaksoina ITS1- ja ITS2-alueet (ks. KUVIO 2.) ovat muuttuneet evoluution myötä koodaavia jaksoja nopeammin, minkä vuoksi sekvenssin variaatio on suurempi läheisten lajien välillä. Usein DNASTA monistetaan molemmat ITS-alueet, jolloin myös 5.8S rDNA sisältyy sekvenssiin. 5.8S rDNA on kuitenkin lajitunnistuksessa hyödytön. (Laanto, 2001, 21) Koodaavat alueet 18S, 5.8S ja 28S ovat ribosomaalisia DNA- jaksoja, joissa on geneettinen informaatio ribosomien proteiinisynteesiä varten. rDNA on hyvä monistuksen kohde, sillä niitä alueita on kopioitavassa DNA:ssa paljon. Geeniklusteri luetaan 5'-päästä 18S rDNA, 5.8S rDNA sekä 28S rDNA. Ribosomaalisten DNA- jakson välissä sijaitsevat koodaamattomat ITS-alueet. (Gardes & Bruns, 1993, 113–118)

Tässä opinnäytetyössä käytettiin alueparina ITS1F (Gardes & Bruns, 1993, 113–118) sekä ITS2 (White, Bruns, Lee & Taylor 1990, 315–322). DGGE-ajoihin näytteet monistettiin alukeparilla ITS1F-GC sekä ITS2.



5.3 Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi (DGGE)

Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi on molekyylibiologiassa käytetty menetelmä, jossa DNA kulkee sähkövirran vaikutuksesta denaturoivassa gradienttigelissä. Menetelmällä voidaan todeta samana pituisten, mutta eri emäsjärjestykseltään olevien DNA-juosteiden eroavaisuuksia. Menetelmää käytetään todentamaan jopa yhden emäksen eroavaisuuksia DNA-juosteissa. (Ali-Kovero 2008, 16; Bio-Rad Laboratories 1996, 11)

Urea sekä formamidi toimivat gelissä denaturoivina ainesosina. DNA-näytteet ajautuvat gelin yläpäästä, jossa denaturoivien ainesosien määrä on pienin kohti gelin alapäätä, jota kohti denaturoivien ainesosien määrä kasvaa tasaisesti. (Bio-Rad Laboratories 1996, 11)

DNA-juosteet kulkeutuvat tasaisesti gelissä kunnes saavuttavat gelissä kohdan, jossa denaturoivien ainesosien määrä on tarpeeksi suuri avaamaan DNA:n kaksoisjuosteen. Tällöin kulkeutuminen alkaa hidastua ja lopulta kulkeutuminen pysähtyy. DNA:n kaksoisjuosteen avautuminen riippuu siitä millainen emäsjärjestys kullakin DNA-juosteella. (Bio-Rad Laboratories 1996, 11)

6 TYÖN SUORITUS

6.1 Esikäsittely

Työn tarkoituksena oli selvittää Vesijaon koealan lahottajasienilajien diversiteetti eri lahoasteella olevissa kuusipuissa. Koealalta kerätyt lahpuut luokiteltiin viiteen eri lahoasteeseen. Lahoaste oli määritelty puukon terän uppoamisen mukaan seuraavasti.

Lahoaste 1. Puuaines on kovaa ja puulla on kuori. Runko on vähän aikaa sitten kaatunut. Puukon terä uppoaa puuhun vain muutaman millimetrin.

Lahoaste 2. Puuaines melko kovaa ja puulla on kuori. Puukon terä uppoaa puuhun 1-2 cm.

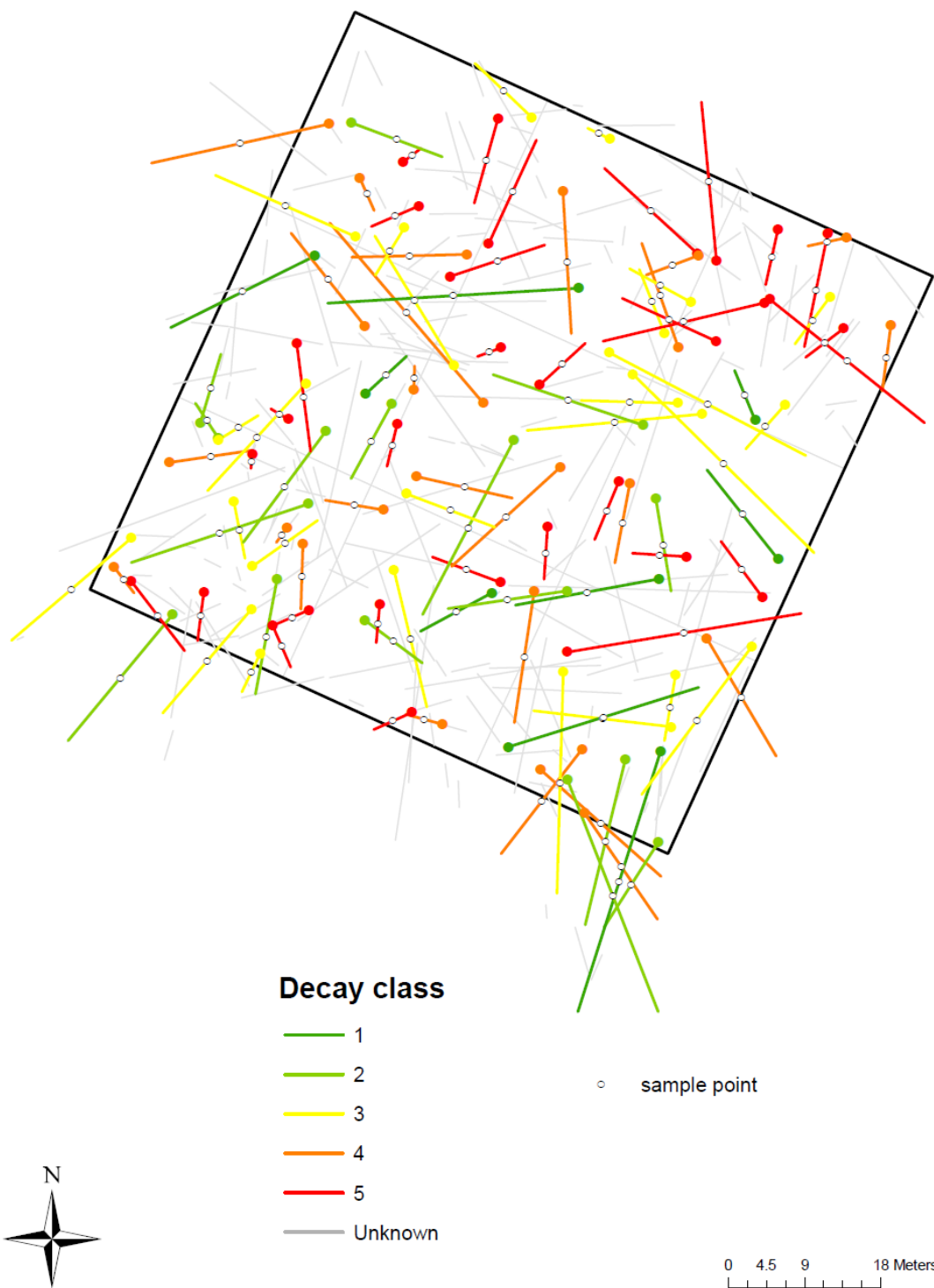


Lahoaste 3. Puuaines on melko pehmeää. Kuori on repeillyt, sekä irtoillut laajalta alueelta puusta. Puukon terä uppoaa puuhun helposti noin 3-5 cm.

Lahoaste 4. Puuaines on jo lahonnut pehmeäksi. Puun runko on epifyyttien peittämä. Puukon terä uppoaa puuhun helposti kahvaan saakka.

Lahoaste 5. Puuaine on hyvin pehmeää ja hajoaa käsiin. Puun pinta on lähes kokonaan epifyyttien peittämä. (Yli-Kojola. 1995, 97)

Näytteet oli sahattu koealalla kiekkoiksi, joista jokaista lahoastetta edustavaa näytettä oli kerätty koealalta useampia. Yhteensä näytekiekkoja oli 108 kpl. Koeala oli luonnon tilassa oleva metsikkö, jonka pinta-ala oli noin 75 m x 75 m. (ks. KUVIO 3. & 4.) Näytepuiden suunnat, näytteenottokohdat sekä lahoasteet koealalla oli piirretty kuvaksi. (ks. KUVIO 3.)



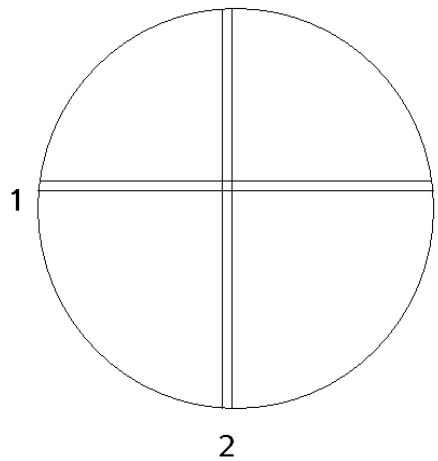
KUVIO 3. Piirros koelasta. Piirroksen on merkitty lahopuiden suunta, näytteenotto-kohta sekä lahoaste. Eri väreillä merkityt kuuset kuvaavat puun lahoastetta. Näytteenotto-kohta on merkitty puuhun vaalealla pallolla. (KUVIO: Metsäntutkimuslaitos, Markku Tamminen)

Näytekiekot tuotiin koealalta (ks. KUVIO 4.) metsäntutkimuslaitokselle, jossa niitä säilytettiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Kiekoista porattiin puupuraa ristiin, siten että poran teräs meni kauttaaltaan läpi kiekoista, tällöin purua saatiin mahdollisimman laajalta alueelta. Tällöin myös saatiin mahdollisimman hyvin informaatioita lahottajasierien lajistosta puun pinnalla sekä lähellä puun ydintä.



KUVIO 4. Vesijaon luonnontilassa oleva koeala, josta lahopuunäytteet olivat peräisin.

Ennen purun poraamista näytekiekon pinta vuolttiin paljaaksi vastakkaisilta sivuilta neljästä eri suunnasta 70-prosenttisella etanolilla steriloidulla puukolla, jotta kontaminaation riski vähentyisi. Näytekiekko kiinnitettiin ruuvipenkkiin poraamisen helpottamiseksi. Puupuru porattiin akkuporakoneella kahdesta eri suunnasta (ks. KUVIO 5). Poranterä terä oli myös steriloitu etanolilla. Puru porattiin Minigrip-pussiin joka oli kiinnitetty näytekiekon kylkeen, jolloin porattaessa puru saatiin helposti suoraan pussiin, eikä itse puruun ollut tarvetta koskea käsin. Purua kerättiin pussiin noin 20 ml. Pussit merkattiin jokaiselle kiekolle ominaisella koodilla.

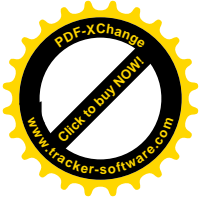


KUVIO 5. Näytekiekon poraussuunnat 1 ja 2.

Osa kiekkoista oli pitkälle lahonneita (ks. KUVIO 6.), mikä vaikeutti purunäytteen saamista. Osa kiekkoista oli myös erityisen pienikokoisia, jonka vuoksi näytepurua jouduttiin poraamaan useammasta reiästä vierekkäin.



KUVIO 6. Osa lahoppunäytteistä. Väreistä voidaan nähdä eri lahoavaiheissa olevat näytteet. Vaaleat purut ovat vähemmän lahonneita ja tummat purut ovat pitemmälle lahonneita.



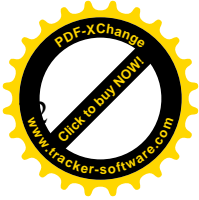
6.2 Tiheyden ja kosteuden määrittäminen

Puukiekkojen tiheyden määrittämistä varten lahoppuukiekoista sahattiin vannesahalla tasasivuinen pala. Oli tärkeää saada palanen sahattua siten, että palasen sisään ei jäisi porausreikiä. Nämä reiät aiheuttaisivat ilmataskun ja vaikuttaisivat tällöin tiheystulokseen. Palanen kiinnitettiin metallipiikkiin, jonka avulla se voitiin upottaa veteen, siten että palanen ei koskettaisi astian laitoihin. Vesi astia oli vaa'an päällä, josta voitiin lukea puupalan syrjäyttämä tilavuus. (ks. KUVIO 7.)

Tiheyttä varten otetun painon jälkeen näytteet laitettiin lämpökaappiin kahdeksi vuorokaudeksi lämpötilan ollessa 103 °C. Näytteet punnittiin ja haihtuneesta kosteudesta voitiin laskea kappaleen kuivapaino ja kosteus- %. Tilavuudesta ja kuivapainosta voitiin laskea puukappaleen tiheys.



KUVIO 7. Lahoppuukiekosta sahattu tiheysnäyte punnituksessa.



6.3 DNA- eristys

DNA- eristykset aloitettiin suoraan näytepurujen porausten jälkeen. Eristämiseen käytettiin Omegan valmistamaa E.Z.N.A SP Plant DNA Mini-eristyskittiä. (Omega, tuotenumero: D5511-01).

Eristyspakkaus sisälsi seuraavat osat.

Liuokset

Puskuriliuos 1

Puskuriliuos 2

Puskuriliuos 3

SPW-pesuliuos

RNAasi A

Eluointipuskuriliuos

Reaktion tasapainoliuos.

Putket

2 ml:n nukleaasi-vapaa keräilyputki (50 kpl)

Omega-homogenisoijaputki suodattimella (50 kpl)

HiBind- DNA Mini suodatinputki suodattimella. (50 kpl)

Ennen DNA-eristyksen aloittamista SPW-pesuliuokseen lisättiin 80 ml 99.4 v-%:sta etanolia sekä steriloitiin kvartsihiekkaa. Näytteiden homogenisointia varten valmistettiin 2 ml:n tasapohjaiset eristysputket lisäämällä pohjalle kvartsihiekkaa, jonka jälkeen putket steriloitiin autoklavoimalla 20 min 120 baaria.

DNA-eristettävää puupuraa pyrittiin punnitsemaan noin 80 mg. Puruja, jotka olivat pitkälle, lahonneet pyrittiin punnitsemaan vähemmän. Ennen näytteenottoa purua sekoitettiin hyvin pussissa, jotta näytteeksi saatiin mahdollisimman edustava näyte.

Näytteeseen lisättiin 400 µl puskuriliuos 1:tä, sekä 4 µl RNAasi A:ta. RNAasi:n tarkoitus oli erotella RNA-molekyylit erilleen eristettävästä DNA:sta. Näytteiden käsittely tapahtui jäällä.



Solujen hajotus

Näytepuru siirrettiin kvartsihiekkaa sisältävään eristysputkeen, jossa solut hajotettiin Fast prep-laitteella. Laite ravisteli putkia edestakaisin 4m/s, kahdenkymmenen sekunnin ajan. Ravistelu toistettiin 3 kertaa. Solujen hajotuksen jälkeen näytteitä inkuboitiin lämpökaapissa tunnin ajan. 65 °C:ssa, jonka aikana putkia käännettiin varovasti ylösalaisin noin 20 minuutin välein.

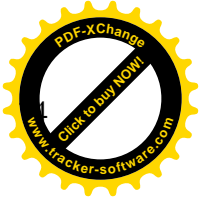
Proteiinin ja polysakkaridien erotus

Solujen hajotus putkiin lisättiin 140 µl puskuriliuos 2:ta. Näytteet sekoitettiin vortexilla ja inkuboitiin 5 minuuttia jäällä. Inkuboinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin 10 minuuttia (16100 G). Sentrifugauksen jälkeen neste pipetoitiin erilleen ja siirrettiin Omega- homogenisoijaputkeen (vihreä). Putki asetettiin 2 ml:n keräilyputkeen, johon näyte suodatettiin sentrifugoimalla putkia 2 minuuttia (16100 G). Ensimmäisellä suodatuksella saatiin poistettua mahdollisimman paljon jäljellä olevaa saostumaa sekä solujäänteitä. Suodatettu näyte pipetoitiin puhtaaseen 1,5 ml:n Eppendorff- putkeen sekä mitattiin liuoksen sen hetkinen tilavuus. Näytteeseen lisättiin 1,5- kertainen määrä puskuriliuos 3:a. Näytteitä sekoitettiin vortexilla.

DNA:n puhdistus ja erotus

HiBind- DNA Mini suodatinputkeen (sininen) lisättiin 100 µl tasapainotusliuosta. Tämä liuos sentrifugoitiin suodattimesta läpi, jolloin eristettävä DNA saatiin paremmin irti suodattimesta. Samaan HiBind- DNA Mini suodatinputkeen lisättiin 650 µl näytettä. Näytettä sentrifugoitiin minuutin ajan (10000 G) suodattimesta läpi, jolloin haluttu DNA jäi kiinni filteriin. Läpi tullut neste heitettiin pois. Näytettä ollessa yli 650 µl toistettiin pipetointi sekä sentrifugointi.

HiBind- DNA Mini suodatinputkiin lisättiin 650 µl SPW pesuliuosta, jotka asetettiin puhtaisiin keräilyputkiin. Näytteet sentrifugoitiin suodattimesta läpi keräilyputkeen, jolloin haluttu DNA jäi kiinni filteriin. Läpi tullut neste kaadettiin pois. Filtrissä olevaa DNA:ta pestiin toisen kerran SPW- pesuliuksella. Näyte sentrifugoitiin ja läpi tullut neste kaadettiin pois.



DNA:n eluointi

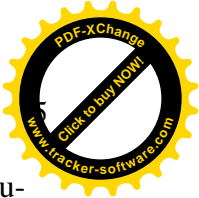
HiBind- DNA Mini suodatinputki siirrettiin steriloituun 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen. Suodattimeen lisättiin 50 µl eluointipuskuriliuosta, joka oli lämmitetty 70 °C:ksi. Eluointiliuoksen annettiin vaikuttaa filterissä noin 5 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin 1 minuutin ajan. Sentrifugoitu näyte pipetoitiin uudestaan HiBind- DNA Mini suodatinputkeen, jonka jälkeen näytettä inkuboitiin 65 °C:ssa 5 minuutin ajan. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin 1 minuutin ajan, jolloin Eppendorf-putken pohjalle saatiin eristetty DNA.

PEG- saostus

DNA:n puhtauden parantamiseksi oli DNA saostettava. Tämä voitiin suorittaa PEG-liuoksella (polyetyleeniglykoli) Vainion, Korhosen & Hantulan (1998) esittämällä tavalla.

PEG- liuosta lisättiin DNA- näytteeseen siten, että DNA:PEG suhde oli 10:6. Eppendorf- putkessa ja eluointiliuoksessa olevan DNA:n tilavuus oli 50 µl, jolloin PEG- liuosta pipetoitiin 30 µl. Näytteitä sekoitettiin voimakkaasti Vortexilla. Välittömästi sekoituksen jälkeen näytteitä pidettiin 20 minuutin ajan jäällä, jonka jälkeen saostuma pyrittiin samaan Eppendorf- putken pohjalle 20 minuutin sentrifugoinnilla. DNA:ta oli usein vaikeaa havaita silmin sen ollessa läpikuultavaa. Tämän takia oli tärkeää asettaa putket sentrifugiin siten, että tiedettiin kumpaan putken alareunaan saostuma tuli.

Sentrifugoinnin jälkeen neste pyrittiin pipetoimaan mahdollisimman hyvin pois putkesta. Supernatantin poiston jälkeen DNA:ta pestiin 70 %:lla etanolilla, joka oli jääkylmää. Näyteputkea heiluteltiin kevyesti ja sentrifugoitiin 5 minuutin ajan. Etanoli pipetoitiin pois putkesta, jonka jälkeen putkeen jääneet etanoli jäämät pyrittiin kuivaamaan mahdollisimman hyvin vakuumikuivurilla 45 °C:ssa 2 minuutin ajan maksiminopeudella. Kuivauksen jälkeen etanolijäämiä saattoi jäädä vielä näytteisiin, jolloin kuivaus toistettiin. Lopuksi näytteet suspendoitiin 30 µl:aan TE- liuosta. ja inkuboitiin näytteitä 1 tunnin ajan 50 °C:ssa



Tämän opinnäytetyön aikana DNA- eristyksissä testattiin myös auttaako SPW- pesuliuksella pesujen lisääminen DNA:n puhtauteen, sekä parantamaan DNA:n kopiautumista PCR:ssä. Pesukertoja lisättiin kahdesta kolmeen, mutta lisäämisellä ei todettu olevan merkitystä DNA:n puhtauteen tai parantamaan monistumista.

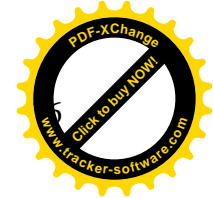
6.4 Näytteiden monistus

DNA- eristyksen jälkeen tutkittavan DNA:n määrä oli hyvin pieni, joten tutkimuksen edetessä tarvittiin DNA:ta myös suurempi määrä. Erityisen tärkeää oli, että PEG- saostuksessa jääneet etanolijäämät oli saatu haihtumaan vakuumikuivurissa, sillä PCR-reaktioon jäänyt etanoli inhiboi reaktiota.

PEG- saostuksen jälkeen näytteistä tehtiin suoraan 1:10 laimennokset steriloituun veteen, jonka oli todettu olevan suurimmalle osasta näytteitä paras monistumisen kannalta. Näytteiden käsittely sekä reaktioseoksen (Mastermix) valmistaminen tehtiin laminaarissa. Reaktioputkina käytettiin 500 µl:n Eppendorf- putkia.

PCR- reaktio tehtiin kahdessa eri faasissa (ks. TAULUKKO 1 & 2), jolloin valmistettiin ylä- sekä alafaasi. Kahden faasin reaktiossa alafaasi lisättiin ensin reaktioputkeen, joka sisälsi vain alukkeet, puskurin, veden sekä templaatti DNA:n. Alkudenaturaatio tapahtui vain alafaasissa. Tämän tarkoituksena oli parantaa DNA- juosteiden avautumista ja vähentää ei- spesifisen DNA:n monistumista. Tällöin myös polymeerasi ei päässyt vaikuttamaan vielä reaktioon. Alafaasiseoksen päälle tiputettiin tippa mineraaliöljyä estämään haihtumista. Kahden faasin reaktio on vanha tapa tehdä ns. "hot start" reaktio.

Alkudenaturaation annettiin vaikuttaa alafaasissa 7 minuutin ajan, jonka jälkeen reaktioon lisättiin yläfaasi. Yläfaasi sisälsi nukleotidit, puskurin, veden sekä DNA- polymeerasin. Alkudenaturaatio kesti 8 minuuttia, jonka jälkeen reaktion annettiin jatkaa ohjelman loppuun asti (ks. TAULUKKO 3). Reaktion kontaminaatioita tarkkailtiin negatiivisella kontrollilla, joka ei sisältänyt templaatti- DNA:ta. Myös reaktion toimivuutta kontrolloitiin positiivisella kontrollilla, johon templaatiksi lisättiin tunnettua sienen DNA:ta, jonka piti monistua varmasti.



TAULUKKO 1. PCR-alfaasiseoksen ainemäärät yhtä reaktiota kohde.

Reaktion osa	Määrä (µl)
Vesi (DDW)	19,5
10 x Puskuri (Biotools)	2,5
Aluke ITS1F	1
Aluke ITS2	1
Templaatti- DNA	1

TAULUKKO 2. PCR-yläfaasiseoksen ainemäärät yhtä reaktiota kohden.

Reaktion osa	Määrä (µl)
Vesi (DDW)	21,3
10 x Puskuri (Biotools)	2,5
Nukleotidit (dNTP)	1
DNA- polymeerasi	0.2

Yhden reaktion kokonaistilavuudeksi tuli 50 µl. Ainemäärät kerrottiin sen mukaisesti kuinka suuri näyte määrä oli kyseessä.

TAULUKKO 3. Työssä käytetty PCR-ohjelma.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min.)
1. Alkudenaturaatio	95	8
2. Denaturaatio	95	1
3. Liittyminen	58	1
4. Ekstensio	72	1
5. Loppuekstensio	72	7
6. Jäähdytys	8	

Vaiheet 2-4 toistettiin 34 kertaa. Ohjelman loputtua reaktioputket otettiin pois PCR-koneesta ja PCR- tuote siirrettiin mineraaliöljyn alta uuteen 1,5 ml:n Eppendorf- putkeen.



6.5 Monistuksen tarkistus elektroforeesilla

Ennen elektroforeesiajoa PCR- tuotteen sekaan lisättiin 12,5 µl 5 x TD:tä. TD- liuos oli väriltään sinistä ja sen tarkoituksena oli auttaa pitämään PCR- tuote agarosigeelin kaivossa, sekä antamaan PCR- tuotteelle värin, jotta pipetoiminen geeliin helpottuisi. Elektroforeesiajoissa käytettiin 1 %:sta agarosigeeliä. Elektroforeesilla haluttiin tarkistaa onko DNA:n monistuminen onnistunut, sekä oliko reaktioseos kontaminoitunut.

Agarosia punnittiin 2,3 g ja liuotettiin 230 ml:an 1- kertaiseen TAE- puskuriin kuumentamalla seosta mikroaaltouunissa. Agarosin liuettua TAE- puskuriin, lisättiin liuokseen etidumbromidia 1 tippa/50 ml liuosta. Agarosiliuos valettiin kelkkaan, johon asetettiin kammot. Geelin annettiin jähmetyttyä noin 45 minuuttia, jonka jälkeen kammot irrotettiin, jolloin kampoien kohtiin jäivät kaivojen paikat.

Agarosigeeli asetettiin ajolaitteistoon, johon lisättiin 1- kertaista TAE- puskuri geelin päälle siten että geeli oli puskuriliuoksen peitossa. Näytteitä pipetoitiin kaivoihin noin 5 µl. Ajolaitteiston jännitteeksi asetettiin 120 mV, sekä ajoajaksi tunti.

6.6 Näytteiden denaturoiva gradienttigelielektroforeesi

Elektroforeesiajon jälkeen DNA:sta haluttiin selvittää sienilajiston monimuotoisuus. Tämä onnistui DGGE:llä, jossa eri lajit saatiin erottumaan geelissä denaturoivien ainesosien ansioista erilleen (ks. TAULUKKO 4). DGGE-liuokset ja gradienttigelii valmistettiin vetokaapissa niiden tekoon tarkoitetuilla pipeteillä.

TAULUKKO 4. DGGE liuosten (0- % ja 100- %) aineelliset koostumukset.

Reagenssi	0-%	100-%
Urea		42 g
Akryyliamidi	18,75 ml	18,75 ml
50 x TAE	2 ml	2 ml
Formamid		40 ml
Ultrapuhdas vesi	100 ml:ksi	100 ml:ksi



Taulukosta 4. nähdään, että 0- prosenttiseen gradienttiliuokseen ei tule lainkaan denaturoivia ainesosia. Gradienttigeeli valmistettiin DGGE-liuoksista sekä kolmesta muusta liuoksesta (ks. TAULUKKO 5). Tällöin heikon ja vahvan gradienttiliuosten sekoituessa tasaisesti toisiinsa saatiin geeliin tasaisesti kasvava gradientin pitoisuus. Tässä opinnäytetyössä DGGE- ajoissa käytettiin 18-58-prosenttista denaturointigradianttista akryyliamidigeeliä.

TAULUKKO 5. Gradienttigeelin aineelliset koostumukset.

Liuos	Heikko	Vahva
0-% gradienttiliuos	12,3 ml	6,3 ml
100-% gradienttiliuos	2,7 ml	8,7 ml
Bromifenolisininen	60 µl	
Ammoniumpersulfaatti (APS)	150 µl	150 µl
TEMED (N,N,N',N' tetrametyleenidiamiini)	15 µl	15 µl

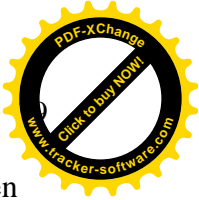
APS sekä TEMED toimivat geelin jähmettämä reagensseina.

Laitteiston kasaus

Ajolaitteisto kasattiin kahdesta lasilevystä, joiden väliin asetettiin muoviliuskat (spacer) pitämään lasit irti toisistaan. Lasit kiinnitettiin valutelineeseen puristimien (clamp) avulla siten, että muoviliuskat olivat suorassa. Lasien kulmat tiivistettiin vielä 0,5 %:lla agarosilla suojaamaan akryyliamidigeelin vuotamista.

Gradienttigeelin valaminen

Heikko sekä vahva gradienttiliuos valmistettiin omiin astioihinsa. APS ja TEMED pipetoitiin kumpaankin viimeisenä, jolloin liuokset alkoivat vähitellen jähmettyä. Heikko liuos kaadettiin ensimmäisenä gradientin muodostajaan, joka oli yhdistetty pumppuun ja edelleen lasilevyihin letkuilla. Heti perään gradientinmuodostajaan kaadettiin vahva liuos. Heikon ja vahvan liuoksen sisältämät kammiot yhdistettiin avamalla hana ja geelinvalupumppu käynnistettiin, jolloin heikko sekä vahva liuos alkoi-



vat sekoittua keskenään. Sekoitusta avustettiin magneetilla, joka oli vahvan liuoksen kammiossa.

Liuosten sekoituessa, lasien väliin muodostui gradienttigeeli, jonka denaturoivien ainesosien pitoisuus kasvoi tasaisesti ylhäältä alaspäin. Tämän jälkeen lasien väliin asetettiin kampa, jolla geeliin saatiin kaivot näytteitä varten. Akryyliamidigeelin annettiin jähmettyä noin kahden tunnin ajan.

Geeli asetettiin telineeseen, joka siirrettiin ajolaitteistoon. Ajolaitteistossa oli 60 °C:sta 1- kertaista TAE- puskuria. Näytteitä pipetoitiin kaivoihin 15 - 40 µl, riippuen PCR-tuotteen vahvuudesta. Näytteiden ajoaika oli 16 tuntia, sekä jännite 75 voltia.

Geelin värjäys ja kuvaus

Ajon loputtua geeli irrotettiin ajolaitteistosta. Pienempi lasi irrotettiin, jolloin geeli jäi toiseen lasiin. Geeli värjäykseen käytettiin fluoresoivaa Sybr- Gold väriä, joka sitoituu 2-juosteiseen DNA:han SybrGold on mahdollisesti karsinogeeninen eli syöpää aiheuttava, joten sitä käsiteltiin myrkkynä. SybrGold kerättiin ongelmajätteeseen. Geelin päälle pipetoitiin tasaisesti 15 ml värjäysliuosta, jonka annettiin vaikuttaa pimeässä tilassa noin 30 minuuttia.

Pipetoitu värjäysliuos kaadettiin geelin päältä pois ja geeli siirrettiin lasilevyllä kuvauspöydälle. Kuvausohjelmaksi käytettiin AlphaDigiDog- ohjelmaa, jolla kuvan kontrastia ja väriolosuhteita voitiin muokata.

Tässä opinnäytetyössä tarkasteltiin DGGE:lla lahottaja sienien DNA:n kulkeutumista. Lahopuut sisältävät useasti hyvin monia sienilajeja, jonka vuoksi oli tärkeää pystyä vertailemaan lajeja keskenään. Vertailua varten on olemassa erilaisia ohjelmia tietokoneelle kuten Gel Compar II -ohjelma. Tätä ohjelmaa käytin vertaillessani eri lajeja toisiinsa. Tällä ohjelmalla voidaan geelikuvia suoristaa ja muokata erittäin laajasti. Geelikuvia voidaan vertailla keskenään, jolloin lajien välinen vertailu on helpompaa.

DGGE- kuvien analysoinnin jälkeen merkattiin ne DNA- juosteet jotka tulkittiin tutkittavaksi sieneksi. Tämän jälkeen koko aineistosta koottiin 0/1 binaaridata, josta nähtiin kuinka monella puunäytteellä oli tiettyä sienilajia. Tästä datasta voitiin tehdä ku-



vaaja, josta nähtiin ne OTU- luvut eli eri sienilajit, joita esiintyi lahpuissa eniten (Liite1). Tästä kuvasta valittiin sekvensoitavaksi laitettavat sienet.

Sekvensoitavaksi valitut näytteet oli tarkoitus saada mahdollisimman puhtaaksi, sillä halutun näytteen mukana tuli usein myös muiden sienien DNA:ta. Puhdistus tapahtui leikkaamalla DNA- juosteet irti DGGE- geelistä. Irti leikattu DNA- juoste eluoiitiin vuorokauden ajan 100 µl:aan tislattua vettä, jonka jälkeen voitiin eluoituneesta DNA:sta tehdä uusi PCR. Uudelleen monistettu PCR- tuote ajettiin DGGE. geeliin ja leikattiin uudestaan irti geelistä. Nämä vaiheet toistettiin niin monta kertaa kunnes DGGE- geelissä olevassa näytteessä ei enää näkynyt muita DNA- juosteita, jotka olisivat voineet vaikuttaa sekvensointi tuloksiin. (Liite 2)

Sekvensoitavien näytteiden kokonaismääräksi tuli 42 näytettä. Tarkoituksena oli sekvensoida näytteiden ITS1 alue 5' ja 3' suunnasta käyttäen ITS1F- sekä ITS2- alukkeita.

Näytteiden lähetys sekvensointiin

Näytteiden sekvensointi tehtiin Etelä- Koreassa Seoulin kaupungissa yrityksessä nimeltä Macrogen. Näytteet jotka valittiin sekvensoitaviksi, monistettiin vielä kerran alukeparilla ITS1F-ITS2. PCR:n onnistuminen tarkistettiin 1 %:ssa agarosigeelissä, jonka jälkeen PCR- tuote puhdistettiin puhdistuskitillä, jotta sekvensointia haittaavat aineet saatiin poistettua. Puhdistuskittinä oli High pure PCR product purification kit

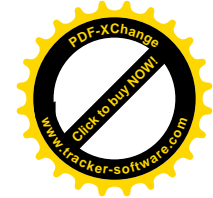
Pakkaus sisälsi seuraavat osat:

Liuokset

Sidontapuskuriliuos

Pesupuskuriliuos

Eluointipuskuriliuos.



Putket

High Pure- suodatinputki (50 kpl)

Keräysputki (50 kpl)

Aluksi 100 µl:aan PCR- tuotetta lisättiin 500 µl sidontapuskuria, jonka jälkeen seosta sekoitettiin Eppendorf- putkessa. Seos siirrettiin High Pure- suodatinputkeen ja puhdistettiin PCR- tuote alla olevan (ks. TAULUKKO 6.) taulukon mukaisesti.

TAULUKKO 6. PCR- tuotteen puhdistus vaiheet.

Vaihe	Aika	Lisäys (µl)
1 Sentrifugointi	1 min./13000 G	
2 Läpi tullut neste heitetään pois		
3 Pesupuskuriliuos lisäys		250
4 Sentrifugointi	1 min./13000 G	
5 Läpi tullut neste heitetään pois		
6 Pesupuskuriliuos lisäys		100
7 Sentrifugointi	1 min./13000 G	
8 Läpi tullut neste heitetään pois		
9 Eluointipuskuriliuoksen lisäys		50

Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen keräysputkeen saatiin puhdistettu PCR- tuote.

Puhdistuksen jälkeen näytteet säilöttiin 1,5 ml:n Eppendorf- putkiin. MacroGen tarvitsi tiedot näytteiden nimistä, näytteiden konsentraatioista, ssekvensointireaktiossa käytettävistä alukkeista, alukkeiden konsentraatiosta, tuotteen emäspituudesta sekä alukkeiden sekvenssistä.

Näytteiden konsentraatiot mitattiin NanoVue spektrofotometrillä, jonka jälkeen putket pakattiin lähetystä varten kuoreen. Fed-Ex toimitti lähetyksen Koreaan.

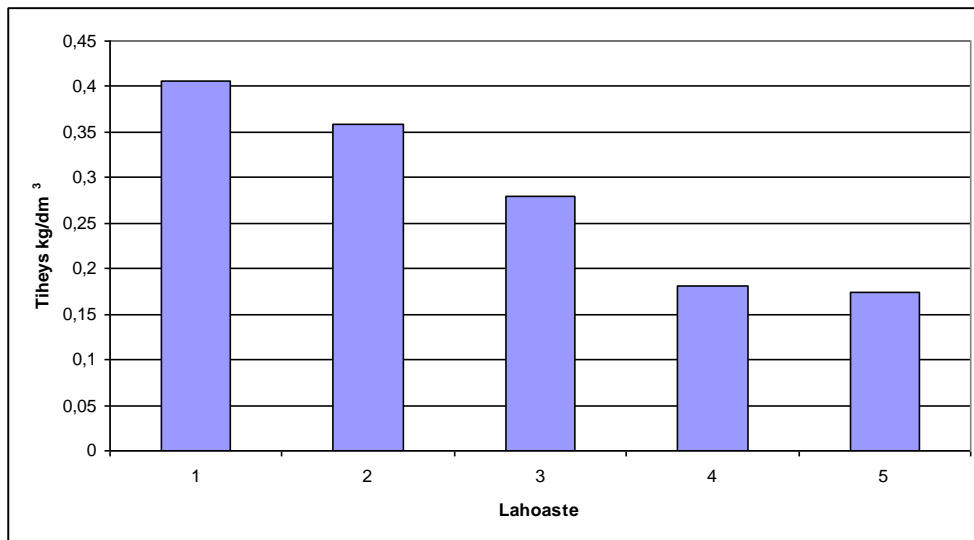
MacroGen lähetti tiedot sekvensseistä, jotka muokattiin Geneious- ohjelmalla. Kunkin näytteen vastinjuosteet linjattiin ja niistä muodostettiin konsensussekvenssi. Konsensussekvenssin 5'- (ITS1F-alukkeen sitoutumiskohta), sekä 3'- päästä (ITS2-alukkeen sitoutumiskohta) poistettiin huonolaatuiset ja epäluotettavat jakson, ja sekvensseistä korjattiin emäksiä, joita automaattisesti ei ollut saatu tunnistettua oikein. Siivotut sekvenssit rinnastettiin geenipankin nukleotidisekvenssietokantaan (NCBI, National

Center of Biotechnology Information). Tietokannasta saatiin jokaiselle sekvenssille lähimmät lajit. Näitä lajeja tarkastellaan TULOKEK- osiossa.

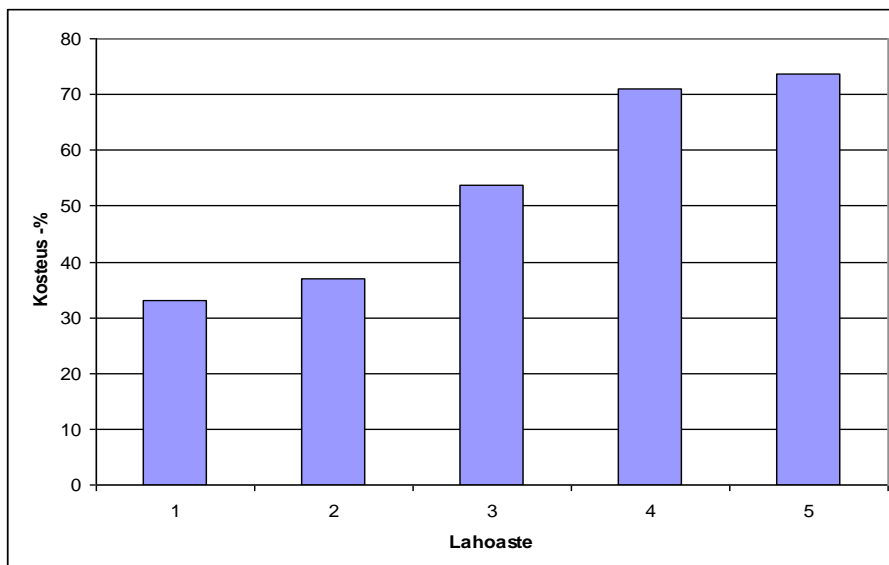
7 TULOKEKSET

7.1 Puun laadun muutos lahosuknessiossa

Kuviosta 8. voidaan nähdä, että lahopuiden tiheys pieneni mitä pidemmälle lahoaminen oli edennyt. Kuviosta 9. nähdään, että lahoamisen edetessä pidemmälle lahoonneiden puiden kosteus lisääntyi. (Ks. KUVIO 8. & 9.)



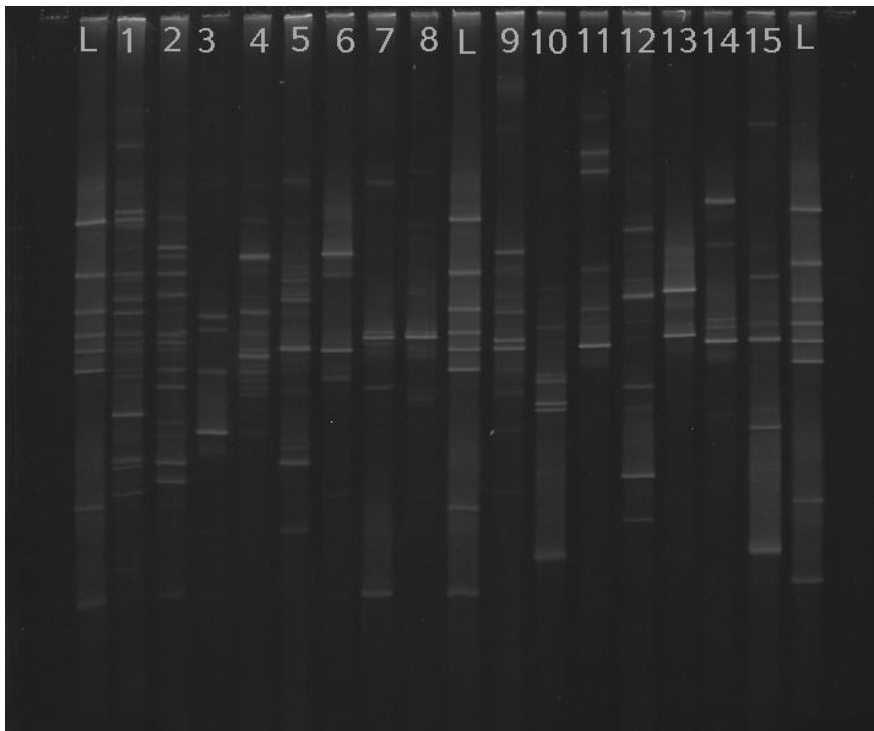
KUVIO 8. Lahopuiden tiheys lahoasteen funktiona



KUVIO 9. Lahopuiden kosteus lahoasteen funktiona

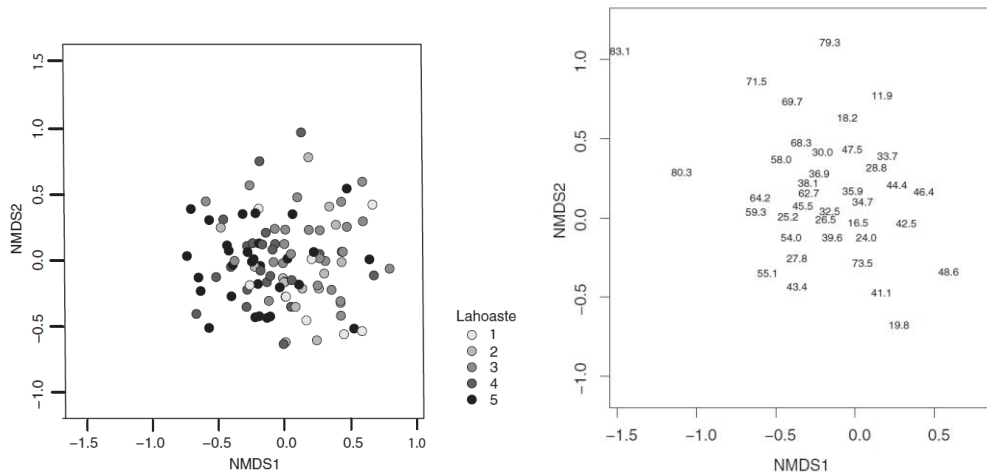
7.2 Sieniyhteisörakenteen muutos lahosuknessiassa

DGGE menetelmä erotteli lahoppuunäytteen sienilajit siten, että DNA sekvenssiltään eri lajit näkyivät värjättyssä geelissä eri kohtiin kulkeutuneina juovina. (Ks. KUVIO 10.)



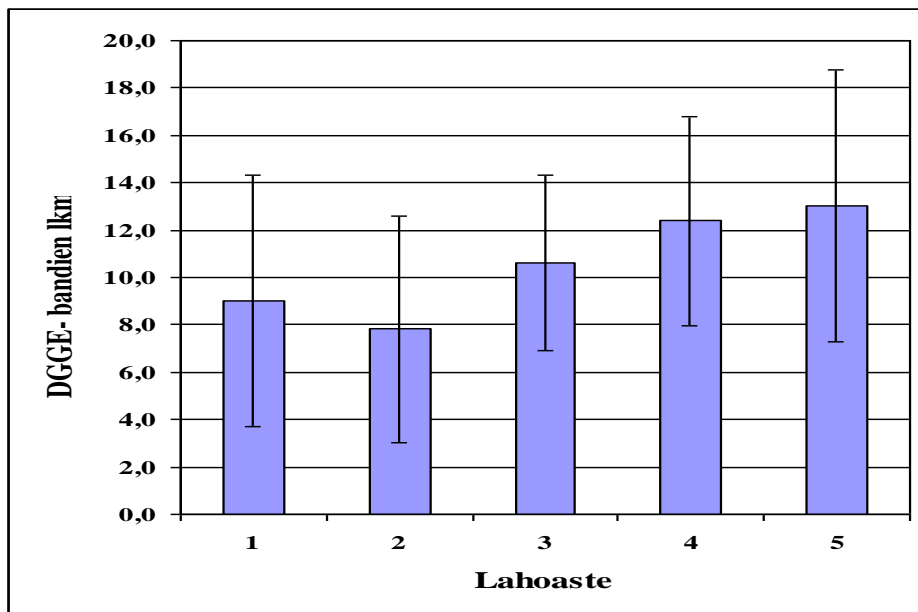
KUVIO 10. DGGE-geelikuva. Näytteet 1-15, sekä L- kirjaimilla merkityt DGGE-ladderit.

Sieniyhteisörakennetta lahoavissa puun rungoissa analysoitiin ei-parametrisella moniulotteisella skaalauksella (non-metric multidimensional scaling, NMDS). Menetelmä ryhmitteli puun rungot ordinaatiokuvaan niiden sienilajiston samankaltaisuuden perusteella. Sienilajistoltaan samanlaiset lahoppuut olivat lähellä toisiaan, ja sienilajistoltaan erilaiset lahoppuut kaukana toisiltaan (Ks. KUVIO 11a.). Kuvasta 11a. nähdään, että lahoppuut olivat ryhmittyneet osittain lahoasteen mukaan sienilajiston perusteella. Menetelmällä tehtiin myös kuvio, joka ositti mitä sienilajeja (OTU -luku) puutukeissa tyypillisesti esiintyi (Ks. KUVIO 11b.).

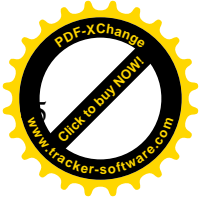


KUVIO 11. Lahopuiden NMDS- sovitus niiden lahottajasiemien yhteisö rakenteiden perusteella (a.) sekä sienilajien (OTU-arvot) ryhmittymisen ordinaatioon (b.).

Lahoasteilla 1-2 olevien lahoppukiekkujen sienilajistot olivat pääsääntöisesti ryhmityneet lähelle toisiaan. Myös lahoasteilla 3-5 olevien lahoppukiekkujen sienilajistot olivat ryhmityneet lähemmäs toisiaan. Tästä voitiin sanoa että lahoasteilla 1 ja 2 olevien purunäytteiden sienilajistojen diversiteetti ja/tai lajistorakenne oli samankaltaista. Puolestaan lahoasteilla 3-5 olevien purunäytteiden yhteisö rakenne oli samankaltaista. Eri lahoasteilla olevien puunäytteiden lahottajasiemien lukumäärää analysoitiin myös. (Ks. KUVIO 12.)



KUVIO 12. Sieniyhteisö rakenteen muutos lahossukessiossa (keskiarvo±keskihajonta SD). Kuviossa 12. nähdään, että lahoasteen 5 puun rungoissa lahottajasiemiä oli keskimääräisesti eniten, kun taas lahoasteen 2 puissa sieniä oli vähiten.

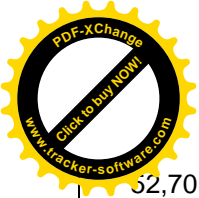


7.3 Sienilajisto lahpuussa

Lajinimiä etsittäessä nukleotidisekvenssitietokanta antoi joidenkin sekvenssien kohdalla lajinimeksi ”uncultured fungus”. Tietokanta kuitenkin antoi osuvimmat vaihtoehdot joista nähtiin prosentuaalisesti sekvenssien täsmävyys. Suurimmalle osalle lajeista löydettiin täydellinen suomenkielinen nimi. Lajeille joille ei löydetty koko suomenkielistä nimeä annettiin suvun nimi. Alla olevaan taulukkoon (ks. TAULUKKO 7.) on listattu tutkimuksessa löydettyjä lahottajasieniä. Taulukosta ilmenee OTU- luku, joka viittaa lajin kulkeutumaan matkaan DGGE- geelissä, lahoaste sekä lajien latinan- sekä suomenkieliset lajinimet. Lajinimet on listattu lahoasteen 1-5 mukaan.

TAULUKKO 7. Lahottajasienten latinankieliset sekä suomenkieliset lajinimet

OTU- luku	Lahoaste	Lähin laji NCBI- sekvenssitietokannassa	Täsmävyys (%)	Suomenkielinen nimi
28,80	1	<i>Coniophora olivacea</i>	86	Tummakesikkä
47,50	1	<i>Phellinus nigrolimitatus</i>	99	Aarnikäpää
46,40	2	Uncultured fungus	99	
35,90	2	<i>Oxyporus corticola</i>	99	Tattiainen
53,70	2	<i>Coniophora olivacea</i>	98	Tummakesikkä
65,90	2	<i>Lecythophora</i>	93	
19,80	2	<i>Resinicium bicolor</i>	100	Maitotahra
49,60	3	<i>Phellinus viticola</i>	98	Riukukääpää
25,20	3	<i>Pseudoplectania nigrella</i>	93	Sysimaljakas
32,50	3	<i>Pseudomerulius curtisii</i>	98	Rypykkä
54,00	3	<i>Russula bicolor</i>	98	Hapero
44,40	3	<i>Russula decolorans</i>	97	Kangashapero
43,40	3	Sekvenssointi epäonnistunut		
39,60	3	<i>Serpula himantioides</i>	98	Suklaakesikkä
21,60	3	<i>Coniophora prasinoides</i>	98	Kesikkä
24,00	3	<i>Amylocorticium subsulphureum</i>	86	Rikkivanukka
41,10	3	<i>Serpula himantioides</i>	98	Suklaakesikkä
58,00	3	<i>Amylostereum areolatum</i>	98	Paksunahakka
26,50	3	<i>Galerina</i> sp.	99	
30,00	4	<i>Phialophora</i>	99	
18,20	4	<i>Candida ergastensis</i>	97	Hiiva
50,60	4	Uncultured ascomycete	98	Kotelosieni
48,60	4	<i>Heterobasidion parviporum</i>	97	Juurikäpää
27,80	4	<i>Amanita pseudoinculta</i>	100	Kärpässieni



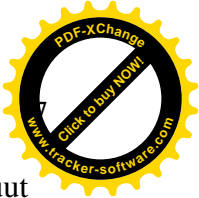
52,70	4	Russula vinosa	100	Viinihapero
45,50	4	Russula	99	Hapero
51,70	4	Russula vinosa	99	Viinihapero
42,50	4	Uncultured Piloderma	98	Orvakka
60,70	5	Pycnoporellus fulgens	81	Rusokääpä
61,60	5	Russula sanguinea	92	Verihapero
38,10	5	Trichoderma atroviride	99	Home
38,10	5	Lecythophora	100	
55,10	5	Russula bicolor	98	Hapero
59,30	5	Uncultured fungus/Ascomycota	98	Kotelosieni
60,70	5	Uncultured fungus/Ascomycota	100	Kotelosieni
62,70	5	Uncultured fungus/Ascomycota	95	Kotelosieni
68,30	5	Uncultured Pezizomycotina	96	Kotelosieni
56,10	5	Exidia glandulosa	100	Nystyhytykkä
22,70	5	Saccharomycetes	97	Hiiva
64,20	5	Uncultured Russula/Russula bicolor	91	Hapero
36,90	5	Cortinarius	100	Seitikki
31,00	5	Trichoderma atroviride	98	Home

8 PÄÄTELMÄT

Työn tavoitteena oli selvittää Vesijaon luonnonsuojelualueen lahottajasienien monimuotoisuus lahoavassa puussa, sekä lahoasteen vaikutus lajiston monimuotoisuuteen, lahopuiden tiheyteen ja kosteuteen. Lajiston monimuotoisuus saatiin selville ja tulos tuki hypoteesia, jossa lajisto ryhmittyy lahoasteen mukaan ryhmiksi joissa lahoasteella 1-2 olevat lajit ovat ryhmittyneet lähelle toisiaan sekä lahoasteella 3-5 olevat lajit ovat ryhmittyneet lähelle toisiaan. Tutkimuksessa todettiin, että lahottajasienien määrä oli suurinta pitkälle lahonneissa puissa. Tämä johtuu siitä, että maassa elää paljon eri lahottajia, jotka siirtyvät vähitellen maassa makaavaan puun runkoon. Pitkälle lahonneissa puissa lahottajien määrä on tämän vuoksi suurin ja kattavin. Tiheys muuttui pienemmäksi mitä pidemmälle lahoaminen oli edennyt puussa. Kosteus sen sijaan kasvoi lahon edetessä puussa.

Lajiston sukkessio

NMDS- sovitusten perusteella voidaan sanoa, että lajisto muuttui lahon edetessä. Tulokset tukivat tutkimuksen hypoteesia siten, että puut joiden lahottajasienilajisto on



samankaltainen ryhmittyvät lähelle toisiaan. Tutkimuksessa kävi myös ilmi, että puut joiden lahoaste on lähellä toisiaan ryhmittyvät lähelle toisiaan. NMDS- sovitusten perusteella hajonta on hieman suurempaa kuin oletettiin, mutta NMDS- sovituksista nähdään selvää ryhmittymistä lajien sekä lahoasteiden välillä. Sienilajisto oli koealalla olevissa lahopuissa hyvin monimuotoista. Vähän lahonneissa rungoissa on erilainen sieniyhteisö verrattuna pitkälle lahonneisiin puihin. (Ks. 2.4 Sienet eliöinä)

Lajiston diversiteetti

Sienilajien lukumäärä oli kaikkein suurimmillaan lahosukcession loppuvaiheessa, jolloin lahoasteen 5 lahottajasieniä esiintyy puussa eniten. Tämä tulos oli samanlainen kuin Rajala, Peltoniemi, Hantula, Mäkipää, Pennanen (2011) tutkimuksessa, jossa lahottajasienten suknessiota tutkittiin RNA-analyysien avulla. Tämä tulos on vastoin tutkimuksen hypoteesia, jossa oletettiin lajiversiteetin olevan suurimmillaan lahoamisen keskivaiheella (Stenlid ym. 2008), jolloin lahotusnopeus on suurimmillaan (Mäkinen ym. 2008). Lahottajasienien diversiteetti on kuitenkin loogisesti ajateltuna suurinta lahoasteen 5 puussa, jolloin lahoaminen on pisimmillään sekä maasta siirtynyt maassa makaavaan puuhun kokoajan enemmän lahottajasieniä. Tällöin lahoaminen oli nopeinta.

Lajiston tunnistus

Lajinimiä etsittäessä löydettiin myös mykorrhizasieniä, jotka ovat juurisieniä. Mykorrhizasieniin kuului mm. Russula- sukuun kuuluvat sienet, jotka ovat haperoita. Tämä löytö oli mielenkiintoinen havainto, sillä haperoita ei yleensä esiinny suhteellisen kovassa puussa. Lajistosta löydettiin myös juurikäppää, joka on maamme metsissä pahin patogeenisieni. Se aiheuttaa metsäteollisuudelle vuosittain 15-35 miljoonan euron tappiot heikentämällä puidenlaatua ja tappamalla niitä. (Rotstop n.d. Verkkosivut)

Lajinimien selvittäminen oli osittain hidasta mutta lajinimiä saatiin hyvin. Osalle näytteistä saatiin tulokseksi tuntematon sienilaji, koska siitä seuraavan lajin sekvenssin täsmävyys tutkittavaan sekvenssiin oli niin heikko että tulokseen ei voitu luottaa tarpeeksi. Sekvensointituloksia verrattaessa nukleotidisekvenssitietokantaan huomattiin, että kaikille sekvensseille ei NCBI:n tietokannassa ollut lajinimeä, jolloin tietokanta merkitsi lajin tuntemattomaksi. Samanlaisen ongelman havaitsivat myös Rajala, Peltoniemi, Hantula, Mäkipää, Pennanen (2011). Lajien tunnistusongelmat johtuivat siitä,



ettei kyseiselle sienelle löytynyt täsmäävää sekvenssiä sekä siitä, että suuri osa sienisekvensseistä vielä puuttuu tietokannasta. Näissä tapauksissa tulokseksi kirjattiin tuntematon sienilaji. Lajinimien selvittäminen tehtiin loppuvaiheessa tämän opinnäytetyön valmistumista, jotta saataisiin mahdollisimman uudet tiedot geenipankissa olevista sekvensseistä. Vain murto-osa sienistä on kuvattu ja nimetty, joten geenipankin sekvenssitietojen päivittyessä nämä tuntemattomat sienilajit voidaan mahdollisesti myös nimetä.



LÄHTEET

Ali-Kovero, H. 2008. Sieni- DNA:n eristys ja lajistotutkimus lahoppuupurusta. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu, Metropolia, Tekniikan ja liikenteen toimiala, Laboratorioalan koulutusohjelma.

Beta kookas 2010. Eliölajit ja ekologia. Verkkosivut.
<http://www.kookas.fi/articles/read/7315>.

Bio-Rad Laboratories. 1996. The DCode universal mutation detection system. Catalog numbers 170-9080 through 170-9104. Bio-Rad:in DGGE-manuaali. Bio-Rad.

Fengel, D. & Wegener, G. 1989. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. de Gruyter.

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.

Hotanen, J-H., Nousiainen, H., Mäkipää, R., Reinikainen, A., Tonteri, T. 2008. Metsätyypit - opas kasvupaikkojen luokitteluun. Metsäkustannus Oy.

Kurkela, T. 1994. Metsän taudit, metsäpatologian perusteet. Otatieto Oy.

Laanto, L. 2003. Nukleiinihappojen eristys neulaskarikkeesta. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu, Metropolia, Tekniikan ja liikenteen toimiala, Laboratorioalan koulutusohjelma.

Metsien monimuotoisuus. Metsäntutkimuslaitos. 1998. Metsäntutkimuslaitoksen verkkosivut. Viitattu 30.3.2011. <http://www.metla.fi/julkaisut/mt/670/metsmoni.htm>.

Metsäteollisuus ry. 2011. Metsäteollisuus tietopalvelun verkkosivut. Mitä biodiversiteetti on? <http://www.metsateollisuus.fi/Infokortit/biodiversiteetti/Sivut/default.aspx>.

Metsätyypit. Metsäverkko. Metsäverkon verkkosivut. Viitattu 30.3.2011.
<http://virtuoo.si.pkky.fi/metsaverkko/metsaekologia/metsatyypit/index.htm>.

Metsäverkko. 2001-2002. Metsäverkon verkkosivut.
<http://virtuoo.si.pkky.fi/metsaverkko/metsaekologia/monimuotoisuus.htm>, tekijänoikeus.



Tonteri, T & Siitonen, J. 2001. Lahopuu talousmetsissä valtakunnan metsien 9. investoinen tulosten mukaan – vertailu luonnometsiin. Kirjassa: Monimuotoinen metsä. Metsäluonnon monimuotoisuuden tutkimusohjelman loppuraportti. Siitonen, J (toim.) Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 812. Metsäntutkimuslaitos.

Renvall, P. 2005. Sienten ekologiaa. Metsät. Kirjassa: Suomen helttasienten ekologia, levinneisyys ja uhanalaisuus. Salo, P., Niemelä, T., Nummela-Salo, U. & Ohenoja, E. (toim.). Suomen ympäristö 769. Suomen ympäristökeskus. Helsinki.

Kasanen, R. 2009. Metsäpuiden sienitaudit. Metsäkustannus Oy.

Lahti, K & Rönkä, A. 2006. Ympäristöekologia. Verkko-oppimateriaalit. Helsinki: WSOY.

Müller, M. 2001. Mikrobiston merkitys ja monimuotoisuus pohjoisissa havumetsissä. Kirjassa: Metsäluonnon monimuotoisuuden tutkimusohjelman loppuraportti. Siitonen, J. (toim.) Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 812. Metsäntutkimuslaitos.

Mäkinen, H., Hynynen, J., Siitonen, J. & Sievänen, R. 2006. Predicting the decomposition of Scots pine, Norway spruce, and birch stems in Finland. Ecological applications. 16, 1865-1879.

Niemelä, T. 2005. Käävät, puiden sienet. Norrlia 13. Helsingin yliopisto.

Rajala, T. 2011. Biologi FT, Metsäntutkimuslaitos. Haastattelu 21.4.2011.
Rajala, T., Peltoniemi, M., Hantula, J., Mäkipää, R. & Pennanen, T. 2011. RNA reveals a succession of active fungi during the decay of Norway spruce logs. Fungal Ecology, painossa.

Stenlid, J., Penttilä, R. & Dahlberg, A. 2008. Wood-decay basidiomycetes in boreal forests: Distribution and community development. Kirjassa: Ecology of saprotrophic basidiomycetes. Boddy, L., Frankland, J.C. & van West, P. (toim.) Elsevier.

Suominen, I. & Ollikka, P. 1999. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Opetushallitus.

Vainio, E., Korhonen, K. & Hantula, J. 1998. Genetic variation in *Phlebiopsis gigantea* as detected with random amplified microsatellite (RAMS) markers. Mycological Research 102: 187 – 192.

Rotstop. Verdera Oy. n.d. Juurikäätä. <http://www.rotstop.fi/juurikaapa/>



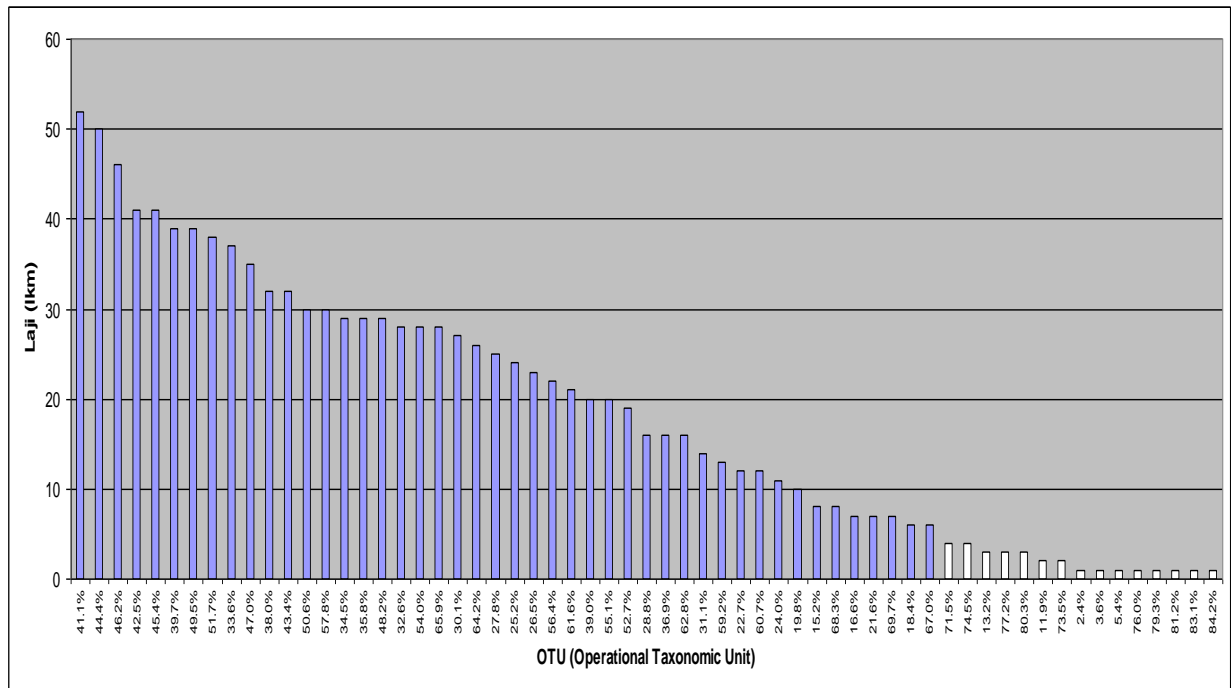
Virtuaalinen metsäkoulu. 2011. Viitattu. 22.9.2011.
<http://www.pirkanmaanmetsat.fi/metsakoulu/monimuot.php>.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Kirjassa: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. S. & White, T. J. (toim.) Academic Press.

Yli-Kojola, H. & Kujala, M. 1995. Pysyvien koealojen 3. mittaus. Maastotyöohjeet. Metsäntutkimuslaitos.

LIITTEET

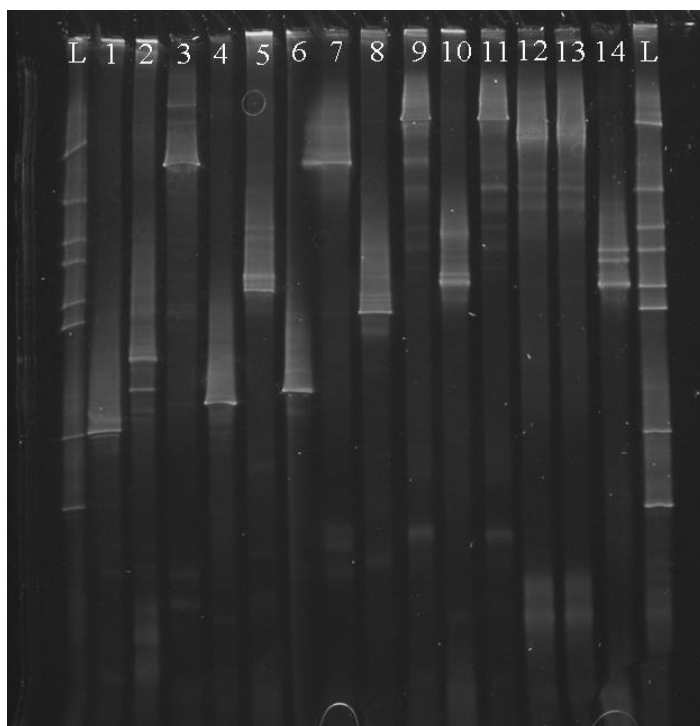
Liite 1. Sekvensoitavat näytteet.



OTU- arvo (Operational Taxonomic unit) kuvaa yksilöllistä lahottajasienilajia. Sini- sellä merkityt pylväät kuvaavat näytteitä, jotka sekvensoitiin. Pylväiden korkeus ku- vaa näytteessä esiintyneiden lahottajasienien lukumäärää. Valkoiset pylväät kuvaavat näytteitä, joita ei otettu sekvensointiin mukaan. Valkoisella merkattujen lajidi- versiteetti oli heikointa.



Liite 2. Kuva DGGE- geelistä sekvensointia varten puhdistetuista näytteistä.



1-14. Näytteissä 2, 5,10 sekä 14 näkyy useampi DNA- juosteet, joita puhdistettiin vielä lisää. Laidoissa L- kirjaimilla merkityt markkerit.