



Maria Pumppu

# DSE-sienten lajinmääritys sekä lämpötilan ja veden saatavuuden vaikutukset kasvuun

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

29.1.2025

# Tiivistelmä

Tekijä:	Maria Pumppu
Otsikko:	DSE-sienten lajinmääritys sekä lämpötilan ja veden saata- vuuden vaikutukset kasvuun
Sivumäärä:	44 sivua + 5 liitettä
Aika:	29.1.2025
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat:	Tutkija Suvi Sutela Lehtori Tiina Soininen

---

Opinnäytetyön tavoite oli tuottaa uutta tietoa DSE (Dark Septate Endophytes) -sienistä, jotka kasvavat isäntäkasvin solujen sisällä tai välissä. Lisäksi tutkittiin ilmastonmuutoksen vaikutusta DSE-sienten kasvuun. Opinnäytetyössä pyrittiin myös määrittämään metsäkasvien juurista eristettyjen sieni-isolaattien lajit molekyyliomenetelmiä käyttäen.

Yhteensä 47 sieni-isolaatin puhtasviljelmistä eristettiin DNA, jota käytettiin templaattina PCR-reaktiossa. Sieni-isolaattien genomista monistettiin ITS2- ja EF-alueita, jotka lähetettiin puhdistuksen jälkeen sekvensoitavaksi. Editoituja sekvenssejä verrattiin toisiinsa National Center for Biotechnology Information (NCBI) ylläpitämällä BLAST-ohjelmalla (parittaiset sekvenssirinnastukset), minkä jälkeen erilaisille sekvensseille suoritettiin haut käyttäen kahta sekvenssitietokantaa.

Opinnäytetyössä toteutettiin DSE-sienten kasvatuskoe NaCl- ja PEG-kasvatusmaljoilla, joiden tarkoituksena oli selvittää osmoottisen ja matriisistressin vaikutuksia neljän eri sieni-isolaattien kasvuun. NaCl- ja PEG-kasvatusmaljoja inkuboitiin +15°C:n ja +25 °C:n lämpökaapeissa neljän viikon ajan. Kasvua seurattiin viikoittain ja kerättyä aineistoa analysoitiin tilastollisesti.

Yhteensä 15 sieni-isolaatin määrittäminen onnistui sukutasolle käyttäen kahta eri geenialuetta. Kasvatuskokeen tulosten perusteella sieni-isolaattien kasvu oli nopeampaa +25 °C:ssa. Yleisesti sekä NaCl että PEG hidastivat sienten kasvua erityisesti suuremmissa konsentraatioissa, joskin tilastollisesti merkittävässä tuloksissa havaittiin eroja sieni-isolaattien välillä. Tulosten perusteella korkeammat lämpötilat voivat nopeuttaa juuriendofyyttisienien kasvua, mikäli veden saatavuus ei samalla heikenny.

Avainsanat:	DSE-sienet, sienten lajintunnistus, kasvatuskoe, PCR, sekvensointi
-------------	--

---

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

## Abstract

Author: Maria Pumppu  
Title: Species identification of DSE fungi and the effects of temperature and water availability on growth  
Number of Pages: 44 pages + 5 appendices  
Date: 29 January 2025

Degree: Bachelor of Engineering  
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering  
Professional Major: Biotechnology and Food Engineering  
Supervisors: Suvi Sutela, Research Scientist  
Tiina Soininen, Senior Lecturer

---

The aim of the thesis was to provide new information about DSE (Dark Septate Endophytes) fungi that grow inside or between cells of the host plant. In addition, the impact of climate change on the growth of DSE fungi was investigated. The thesis also aimed to determine the species of fungal isolates isolated from the roots of forest plants using molecular methods.

DNA was isolated from pure cultures of 47 fungal isolates and used as template in the PCR reaction. ITS2 and EF regions were amplified from the fungal isolate genomes and sent for sequencing after purification. The edited sequences were compared with each other using BLAST (pairwise sequence alignment) software maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI), followed by searches for different sequences using two sequence databases.

In this thesis, DSE fungi were grown on NaCl and PEG culture dishes to investigate the effects of osmotic and matrix stress on the growth of four different fungal isolates. The NaCl and PEG culture dishes were incubated at +15°C and +25°C in thermal chambers for four weeks. Growth was monitored weekly, and the data collected were statistically analyzed.

A total of 15 fungal isolates were successfully quantified at genus level using two different gene pools. On the basis of the results of the growth experiment, the growth of the fungal isolates was faster at +25°C. In general, both NaCl and PEG retarded fungal growth, especially at higher concentrations, although statistically significant differences in results were observed between fungal isolates. The results suggest that higher thermal temperatures may accelerate the growth of root endophytic fungi, if water availability is not impaired.

Keywords: DSE-fungi, fungal species identification, mushroom cultivation experiment, PCR, sequencing

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Sienilajin tunnistaminen	2
2.1	Sienten taksonomia	5
2.2	Sienilajin tunnistus DNA-sekvenssianalyysin perusteella	7
2.2.1	Sienen genomi ja geenitunnisteet	8
2.2.2	Sekvenssitiedon käsittely	11
3	Abioottisten tekijöiden vaikutus sienten kasvuun	12
3.1	Endofyyttisienien ekologia	12
3.2	DSE-sienet	14
3.3	Lämpötilan vaikutus sienten kasvuun	16
3.4	Veden vaikutus sienten kasvuun	17
4	Materiaalit ja tutkimusmenetelmät	18
4.1	Työssä käytetyt DSE-sieni-isolaatit	18
4.2	Genomisen DNA:n eristys DSE-sieni-isolaateista	19
4.3	DSE-sieni-isolaattien esikäsittely ja PCR-reaktio	20
4.4	Agaroosigeelielektroforeesi	21
4.5	PCR-tuotteiden puhdistus ja sekvenssien lähetys	22
4.6	Neljän DSE-sieni-isolaatin kasvatuskoe	22
4.7	Kasvun määrittäminen ja tilastollinen tarkastelu NaCl- ja PEG-kasvatusmaljoilta	24
5	Tulokset	25
5.1	PCR-tulokset	25
5.2	DSE-sieni-isolaattien kasvu ja tilastollinen tarkastelu NaCl-kasvatusmaljoilla	26
5.3	DSE-sieni-isolaattien kasvu ja tilastollinen tarkastelu PEG-kasvatusmaljoilla	31
5.4	DSE-sieni-isolaattien ITS- ja EF-sekvenssit	36
6	Johtopäätökset	37
	Lähteet	40

## Liitteet

Liite 1: WP0-, WP1-, WP2-, WP3-, ja WP4-petrimaljojen komponenttien määrät

Liite 2: NaCl- ja PEG-liuosten valmistus ja kasvatusmaljojen valaminen

Liite 3: DSE-sieni-isolaattien agaroosigeelikuvat

Liite 4: Ei-parametristen tilastotestien taulukot

Liite 5: Sekvenssitaulukot

## Lyhenteet

DSE: Dark Septate Endophytes. Tummväliseinäiset endofyyttisienet, jotka elävät isäntäkasvin solujen sisällä tai välissä.

TAE: Tris-asettaatti-EDTA-puskuri. Käytetään ajoliuoksena agarosigee-  
lielektroforeesissa.

PDA: Perunadekstroosiagar. Yksi NaCl-maljan komponenteista.

PEG: Polyetyleeniglykoli. Käytetään kasvatusmaljan matriisipotentialin  
säättämiseen.

# 1 Johdanto

DSE (Dark Septate Endophytes) -sienet eli tummaväliseinäiset endofyyttisienet ovat mykorrhizasientien ohella yleisempiä sieniryhmiä, jotka elävät isäntäkasvin solujen välissä tai sisällä. Ne elävät usein symbioottisessa suhteessa isäntäkasvin kanssa. DSE-sienet muodostavat isäntäkasvin juurissa melaniinia sisältäviä mikrosklerotioita, jotka tekevät rihmastosta kuivuutta ja muita stressitekijöitä kestäviä. DSE-sienet ovat endofyyttisieniä, jotka eivät aiheuta näkyviä oireita isäntäkasville. Tummaväliseinäiset sienet parantavat isäntäkasvin kykyä selviytyä haastavissa ilmasto-olosuhteissa. DSE-sienten käyttö kasvien tuoton ja terveyden lisäämisessä sekä hiilensidonnassa on herättänyt kaupallista kiinnostusta maa- ja metsätaloudessa. DSE-sienten ekologiaa ei tunneta täysin, ja koikeita ja tutkimuksia tulisi tehdä enemmän. [1, s. 1–9.]

Opinnäytetyön tavoite oli tuottaa uutta tietoa DSE-sienistä ja selvittää ilmaston lämpenemisen vaikutusta niiden kasvuun. Työhön valittiin neljä eri DSE-sieni-isolaattia kantakokoelmasta ja työssä selvitettiin kokeellisesti, miten lämpötila ja veden saatavuus vaikuttivat isolaattien kasvuun. Lisäksi työssä selvitettiin DSE-sienten lajit sekvensoimalla kahta eri geenialuetta vertaamalla Mycobank- ja NCBI-tietokantojen sekvensseihin. Neljällä eri DSE-sieni-isolaatilla toteutettiin neljän viikon kasvatuskoe kahdessa eri lämpötilassa NaCl- ja PEG-petrimaljoilla, joilla rajoitettiin veden saantia. Isolaattien kasvu määritettiin digitaalipianometrillä pinta-aloina, ja aineisto tarkasteltiin tilastollisesti.

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Luonnonvarakeskus Oy (Luke), joka on maa- ja metsätalousministeriön alainen tutkimuslaitos. Luonnonvarakeskus pyrkii tuottamaan tutkimustietoon perustuvia ratkaisuja ja kehittämään kestäväää sekä kilpailukykyistä elinkeinotoimintaa. Luonnonvarakeskus ratkoo uusiutuvien luonnonvarojen kestävään ja kannattavaan käytön haasteita. Tutkimushankkeita on vuosittain meneillään noin 800. Luke toimii 22 eri toimipaikassa Suomessa ja sen pääpaikka on Helsingin Viikissä. Opinnäytetyö toteutettiin Viikin kampuksella Luonnonvarakeskuksen laboratoriotiloissa. [2.]

## 2 Sienilajin tunnistaminen

Sienikunta on toiseksi suurin eukaryoottinen eliökunta, johon nykytiedon mukaan on arvioitu kuuluvan 2,5 miljoonasta 19 miljoonaan sienilajia [3, s. 4]. Sienet ovat monisoluisia tai yksisoluisia eliöitä, jotka lisääntyvät pääasiassa suvullisesti ja suvuttomasti. Ne ovat heterotrofeja eli toisenvaraisia eliöitä, joilla ei ole sisäistä ruoansulatusta. Sienet erittävät kasvualustaansa entsyymejä, joiden pilkkomat ravintoaineet imeytyvät niiden solujen sisälle. Sienet toimivat hajottajina erilaisissa maaperäekosysteemeissä. Sienet hajottavat kuollutta ainespe-  
rää, ja näin kierrättävät ravinteet maaperässä uudelleen käytettäväksi. Sieniä esiintyy maan kaikissa ekosysteemeissä. [4.]

Sieniä voidaan luokitella erilaisiin ryhmiin niiden ominaisuuksien perusteella. Niiden tyypillisempiä ominaisuuksia ovat esimerkiksi ulkonäkö, ravinnonotto-  
tapa, lisääntymismekanismi ja symbioosisuhteen laatu [5]. Sienten välillä pyri-  
tään löytämään yhtäläisyyksiä, jotta ne voidaan luokitella kuuluvaksi samaan  
muotoryhmään. Muotoryhmät ovat esimerkiksi kantasienissä haarakkaat, helтта-  
sienet, hyytelösienet, kupusienet, käävät, orvakkaat ja kotelosienissä maljak-  
kaat. Muotoryhmiä voidaan hyödyntää sienten yleisessä kuvailussa, vaikka ne  
eivät kerro sienten välisestä geneettisestä sukulaisuudesta ja vaihtelusta mi-  
tään. [6, s. 14.]

Sienten luokittelu perustui 1700-luvulta 1900-luvun puoliväliin saakka morfologi-  
siin, anatomisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin. Yleisin morfologinen ominaisuus,  
jota sienissä tutkitaan, on itiöiden muodostus. 1950-luvulla mikroskoopin tekni-  
kan kehittymisen myötä päästiin tutkimaan tarkemmin sienten solutason raken-  
teita, kuten esimerkiksi itiöiden väriä, muotoa ja pintakuviointia. Sienten luokit-  
telu pelkästään morfologisten ominaisuuksien perusteella ei ole luotettavaa,  
koska kaikille ryhmille on vaikeaa löytää yhteisiä ominaisuuksia. Tämän lisäksi  
ominaisuuksien tulkinnanvaraisuus. Ennen 1960-lukua sienet luokiteltiin kuulu-  
van kasveihin. Ne kuitenkin tunnustettiin omaksi eliökunnaksi muun muassa so-  
lurakenteen ja ravinnonottotavan perusteella. [6, s. 14.]

1990-luvun alussa sienten lajinkartoituksessa tapahtui mullistus, kun ensimmäiset tuman ribosomaalisen deoksiribonukleinihapon (DNA) emäsjärjestysten vertailuun perustuvat eliöiden sukulaisuussuhteiden analyysit ilmestyivät. Vasta 2000-luvun ensimmäisen vuosikymmenen lopussa yleistyivät moneen geenialueeseen perustuvat analyysit. Näinä aikoina käynnistettiin Deep Hypha Research Coordination Network (2001–2006) -hanke, joka keskittyi tutkimaan sienten varhaisempien kehityslinjojen evoluutiota. Toinen hanke oli nimeltään Assembling Fungal Tree of Life (AFTOL), jonka tavoite oli koko sienikunnan kattavat sukulaisuussuhteiden selvittäminen. Molempia hankkeita rahoitti Yhdysvaltojen kansallinen tiedesäätiö. Geenisekvenssien tutkimuksessa on saatu paljon uutta tietoa sienilajeista ja niiden elintapojen evoluutiosta. Esimerkiksi DNA-sekvenssit ovat varmistaneet, että monet morfologisten samankaltaisuuksien perusteella aikaisemmin sieninä pidetyt ryhmät, kuten limasienet (*Mycetozoa*), möhö sienet (*Plasmodiophortomycota*) ja munasienet (*Oomycota*), eivät kuulu varsinaisiin sieniin. [6, s. 14.]

Sienten lajintunnistusmenetelmät voidaan jakaa kahteen kategoriaan: klassisiin ja DNA:han perustuviin menetelmiin, joita käytetään nykyisin yhdessä. Klassisilla menetelmät jaotellaan yleensä seuraavasti: opportunistinen lähestymistapa, kasvatusmaljaan perustuva lähestymistapa, kosteuskammioviljely ja kasvatusalustaviljely. Kasvatusmaljaan perustuvassa lähestymistavassa käytetään useita klassisia menetelmiä ja pyritään keräämään vain hyväkuntoisten makrosienten kasvustoa itiöemiä käyttäen. Kasvatusmaljaan perustuvaa lähestymistapaa sovelletaan sieniin, jotka kasvavat epätasaisesti ja hajanaisilla alueilla. Sienten itiöemiä kerätään maaperästä, puun oksista, kannoista ja lehden karikkeista. Kosteuskammioviljelyssä sieninäyte kerätään yleensä puiden lehdistä, puujätteestä tai lannasta. Sen jälkeen sienten kasvatusta jatketaan kosteuskammiossa itiöemien muodostumiseksi. Sieniä arvioidaan säännöllisesti kahdesta kuuteen viikkoon. [7.]

Kasvatusmaljaviljelyssä sienet eristetään niiden kasvatusympäristöstä ja inokuloidaan eli siirrostetaan ne petrimaljoille. Tämän jälkeen sieniä inkuboidaan eli kasvatetaan kontrolloiduissa olosuhteissa. Klassisten menetelmien avulla

saadaan paljon monipuolista tietoa sienistä kuten esimerkiksi niiden ekologiasta ja kasvuympäristön tyypillisimmistä abioottisista tekijöistä. Tätä tietoa voidaan hyödyntää sienten yleisessä kuvailussa sekä niiden sienten kohdalla, joiden sekvenssejä ei ole vielä määritetty. Klassiset menetelmät ovat DNA:han perustuviin menetelmiin verrattuna halvempia eivätkä vaadi erikoislaitteistoa. Toisaalta klassisiin menetelmiin liittyy paljon vaiheita, mikä hidastaa tiedon saantia. Klassisia menetelmiä ei voida soveltaa sieniin, joita on hankala saada kasvaamaan petrimaljoilla. [7.]

DNA:han perustuvissa lajintunnistusmenetelmissä tutkitaan tiettyjä genomialueita, jotka usein sekvensoidaan. Yksi merkittävä etu DNA:n perustuvissa menetelmissä on nopeus. Molekyylibiologian menetelmillä saadaan tietoa DNA:sta, mutta se on klassisiin menetelmiin verrattuna yksipuolista. DNA-sekvenssejä täytyy muokata selviksi ennen kuin niitä voidaan käyttää luotettavana tiedonlähteenä. Sienten lajinmäärityksessä klassisia menetelmiä ja DNA:han perustuvia menetelmiä käytetään rinnakkain, ja niiden tietoja yhdistellään. Tulevaisuudessa yleistyvät uuden sukupolven sekvensointitekniikat ja metagenomiikkaan perustuvat menetelmät. Näillä voidaan tutkia tarkemmin suuria sieniyhteisöjä erilaisissa ekosysteemeissä. [7.]

Sienten lajintunnistus on tärkeää, koska tietoa voidaan soveltaa useilla eri osa-alueilla, kuten esimerkiksi taksonomiassa, fylogeniikassa, lääketieteessä ja evoluutiohistorian tutkimisessa. Sienilajeja on paljon, ja osa niistä voi olla sukupuuton vaarassa. Uhanalaisten sienilajien kartoitus on biodiversiteetin ymmärtämisen kannalta tärkeää. Sekvensoinnilla saadaan yksikohtaisempaa tietoa sienten genomista ja fenotyypin evoluutiosta. Sienilajeja on kartoitettu tähän päivään mennessä noin 155 000 eli 10 % arvioidusta koko sienilajimäärästä. Teelusikallisen määrän verran maaperässä on satoja sienilajeja, ja uusia lajeja löydetään jatkuvasti. [8, s. 14–18.]

## 2.1 Sienten taksonomia

Taksonomia on biologian tieteenala, joka luokittelee ja nimeää eliökunnan eliöt hierarkkisesti taksonomisille tasoille eli taksoneille. Sienet luokitellaan virallisesti omaan kuntaan, kaareen, alakaareen, luokkaan, lahkoon, heimoon, sukuun ja lajiin kuten taulukossa 1 näkyy. Taksonista voidaan muodostaa alempia taksoniteita kuten esimerkiksi lajista voidaan jatkaa luokittelua alalajeihin ja erilaisiin muunnoksiin. Kaikille taksonomisille tasoille on omat nimikkeensä. Laajin taksonominen taso on kunta ja suppein taksonominen taso on laji, jota pidetään luokittelun perusyksikkönä. Lajin tieteellinen nimi koostuu kahdesta osasta, suvun nimestä ja lajimäärestä. Esimerkiksi sienilajin *Phialocephala fortinii* nimen alkuposa (*Phialocephala*) viittaa sukuun ja loppuosa (*fortinii*) viittaa lajiin. Lajin nimi kursivoidaan tieteellisessä tekstissä. Sienten taksonomista nimistöä säätelevät tietyt säännöt. [9; 6, s. 12–13.]

Taulukko 1. Esimerkki sienien tieteellisestä luokittelusta taksonomisille tasoille [10].

Scientific Classification of <i>Exophiala jeanselmei</i>	
Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Eurotiomycetes
Subclass	Chaetothyriomycetidae
Order	Chaetothyriales
Family	Herpotrichiellaceae
Genus	<i>Exophiala</i>
Species	<i>E. jeanselmei</i>

Kullakin taksonilla saa olla yksi voimassa oleva nimi, joka ei saa esiintyä toisella taksonilla. Sienitutkimuksen tieteellisissä teksteissä lajin nimen perässä mainitaan auktori. Auktori on taksonin nimenantaja. Auktorinimet ja niiden lyhenteet löytyvät Kansainvälisen sienitieteellisen liiton (International Mycological Association) MycoBank-sivustosta. Sienten nimistö sukutasolla on koottu Dictionary of the fungi -teokseen, ja koko nimistö löytyy uusiseelantilaisen tutkimusinstituutin (Landcare Research) ja Isossa-Britanniassa sijaitsevan Kew`n

sienitutkimusosaston (Royal Botanic Gardens) yhteisellä internet-sivulla. Sienten ja kasvien tieteellistä nimitystä säätelevät historiallisista syistä samat nimityssäännöt. Kansainväliseen International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants -nimityskoodiin on koottu keskeisimmät nimityssäännöt. [11, s. 3; 6, s. 12.]

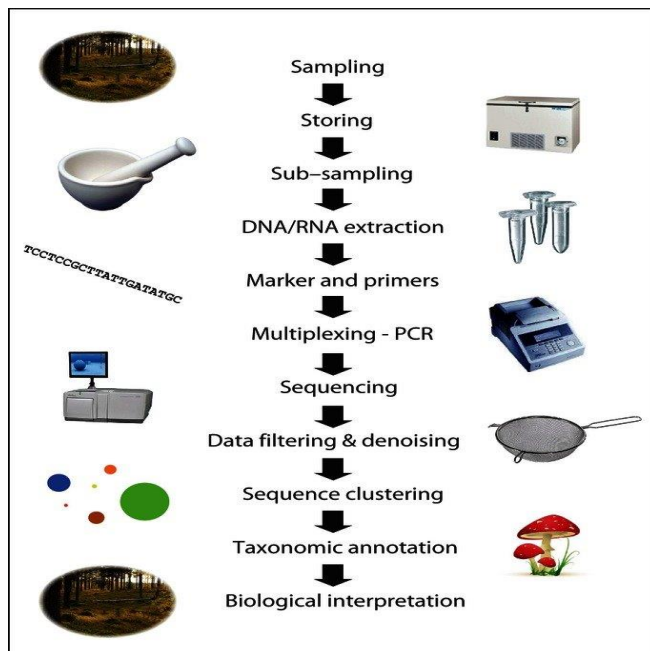
Eliöiden lajien luokittelulla pyritään muodostamaan mahdollisimman objektiivinen kuva evoluutiohistoriasta. Nykyinen lajien luokittelu perustuu hierarkkiseen järjestelmään, jossa kukin taksoni on kehittynyt siihen kuuluvien jäsenten yhteisestä kantamuodosta. Monofyleettiseen ryhmään luokitellaan ne sienet, jotka ovat polveutuneet samasta kantamuodosta. Vastaavasti polyfyleettiseen ryhmään kuuluvat sienet, jotka ovat polveutuneet useista eri kantamuodoista. Sienten luokittelun perusteet ovat muuttuneet historian aikana useaan kertaan. Ennen molekyylibiologian menetelmien kehittymistä sieniä luokiteltiin niiden fenotyypin eli ilmiön ominaisuuksien mukaan. Sienten genotyyppiä eli perimää tutkimalla on saatu tarkempaa tietoa niiden DNA:sta, mikä on johtanut uuden taksonomisen tiedon luokitteluun. [12; 6, s. 11.]

Sekvensoinnin avulla saadaan selville sienen genomien DNA-emäsparijärjestys. Sienen genomissa eli tumman perimässä on alueita, joiden sekvenssejä vertaamalla saadaan tietoa eri sienilajien välisestä geneettisestä muuntelusta. Tämän tiedon perusteella voidaan hahmottaa sienilajien välisiä sukulaisuussuhteita. Sienten taksonomian yksi päätavoitteista on muodostaa kattava ja selkeä AF-TOL (Fungal Tree of Life) eli kaikenkattava sienten sukupuu, jossa kaikki sienilajit on tunnistettu ja niiden sukulaisuussuhteet on selvitetty. Sienten taksonomista tietoa hyödynnetään laajasti fylogeneettisen puun rakentamisessa. Fylogeniikassa tutkitaan sienten polveutumishistoriaa, joka sivuaa evoluutiobiologiaa. Taksonominen tieto päivittyy jatkuvasti sitä mukaa, kun uusia sienilajeja löydetään. Nykytiedon mukaan sienet jaetaan 5 pääjaksoon, 10 alajaksoon, 35 luokkaan, 12 alaluokkaan ja 129 lahkoon. [13; 14.]

## 2.2 Sienilajin tunnistus DNA-sekvenssianalyysin perusteella

DNA-sekvenssianalyysin tavoite on selvittää tietyn sienen DNA:n emäsjärjestys. DNA:n emäsjärjestyksen avulla voidaan päätellä, mihin lajiin sieni kuuluu. Mitä enemmän sienten DNA:ta kartoitetaan, sitä enemmän saadaan tietoa sienten välisestä geneettisestä muuntelusta. Geneettistä muuntelua esiintyy saman sienilajin yksilöiden ja eri sienilajien välillä. Sekvensointitiedon avulla voidaan tutkia monimuotoisia sieniyhteisöjä ja niiden symbioosisuhdetta esimerkiksi isäntäkasveihin. [15.]

Ennen kuin sienten DNA:ta voidaan sekvensoida, se käy monivaiheisen prosessin läpi (kuva 1). Kuvassa 1 on esitetty esimerkki näyteprosessista tutkittaessa sieniyhteisöjä ympäristönäytteestä. Ensimmäisessä vaiheessa sieninäytteitä kerätään luonnosta, yleensä maaperästä, lehdistä tai puusta. DNA on varastoitava asianmukaisesti ennen varsinaista esikäsittelyä. Sieninäytteet varastoidaan yleensä  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen, jotta DNA säilyisi niissä. RNA:ta tulee varastoida vähintään  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötiloissa, koska se hajoaa helposti huonelämpötilassa. [15.]



Kuva 1. Monivaiheinen sieni-DNA:n käsittelyprosessi [15].

Esimerkiksi PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent -reagenssilla voidaan erottaa sieninäytteiden DNA. Prepman-reagenssi on kehitetty alun perin gramnegatiivisten ja patogeenisten bakteerien nopeaa DNA-eristämistä varten. Näytteillä voi olla korkea lipidipitoisuus, mikä saattaa hidastaa tai estää PCR-reaktiot. Prepman-reagenssi inaktivoi tehokkaasti PCR-inhibiittorit, mikä lyhentää näytteiden esikäsittelyn aikaa. Prepman-reagenssia voidaan käyttää mitä erilaisimpiin näytteisiin kuten esimerkiksi bakteereihin, homeisiin tai rihmastolisiin sieniin. Näyte voi olla nestemäisessä tai kiinteässä muodossa. [16.]

### 2.2.1 Sienen genomi ja geenitunnisteet

Sienen genomi tarkoittaa koko sienisolun DNA:ta. Tumansisäinen DNA on pakattu kromosomeihin. Jokainen kromosomi sisältää yhden yhtäjaksoisen DNA-molekyylin. Yksinkertaisten kromosomistojen kromosomien lukumäärä vaihtelee 3:n ja 23:n välillä. DNA:n kokonaispituus on 3–89 miljoonaa emäsparia yksinkertaisessa kromosomistossa. Kromosomiluku voi vaihdella saman sienilajin sisällä. Kromosomeja, joita ei ole kaikilla lajin edustajilla kutsutaan ylimääräisiksi kromosomeiksi. Sienten betakromosomit sisältävät toimivia geenejä, toisin kuin kasvi- tai eläinkunnan betakromosomit. Nopea evoluutio tuo lisää vaihtelua genomiin. [17, s. 21–24; 6, s. 140–146.]

Ylimääräiset kromosomit sisältävät geenejä, joiden sekvensseille ei löydy vastaavuutta muualta sienen genomista. On arveltu, että eri sienikantojen erot taudinaiheuttajina tai kyvystä vallata ekologinen lokero johtuu ylimääräisistä kromosomistoista. Sienigenomiin kuuluu myös mitokondrion DNA, jossa on 20 000–156 000 emäsparia. Se vastaa solujen energiaa tuottavien toimintoista. Sienten mitokondriot sisältävät yhden tai lineaarisen kromosomin. Tämän lisäksi se sisältää toimivien proteiinien geenejä ja niiden translaatioon tarvittavat mitokondrion omat siirtäjä-RNA-geenit. [17, s. 21–24; 6, s. 140–146.]

Sienillä on erilaisia itsenäisesti kopioituvia DNA-molekyylejä kuten esimerkiksi leivinihiivan plasmidit. Niitä geenejä, joita ei löydy kaikilta sienilajin yksilöiltä kutsutaan beetakromosomeiksi. Sienten geenit on koodattu DNA:n

emäsjärjestykseen, ja ne ovat yleensä 1000–5000 emäsparin pituisia, ja niistä on olemassa kopiot 1–10 kopiota hajallaan tai ryppäinä genomissa. Tumallisten eliöiden geenit sisältävät proteiinia koodaavia jaksoja eli eksoneita ja proteiinia koodaamattomia jaksoja eli introneita. [17, s. 21–24; 6, s. 140–146.]

ITS (Internal Transcribed Spacer) on sienten universaali geenitunniste, joka koostuu kahdesta ei-koodaavasta geenialueesta. Geenialueet sijaitsevat pienen alayksikön 5.8S ja suuren alayksikön välissä. ITS-aluetta käytetään ensisijaisena ja virallisena sienten geenitunnisteena, koska siellä esiintyy eniten geneettistä muuntelua. ITS-alueella on muitakin etuja sienilajin tutkimuksessa. Sitä on helppo käyttää PCR:ssä lyhyytensä (500–800 emäsparia) ja alukkeiden vuoksi. ITS-alueella esiintyy paljon vaihtelevuutta morfologisesti erilaisten sienten välillä, ja näin sen avulla voidaan tutkia geneettisiä eroavaisuuksia fylogeneettisessä tutkimuksessa. ITS-aluetta on helppo monistaa tilavuudeltaan pienistä ja laimeista DNA-näytteistä. ITS-alukkeita on helppo valmistaa, ja niiden tulkitsemiseen ei tarvita laajoja kromosomikirjastoja. ITS-alue on samankaltainen sienilajin sisällä, mutta riittävän vaihteleva eri sienilajien välillä. ITS-alueita on helppo verrata, koska niiden sekvenssit ovat useassa eri geenipankissa. [18, s. 65–69.]

Monistettavat ITS-alueet ovat ITS1 ja ITS2. Tälle alueelle on suunniteltu paljon erilaisia alukkeita, joita ovat muun muassa ITS1, ITS1F, ITS2, ITS3 ja ITS4. ITS1-ITS4-alukkeita käytetään sienten yleisinä alukkeina, kun taas ITS1F ja ITS4B ovat sienille spesifimpiä, erityisesti kotelosienille (*Ascomyta*). ITS1 ja ITS4 kiinnittyvät sienen DNA:n 18S ja 28S vakaisiin alueisiin. ITS4:llä pystytään monistamaan laajempaa geenialuetta, kun taas ITS1F:llä voidaan valikoida suppeampi geenialue. PCR:ssä ITS1F-forward-alue kiinnittyy 3-päähän ja ITS4-reverse-alue kiinnittyy 5-päähän (taulukko 2). [19, s. 14.]

Taulukko 2. Tässä työssä käytetyt alukkeet, jotka ovat yleisesti käytössä sien-  
ten tunnistamiseen [20; 21; 22; 23; 24].

<b>Yleinen aluke</b>	<b>Alukkeen emäsjärjestys</b>	<b>reverse vai forward</b>
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	forward
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	reverse
EF1F	TGCGGTGGTATCGACAAGCGT	forward
EF2R	AGCATGTTGTCGCCGTTGAAG	reverse
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	forward
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	reverse
T10	ACGATAGGTTACCTCCAGAC	forward

Sienilajin määrittämisessä ITS-alueen lisäksi tarvitaan sekundäärisiä geenialueita, koska pelkästään ITS-alueen perusteella ei voida tarkasti määrittää mihin lajiin sieni kuuluu. EF (Elongation factor) on geenialue, jota käytetään sekundäärisenä geenialueena sienien lajintunnistuksessa. EF1:n geenialue koodaa proteiinia, joka osallistuu proteiinisynteesin translokaatio-vaiheeseen. EF1-geenialue esiintyy kaikilla eukaryooteilla. Sienillä elongaatiotekijät E1F, EF2 ja EF3 osallistuvat proteiinisynteesin translaatiovaiheeseen. EF1 ja EF2 kuuluvat guanisiinitrifosfatafaaseihin (GTPaasit). Ne ovat entsyymejä, jotka voivat sitoa tai hydrolysoida guanotrifosfaattia. Tässä työssä EF1F-alue toimii forward-alukkeena ja EF2R-alue toimii reverse-alukkeena (taulukko 2). [25; 20.]

Betatubuliini ( $\beta$ -tubulene) on geenialue, joka liittyy useisiin sienisolun ylläpidon toimintoihin. Betatubuliinia koodaava aluetta käytetään sienien lajintunnistukseen, ja erityisesti kotelosientien lajintunnistuksessa. Tässä työssä käytettiin Bt1a forward-alukkeena ja Bt2b-aluketta reverse-alukkeena (taulukko 2). Sienillä on vähemmän tubuliinigeenialueita kuin eläimillä. Yleensä sienillä on yksittäinen  $\alpha$ -,  $\beta$ -, tai  $\gamma$ -tubuliinigeeni genomissa. Tubuliinit ovat osa mikrotubuluksia, ja niistä vastaavat geenialueet osallistuvat muun muassa solun jakautumiseen ja solunsisäisten aineiden kuljetukseen. [26; 20.]

## 2.2.2 Sekvenssitiedon käsittely

Kun tietyn sienilajin sekvenssi on saatu selville, se tyypillisesti tallennetaan geenipankkiin. Homologihaku tarkoittaa sitä, että tutkittavaa sekvenssiä verrataan geenipankin tallennettuihin sekvensseihin. Sienille on olemassa erilaisia geenipankkeja ja tietokantoja sen perusteella, mitä sen genomista halutaan saada selville. Yleisempiä sienten homologiahauissa käytettyjä geenipankkeja ovat UNITE ja NCBI (The National Center for Biotechnology Information) sekä GenBank, joka on osa NCBI:tä. NCBI yhdistelee sienten DNA-tietoa useista eri lähteistä, mikä tekee sekvenssitiedon etsimisestä helpompaa. NCBI luotiin vuonna 1988 tukemaan ja edistämään lääketieteellistä tutkimusta. Nykypäivänä sen tavoitteena on rakentaa monipuolisempia tietokantoja ja parantaa tiedon saatavuutta, jotta se olisi avoin kaikille käyttäjille. Sienten genomia on muihin eukaryootteihin verrattuna sekvensoitu kaikkein eniten. NCBI:n tallennetaan sienten sekvenssejä muun muassa koelaboratorioista, tutkijoilta ja suurilta sekvenssintutkimuskeskuksilta. [27.]

Sekvenssitiedon käsittelyn avuksi on kehitetty erilaisia ohjelmia ja toimintoja. BLAST-haussa saadaan selville todennäköisyys sille, kuinka samanlaisia tallennettu ja syötetty sekvenssi ovat. BLAST-hakua voidaan käyttää, kun verrataan tunnettua tai tuntematonta sekvenssiä UNITE-geenipankin referenssisekvenssiin. BLAST-haussa on useita numeerisia parametreja, jotka kertovat syötetyn sekvenssin laadusta. E-arvo viittaa sekvenssin laatuun. Se ilmoittaa lukuna, kuinka suurella todennäköisyydellä, syötetty ja tallennettu sekvenssi vastaavat toisiaan. Mitä pienempi E-arvo, sen luotettavampi haun tulos on. BLAST-haku ilmoittaa Percent Identity -suurella, kuinka samanlaisia syötetyn sekvenssin geenialueet ovat verrattuna tallennettuihin sekvensseihin. Percent Identity -arvo ilmoitetaan prosenttilukuna. [27.]

Accession Length -suure kertoo lukuna, kuinka monta nukleotidia tai aminohappoa BLAST-haku on tunnistanut kyseisestä sekvenssistä. Query Cover -suure ilmoittaa prosenttilukuna, kuinka monta prosenttia syötetystä sekvenssistä on analysoitu BLAST-haulla. Sekvenssidatan etsiminen aloitetaan tietokannan

valinnalla. Siihen vaikuttavat se, mitä sienen genomista halutaan saada selville ja miten tieto halutaan esittää. Projektin tavoite ja painopiste ovat keskeisiä asioita tietokannan valinnassa. BLAST-hakuun voidaan esimerkiksi käyttää yleisesti ITS1 ja ITS2-sekvenssejä, koska niitä pidetään sienien universaalisina lajimerkkereina. BLAST-hausta on kehitetty spesifimpiä hakuja, joilla voidaan verrata alukkeita tai proteiimirakenteita toisiinsa, Primer-BLAST tai COBALT. Esimerkiksi sekvenssitiedon tarkastelu onnistuu selainpohjaisesti tai käyttäjän omalla koneella, koska tiedostot ja hakuohjelmat ovat myös ladattavissa. Bioinformatiikkaan on kehitetty erilaisia ohjelmia, jotka auttavat käsittelemään genomiin liittyvää tietoa. [27.]

### **3 Abioottisten tekijöiden vaikutus sienten kasvuun**

#### **3.1 Endofyyttisienien ekologia**

Endofyyttisieniksi kutsutaan sieniä, jotka kasvavat kasvin sisällä tai sisäosissa. Endofyyttisienillä ei ole välitöntä tai näkyvää haittaa isäntäkasville, jonka sisällä ne elävät. Suurin osa endofyyttisienilajeista kuuluvat kotelosieniin, ja ne ovat biodiversiteetiltään monimuotoinen ja rikas ryhmä. Ne elävät usein isäntäkasvin kanssa symbioosisuhteessa, jossa endofyyttisieni parantaa isäntäkasvin kasvua epäsuorasti. Endofyyttisieni tuottaa isäntäkasville sekundäärisiä metaboliitteja, jotka parantavat isäntäkasvin vastustuskykyä abioottista ja bioottista stressiä vastaan. Isäntäkasvi puolestaan tarjoaa endofyyttisienelle elinympäristön ja ravinteita. Tutkimusten mukaan endofyyttisienien on havaittu tuottavan erilaisia bioaktiivisia ja kemiallisia yhdisteitä kuten esimerkiksi alkaloideja, flavonoideja, steroideja ja fenoliyhdisteitä. Joillakin näillä yhdisteillä on farmakologisia vaikutuksia. Endofyyttisieniä on eristetty erilaisista kasveista kuten esimerkiksi leivistä, sammaleista ja saniaisista tutkimusta varten. Endofyyttisieniä on tavattu kasvavan arktisilla alueilla, merissä, sademetsissä ja trooppisissa olosuhteissa. [28, s. 120; 29.]

Endofyyttisienet elävät usein isäntäkasvin kanssa symbioottisessa suhteessa. Symbioosisuhde voi olla mutualistinen, kommensalistinen tai parasitistinen.

Symbioosisuhteen laatuun vaikuttavat isäntäkasvin fysiologinen tila ja olosuhteet. Mutualistisessa symbioosisuhteessa endofyyttisieni ja isäntäkasvi hyötyvät molemmat toisistaan, mikä parantaa niiden selviytymistä ekologisessa ympäristössä. Tämän lisäksi tiettyjen endofyyttisienien on osoitettu kasvattavan isäntäkasvin kuivuuden ja metallien sietokykyä sekä edistävän kasvua ja ravinteidenottoa. Tämän lisäksi endofyyttisieni suojaa isäntäkasvia taudinaiheuttajilta kuten esimerkiksi homeilta ja patogeeneilta. Tarkkoja biologisia mekanismeja endofyyttisienien ja isäntäkasvin välillä ei tunneta. On ehdotettu, että endofyyttisienien suojele taudinaiheuttajaa vastaan perustuisi sen tuottamiin bioaktiivisiin aineisiin. Kommensalistisessa symbioosisuhteessa endofyyttisieni ei tuota hyötyä isäntäkasville. Se voi olla kuitenkin latenttinen patogeeni, mikä tarkoittaa sitä, että olosuhteiden muuttuessa se alkaa vahingoittamaan isäntäkasvia. [29; 30.]

Endofyyttisieni voi olla myös aktiivinen patogeeni tietyissä olosuhteissa. Sen on havaittu muuttavan isäntäkasvin morfologiaa ja fysiologiaa parasitistisessa symbioosisuhteessa. Endofyyttisienet voidaan luokitella kahteen ryhmään sen perusteella, missä isäntäkasvin elinkaaren vaiheissa ne vaikuttavat. Fakultatiiviset endofyyttisienet vaikuttavat vain isäntäkasviin tietyissä elinkaarivaiheissa, mutta muulloin ne voivat elää jopa isäntäkasvin ulkopuolella. Välittömät endofyyttisienet elävät rinnakkain isäntäkasvin kanssa koko sen elinkaaren ajan. Ne leviävät isäntäkasviin sukupolvien yli vertikaalisen evoluution kautta. Esimerkiksi endofyyttisienien biosynteesiin vaikuttavaa geeniekspressiota on tutkittu. Biosynteesistä vastaavat pääasiassa useat geeniryppäät kromosomissa ja transkriptiotekijät. [29; 30.]

Endofyyttisienien on arveltu elävän jo 400 miljoonaa vuotta maan päällä, ja niitä on tutkittu viimeiset 100 vuotta. Kirjallisuuslähteiden mukaan 51 % endofyyttisienien tuottamista bioaktiivisista yhdisteistä olivat tuntemattomia tutkijoille ennestään. Tulevaisuudessa endofyyttisienien tuottamia biokemiallisia yhdisteitä voidaan hyödyntää öljyn tuottamisessa, farmakologiassa ja muissa eri teollisuuden osa-alueilla. Endofyyttisienistä on kiinnostuttu erityisesti maataloudessa ja farmasiassa, niiden bioaktiivisten tuottamien yhdisteiden vuoksi. Maataloudessa

endofyyttisienien bioaktiivisia yhdisteitä voitaisiin hyödyntää kasvien kasvatusaineina. Farmasiassa bioaktiivisten yhdisteiden antimikrobisia ja antikarsinogeenisiä ominaisuuksia voitaisiin hyödyntää uusien lääkkeiden tutkimuksessa. Tutkijat haluavat paremmin ymmärtää endofyyttien ekologista ja biologista roolia ekosysteemeissä. Endofyyttisienet asettavat useita tutkimusongelmia ja aiheita. Tulevaisuudessa tutkimuksien tulee keskittyä enemmän endofyyttisienien ja isäntäkasvin symbioosimekanismien selvittämiseen genomisella tasolla. Tutkijat ovat myös kiinnostuneet kehittämään halpoja ja ekologisia eristämismenetelmiä, joiden avulla sekundaariset yhdisteet saadaan erotettua endofyyttisienistä. [29.]

### 3.2 DSE-sienet

Tummväliseinäiset endofyyttisienet eli DSE (Dark Septate Endophytes) -sienet ovat kotelosienten kaareen kuuluva fylogeneettisesti hajanainen sieniryhmä. Tummväliseinäisiä endofyyttisieniä kutsutaan lyhyesti tummaseinäsieneiksi. Yhden määritelmän mukaan sieni luokitellaan tummaseinäsieneeksi, jos se kasvaa hyväkuntoisen kasvin juuren sisällä eikä värjäydy perinteisillä sienijuurisienten värjäysmenetelmillä. Sienirakenteet säilyvät tummina ja läpikuultavina valomikroskoopin valon alla. Toisaalta sienirakenteiden pigmenttien värit ovat tulkinnanvaraisia eikä tarkkaa määritelmää DSE-sienille ole niiden monimuotoisuuden ja hajanaisuuden vuoksi. DSE-sienten rihmasto on väriltään tummanruskea, tummanharmaa tai musta. [31; 28, s. 120.]

Tummaseinäsieniä on tavattu kasvavan mitä erilaisimmissa biomeissa ja ilmasto-olosuhteissa trooppisesta arktiseen. Niiden arvellaan parantavan isäntäkasvin selviytymistä äärimmäisissä olosuhteissa. DSE-sieniä tavataan lähes kaikkialla, ja ne kasvavat symbioosissa isäntäkasvin kanssa. Ne muodostavat isäntäkasvin juurissa mikroskelorioita, jotka tekevät sienestä kestävämmän. DSE-sienillä on arveltu olevan erilaisia rooleja isäntäkasvin ekologiassa. Ne voivat esimerkiksi parantaa joidenkin ravinteiden ottoa, mutta samalla vähentää. Ravinteidenoton ja kuljetuksen mekanismit ovat vielä tuntemattomia DSE-sienten kohdalla. On tutkittu, miten DSE-sienet muuttavat ammoniumionit typeksi

isäntäkasville, ja on oletettu, että todennäköisesti ne pystyvät siihen. On yritetty arvioida, voivatko DSE-sienet välittää vettä isäntäkasville, ja minkälainen rooli niillä on vedenkuljetuksessa. Suurin osa DSE-sienten biologiasta on tuntematonta ja kartoittamatonta. Todennäköisesti DSE-sienet parantavat isäntäkasvin lämmönsietokykyä, ja niiden on havaittu muodostavan melaniinia sisältäviä mikrosklorioita. Sienitutkijat ovat olleet kiinnostuneita myös siitä, voivatko DSE-sienet torjua isäntäkasvin tuholaishyönteisiä ja kasvitauteja. [32.]

On kiinnostuttu myös siitä, voivatko DSE-sienet vaikuttaa kasvien välisiin vuorovaikutuksiin. Monien kokeiden mukaan DSE-sienet voivat vaikuttaa positiivisesti kasvien välisiin vuorovaikutuksiin. Tummaseinäsieniä tunnetaan ainakin 600 kasvilajilta kaikilta maapallon kasvillisuusvyöhykkeiltä. Isäntäkasvien ja tummanseinäsienten symbioosisuhde saattaa olla merkittävä tekijä kasvien selviytymiselle kylmissä ilmasto-olosuhteissa. Tummaseinäsiinten ekologinen merkitys saattaa perustua niiden kykyyn hajottaa erilaisia orgaanisia yhdisteitä kuten esimerkiksi selluloosaa, polyfenoleja, proteiineja ja rasvoja. Ne vapauttavat ravinteita maassa ja juurien läheisyydessä itsensä lisäksi myös kasvien käyttöön. [32.]

DSE-sienten taksonominen luokittelu on mutkikasta, koska ne eivät muodosta monofyleettistä ryhmää. Jotkin DSE-sienilajit muodostavat itiöitä kasvatusmalla, kun taas jotkin lajit eivät. Jotkin itiöivät DSE-sienilajit voivat olla muodostamatta itiöitä, jos niitä inkuboidaan matalissa lämpötiloissa pitkiä aikoja. Morfologinen tarkastelu ei ole DSE-sienten kohdalla luotettavaa ja kannattavaa, koska saman lajin sisällä on paljon morfologista vaihtelua. Esimerkiksi joillakin DSE-sienilajeilla suvuton ja suvullinen lisääntyminen saattaa vuorotella. DSE-sienten genomia tutkitaan molekyylibiologian menetelmien avulla, esimerkiksi sekvensoimalla ITS-geenialuetta. [32.]

DSE-sienten elinvaiheista, ekologiasta, evoluutiosta ja symbioosisuhteesta isäntäkasveihin ei tiedetä kaikkea. Tehdyistä tutkimuksista ja kasvatuskokeista on saatu DSE-sienistä jonkin verran perustietoa. Erilaisia hypoteeseja on asetettu niiden ekologiaan liittyen, ja on pyritty löytämään yhtäläisyyksiä

mykorritsasieniin. DSE-sieniä ei ole tutkittu niiden yleisyydestä huolimatta paljoakaan Suomessa. Metsäkasveilta lajeja on tutkittu jonkin verran, mutta viljelykasvien tutkimukset ovat edelleen rajalliset. Yleisimmät puun juurissa kasvat DSE-sienet ovat *Phialocephala fortinii* s.l.–*Acephala applanata* -kompleksi eli PAC-kompleksin jäseniä. PAC-kompleksiin kuuluu yli 22 DSE-sienilajia, joista kahdeksan on kuvattu. Tutkimukset DSE-sienien vaikutuksista isäntäkasveihin on tehty suurimmaksi osaksi kasvihuoneolosuhteissa tai laboratorioissa. DSE-sienet elävät pääosin isäntäkasvin juurissa. [32.]

DSE-sienistä ollaan kiinnostuneita kaupallisesti metsäpuiden taimien sekä nurmi- ja rehu- kasvien hyvinvoinnin lisäämisessä, hiilensidonnassa ja orgaanisen hiilimäärän lisäämisessä maaperässä. DSE-sienet olisi mahdollista lisätä kasvien taimien tuotantovaiheessa tai siemeniä peittaamalla. DSE-sienistä kerätään perustietoa, ja ei ole olemassa aiempia tutkimuksia tai kokeita niiden vaikutuksesta hiilensidontaan. Kansainvälisissä tutkimuksissa on todettu, että DSE-sienten ympäätäminen metsäpuiden taimien tai viljelykasvien siemeniin parantaa kasvien sekä taimien kasvua ja terveyttä. Suurinta osaa kokeista ei ole kuitenkaan suoritettu tuotantopelloilla tai kotimaisissa olosuhteissa, vaan laboratorio-olosuhteissa. Hiilensidonnän todentaminen DSE-sienillä vaatii pidempiaikaisia ja laajoja kokeita. Aiempien tutkimuksien ja kokeiden puuttuminen on merkittävä epävarmuustekijä. [33.]

### 3.3 Lämpötilan vaikutus sienten kasvuun

Lämpötila on merkittävä abioottinen tekijä, joka vaikuttaa sienten kasvuun. Sienet voidaan luokitella omiin ryhmiin sen mukaan, kuinka hyvin ne sietävät erilaisia lämpötiloja. Suurin osa sienilajeista on mesofiilejä, joiden optimikasvulämpötila on 5–30 °C välillä. Jotkin sienilajit pystyvät kasvamaan alle 0 °C:n lämpötilassa, ja niitä kutsutaan psykotrofeiksi. Osa sienistä pystyy kestäämään kuumuutta hyvin kasvaen jopa yli 40 °C:n lämpötilassa. [34.]

Lämpötila on keskeinen suure, kun tutkitaan, miten ilmastonmuutos vaikuttaa sienten ekologiaan ja kasvuun. Maaperässä kasvaviin sieniin vaikuttavat

sääolosuhteet ja ilmasto. Tämän lisäksi maaperässä vaikuttavat monet muuttujat verrattuna laboratorio-olosuhteissa, joissa tutkitaan vain muutamaa muuttujaa. Ilmastonmuutostutkimuksissa tutkitaan, miten sienilaji reagoi äärimmäisissä olosuhteissa ja miten lämpötilan kasvu vaikuttaa sienien evoluutioon. On havaittu, että jotkin sienilajit sietävät suuria lämpötilan vaihteluita. Tätä ominaisuutta kutsutaan termoplastisuudeksi. [34.]

Kasvatuskokeissa lämpötilaa tutkitaan yleensä toisen muuttujan kanssa. Tämä muuttuja voi olla pH, veden määrä tai tuotetun substraatin määrä. Kasvatusmaljojen vesipotentiaalia voidaan säätää tiettyyn lukuarvoon. Tällä on tarkoitus tutkia, miten lämpötilastressi vaikuttaa sienten kasvuun. Jokaisella sienilajilla on oma lämpötilaoptimi. Lämpötilan yhteisvaikutusta toisen muuttujan kanssa on vaikea ennustaa ilman ennustaan tehtyjä tutkimuksia ja kasvatuskokeita. Kasvatuskokeen tuloksilla voidaan tehdä ennusteita siitä, miten sienilaji sopeutuu muuttuviin ilmasto-olosuhteisiin. Laboratorio-olosuhteissa kasvatusmaljoja inkuboidaan tietyssä lämpötilassa. [34.]

### 3.4 Veden vaikutus sienten kasvuun

Sienet tarvitsevat jokaisessa elinvaiheessa vettä, ja sienien massasta 90 % on vettä. Sieneen sitoutunutta vettä kuvataan vesipotentiaalilla. Veden määrä on lämpötilan ohella merkittävä tekijä, joka vaikuttaa sienien kasvuun. Laboratorio-olosuhteissa pyritään tekemään kasvatusalustoja, jotka ylläpitävät sienien kasvua. Vesipotentiaalia on hankala mitata heterogeenisessä maaperässä, ja tarkasti säädetyt maljakasvatuskokeet antavat tärkeää tietoa abiottisten tekijöiden vaikutuksista sienten kasvuun. [35.]

Vesipotentiaali on suure, joka kuvaa veden potentiaalienergiaa tarkasteltavassa systeemissä, ja sitä verrataan puhtaan veden potentiaalienergiaan. Vesipotentiaalia merkitään  $\phi$ -kirjaimella, ja sen yksikkö on megapascali tai kilopascali. Vesipotentiaali on aina negatiivinen, koska puhtaan veden paine on aina lähellä nollaa. Vesipotentiaalın suuruudesta voidaan päätellä, kuinka paljon vettä eliöillä on käytettävissä. Matriisipotentiaalilla ja osmoottisella potentiaalilla voidaan

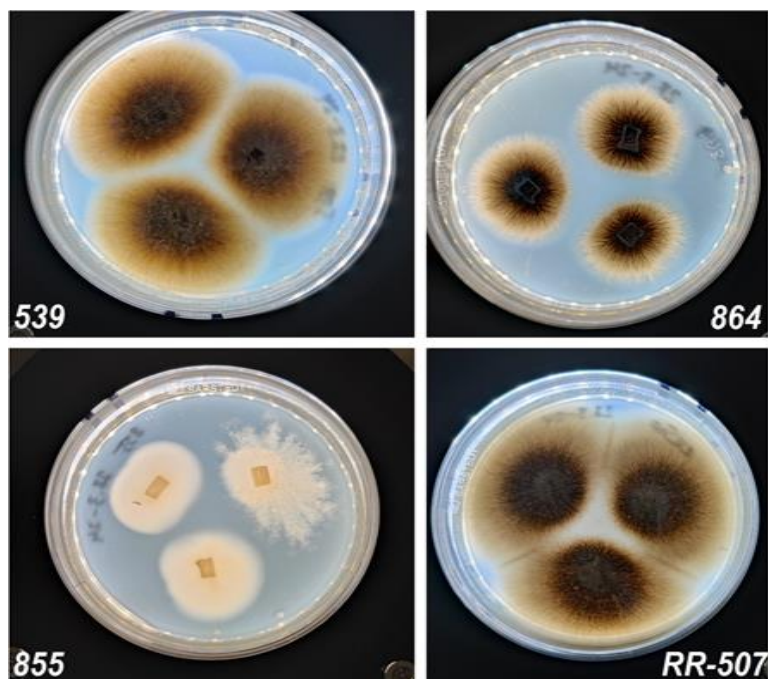
laskea tarkemmin, kuinka paljon eliöillä on vettä käytettävissä. Ne on johdettu suoraan vesipotentiaalin käsitteestä. Matriisipotentiaali tarkoittaa kiinteiden partikkeleiden tai polymeerien ja veden välisiä vuorovaikutuksia. Maaperässä on paljon erilaisia partikkeleita ja kiinteitä hiukkasia, jotka vaikuttavat veden kemiallisiin sidoksiin. Osmoottinen potentiaali kuvaa liuotettavien partikkeleiden ja veden välisiä vuorovaikutuksia. Näiden molempien potentiaalien yksikkö on megapascali. [35.]

Kun halutaan säätää sienten kasvuolosuhteet tiettyyn vesipotentiaaliin, joudutaan kasvatusmaljoihin lisäämään suoloja kuten natriumkloridia (NaCl) tai kaliumkloridia (KCl). Tällä tavoin saadaan säädettyä osmoottinen potentiaali tiettyyn arvoon. Kun kasvatusmaljoihin lisätään polyetyleeniglykolia (PEG), sillä voidaan tutkia ja säätää matriisipotentiaalia. Maaperää tutkittaessa mitataan useampaa suuretta, kun taas laboratorio-olosuhteissa tutkitaan vain muutamaa suuretta. [36.]

## **4 Materiaalit ja tutkimusmenetelmät**

### **4.1 Työssä käytetyt DSE-sieni-isolaatit**

Tässä työssä selvitettiin kotimaisten metsäkasvien juurista eristettyjen sienien lajeja molekyyliomenetelmin (isolaatteja oli yhteensä 47). Lisäksi työssä tutkittiin koeasetelmassa neljää eri juuriendofyyttisientä, jotka kaikki oli eristetty kuusen juurista (kuva 2).



Kuva 2. Tutkitut DSE-sieni-isolaatit kasvatusmaljoilla kuvattuna.

Kuvassa 2 nähdään DSE-sieni-isolaattien (539, 864, 855 ja RR-507) rihmastoa ja kasvustoa. Sieniä ylläpidettiin 2-%:n maltoosiagarmaljoissa +22 °C:n kasvatushuoneessa.

#### 4.2 Genomisen DNA:n eristys DSE-sieni-isolaateista

Yhtä sieninäytettä kohden tuli kolme mikrosentrifugiputkea. Ensimmäiseen mikrosentrifugiputkeen pipetoitiin 50 µl Thermo Fisher Scientificin PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent -liuosta. Raaputettiin puhtaalla pipetin kärjellä petrimaljalta sienien uloimmasta osasta näytepala, joka laitettiin mikrosentrifugiputken pohjalle. Sekoitettiin näytepala PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent -liuoksen sekaan. Laitettiin mikrosentrifugiputket hybridisaatiouuniin 95 °C:seen 10 minuutiksi. Jäähdytettiin ja sentrifugoitiin (12 000 g) kierrosnopeudella 10 minuutissa. Otettiin seuraavat mikrosentrifugiputket, ja pipetoitiin edellisistä putkista noin 50 µl supernatanttia. Lopuksi putket sekoitettiin Vortex-Genie® 1-koeputkiravistelijalla ja pöytäsentrifugilla. Kolmansiin putkiin pipetoitiin 1 µl supernatanttia ja 49 µl tislattua vettä. Toiset ja kolmannet putket vietiin

omassa laatikossa pakastimeen  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen säilytettäväksi. DSE-sieni-isolaateista tehtiin Prepman-eristyksen lisäksi puhdasviljelmät. Alkuperäisistä petri-maljoista merkittiin korkkiporalla näyte, ja siirrettiin veitsellä uusiin 2-%:n mallas-maljoihin. Maljat suljettiin parafilmillä. Puhdasviljelmät vietiin inokuloinnin jälkeen kasvatushuoneeseen ( $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 4.3 DSE-sieni-isolaattien esikäsitely ja PCR-reaktio

Sieninäytteiden DNA:n PCR-reaktiota varten valmistettiin mix-liuos, joka sisälsi DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) -reagenssia, kahta aluketta ja deionisoitua vettä (taulukko 3). Taulukko 3 näkyy mix-liuoksen komponenttien määrät mikrolitroina. Tutkittujen DSE-sieni-isolaattien PCR-reaktio toistettiin Bt2b- ja T10-; Bt2b- ja Bt1b-; ESF1- ja ESR2- sekä ITS1- ja ITS4-aluepareilla.

Taulukko 3. Mix-liuoksen ja PCR-putken komponenttien määrät.

<b>Mix-liuos</b>	<b>1x</b>
2x DX mix	12,5 $\mu\text{l}$
Aluke 1 (25 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{l}$
Aluke 2 (25 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{l}$
DDW (deionisoitu vesi)	11,1 $\mu\text{l}$
<b>PCR-putkeen pipetoi-tiin</b>	
DNA-näyte	2 $\mu\text{l}$
Mix-liuos	23 $\mu\text{l}$
Yhteensä	25 $\mu\text{l}$

Taulukossa 3 näkyy, kuinka paljon pipetoiitiin sieni-DNA:ta ja mix-liuosta mikrolitroina. PCR-ohjelma suunniteltiin käytetyn polymeraasin ja alukkeiden perusteella (taulukko 4). ITS- ja EF-alukkeiden PCR-ohjelmat näkyvät taulukossa 4. Bt2b ja Bt1b sekä Bt2b- ja T10-alueparien liuokset ajettiin ITS-ohjelmalla.

Taulukko 4. PCR-ohjelmat alukkeille.

<b>PCR-ohjelma EF-alukkeille</b>		
<b>Kierros</b>	<b>Kierroksen kesto (min)</b>	<b>Lämpötila (°C)</b>
1.	03:00	95,0
2.	00:30	95,0
3.	00:30	60,0
4.	00:30	72,0
5.	Palaa kohtaan 2. yht 34 kertaa	95,0
6.	05:00	72,0
7.	∞	10,0
<b>PCR-ohjelma ITS-alukkeille</b>		
<b>Kierros</b>	<b>Kierroksen kesto (min)</b>	<b>Lämpötila (°C)</b>
1.	03:00	95,0
2.	00:30	95,0
3.	00:30	57,0
4.	00:30 (palaa 2.)	72,0
5.	Palaa kohtaan 2. yht 34 kertaa	
6.	05:00	72,0
7.	∞	10,0

PCR-ajo suoritettiin Thermo Scientificin Arktik Thermal Cycler -laitteella.

#### 4.4 Agaroosigeelielektroforeesi

Valettiin 1 % agargeeli, johon lisättiin etidiumbromidia nukleiinihappojen visualisointia varten. Agargeeliin pipetoitiin 1,5 µl Invitrogen 100 bp DNA Ladder -

molekyylimarkkeria ensimmäiseen kammioon, sarjojen väliin ja viimeiseen kammioon. DNA-näytettä pipetoitiin 5 µl. Jos kyseessä olivat suuret kammiot, niihin pipetoitiin 2 µl molekyylimarkkeria ja 8 µl DNA-näytettä. Agarosigeeliä ajettiin 120 voltin sähköjännitteellä yksi tunti 20 minuuttia. Ajon jälkeen agarosigeelit kuvattiin Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ -laitteella. Niitä muokattiin Image Lab -ohjelmalla.

#### 4.5 PCR-tuotteiden puhdistus ja sekvenssien lähetys

PCR-tuotteet puhdistettiin EXO-SAP-entsyymikäsittelyllä tai NucleoSpin-reagenssisarjalla ohjeiden mukaan. Puhdistetut PCR-tuotteet lähetettiin mikrosentrifugiputkissa Macrogen Europe -yritykseen sekvensoitavaksi.

#### 4.6 Neljän DSE-sieni-isolaatin kasvatuskoe

Kasvatuskokeessa tutkittiin lämpötilan ja veden saatavuuden vaikutusta DSE-sieni-isolaattien 539, 855, 864 ja RR-507 kasvuun. Kasvatuskoe toteutettiin kahdella eri petrimaljoilla: NaCl- ja PEG-petrimaljoilla. Kasvatustetta varten hankittiin petrimaljoja, jotka olivat halkaisijaltaan 8,5 cm ja syvyydeltään 9 mm. NaCl-kasvatusmaljoja tehtiin viisi erilaista, jotka nimettiin kasvavan vesipotentiaal mukaan: WP0, WP1, WP2, WP3 ja WP4. WP0-petrimalja oli kontrollimalja, johon NaCl-suolaa ei ollut lisätty ollenkaan (liite 2). WP1, WP2, WP3 ja WP4 -petrimaljoihin oli lisätty eri määrä NaCl-suolaa veden saatavuuden säätämiseksi (liite 1). WP1-maljassa oli vähiten NaCl-suolaa ja WP4-maljassa eniten. Kukin malja oli merkitty omalla värillään: WP0 ja WP1 mustalla, WP2 vihreällä, WP3 sinisellä ja WP4 punaisella. Tehtiin neljä toistoa jokaisesta maljasta: 4x WP0, 4x WP1 ja niin edelleen. Yhdessä kasvatusmatriisissa oli siis yhteensä 20 petrimaljaa (kuva 4). Jokaisesta sieni-isolaatista tehtiin kaksi samanlaista kasvatusmatriisia, joista ensimmäistä inkuboitiin +15 °C:n ja toista +25 °C:n lämpökaapissa neljän viikon ajan.



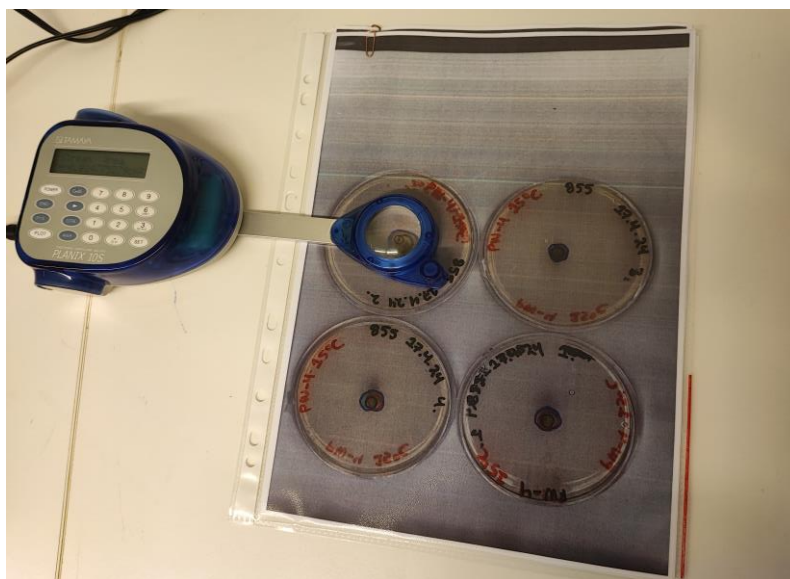
Kuva 4. Kasvatusmatriisi.

Kuvassa 4 näkyy esimerkki yhdestä kasvatusmatriisista. Jokaista DSE-sieni-iso-laattia kohden tuli kaksi kasvatusmatriisia. Koko kokeessa kasvatusmatriiseja oli yhteensä kahdeksan. DSE-sieni-iso-laatteja (539, 855, 864 ja RR-507) inkuboitiiin NaCl-kasvatusmaljoilla 16.4.–15.5.24 ja 17.4.–16.5.24. Kasvatuskokeessa seurattiin eri DSE-sieni-iso-laattien kasvua merkitsemällä tussilla petrimaljan pohjaan viikkokohtainen kasvu. Kasvu merkittiin maljan pohjalle ympyröimällä sienien uloin kasvuston osa sillä hetkellä. Merkitseminen tapahtui joka viikolla samana päivänä. Ensimmäisen viikon kasvu merkittiin mustalla värillä, toisen punaisella värillä, kolmannen vihreällä värillä ja neljännen sinisellä värillä.

Samanlainen kasvatuskoe toistettiin PEG-maljoilla. PEG-maljat olivat 1-%:n mal-lasagareita, jotka olivat halkaisijaltaan 5 cm ja syvyydeltään 9 mm. PEG-maljoja valmistettiin kolme erilaista: KONTR,  $-0,7$  ja  $-1,7$  (liite 2). Kahden eri kasvatus-maljan vesipotentiali säädettiin  $-0,7$  MPa:n ja  $-1,7$  MPa:n suuruisiksi. Kontrollimaljoihin ei tullut PEG-liuosta lainkaan. PEG-maljoja inkuboitiiin  $+15$  °C:ssa ja  $+25$  °C:ssa 19.4–10.5.24 välisenä aikana. Vaikka DSE-sieniä kasvatettiin PEG-maljoilla neljä viikkoa, vain kolmannen viikon kasvu määritettiin ja analysoitiin ti-lastollisilla testeillä.

#### 4.7 Kasvun määrittäminen ja tilastollinen tarkastelu NaCl- ja PEG-kasvatusmaljoilta

Kaikkiin sienimaljoihin merkittiin viikoittain kasvuvyöhyke, maljan pohjalle. Kasvatuskokeen päätyttyä kaikki NaCl- ja PEG-maljat skannattiin printterillä ja tulostettiin. Tamaya Planix 10S -digitaalipanimetrillä mitattiin viikoittaiset kasvatukset, ja merkittiin ne Excel-taulukoihin (kuva 5).



Kuva 5. Kasvuvyöhykkeiden mittaaminen digitaalipanimetrillä.

Kaikkien DSE-sieni-isolaattien kasvuista laskettiin 4. viikon kohdalla keskiarvot ja keskihajonnat sekä piirrettiin käyrät Excel-taulukko-ohjelmalla. Aineistot analysoitiin R-studion (versio 4.4.0) R-commanderin tilastollisilla testeillä. Tilastollisia aineistoja 4. viikon kohdalta aloitettiin analysimaan Shapiro-Wilkenin testillä, joka kertoo, onko aineisto normaalijakautunut. Jos aineisto ei ollut normaalijakautunut, se muunnettiin normaalijakautuneeksi logaritmillä, käänteisluvulla tai neliöjuurifunktiolla. Jos aineisto saatiin normaalijakautuneeksi, sen varianssit todettiin joko samansuuruisiksi tai erisuuruisiksi Levenen testillä. Riippumatta siitä olivatko varianssit erisuuruiset vai samansuuruiset, niille tehtiin ANOVA (regressioanalyysi). R-commander piirsi Tukeyn parittaiset vertailut, joissa voitiin nähdä, mitkä maljaparit poikkesivat 95 %:n merkitsevyyden tasolla

toisistaan. Voitiin päätellä p-arvojen avulla, vaikuttiko maljan koostumus tilastollisesti merkitsevästi DSE-sieni-isolaattien kasvuun.

Jos aineistoa ei saatu normaalijakautuneeksi käytössä olevilla funktioilla, siihen piti soveltaa ei-parametrisia tilastollisia testejä. Ensin tutkittiin Kruskal-Wallis testillä, oliko maljojen välillä ylipäättänsä eroja tilastollisesti. Jos ei, niin maljojen todettiin olevan ilman tilastollista eroa. Jos maljojen välillä havaittiin olevan tilastollista eroa, muunnettiin aineisto siten, että voitiin testata jokaisen maljaparin kohdalla normaalijakautuneisuus. Niihin maljapareihin, jotka olivat normaalijakautuneita, sovellettiin parittaista t-testiä. Niihin maljapareihin, jotka eivät olleet normaalijakautuneita, sovellettiin kahden näytteen Wilcoxonin testiä. Ei-parametristen testien tuloksien p-arvot ja johtopäätökset taulukoitiin.

## 5 Tulokset

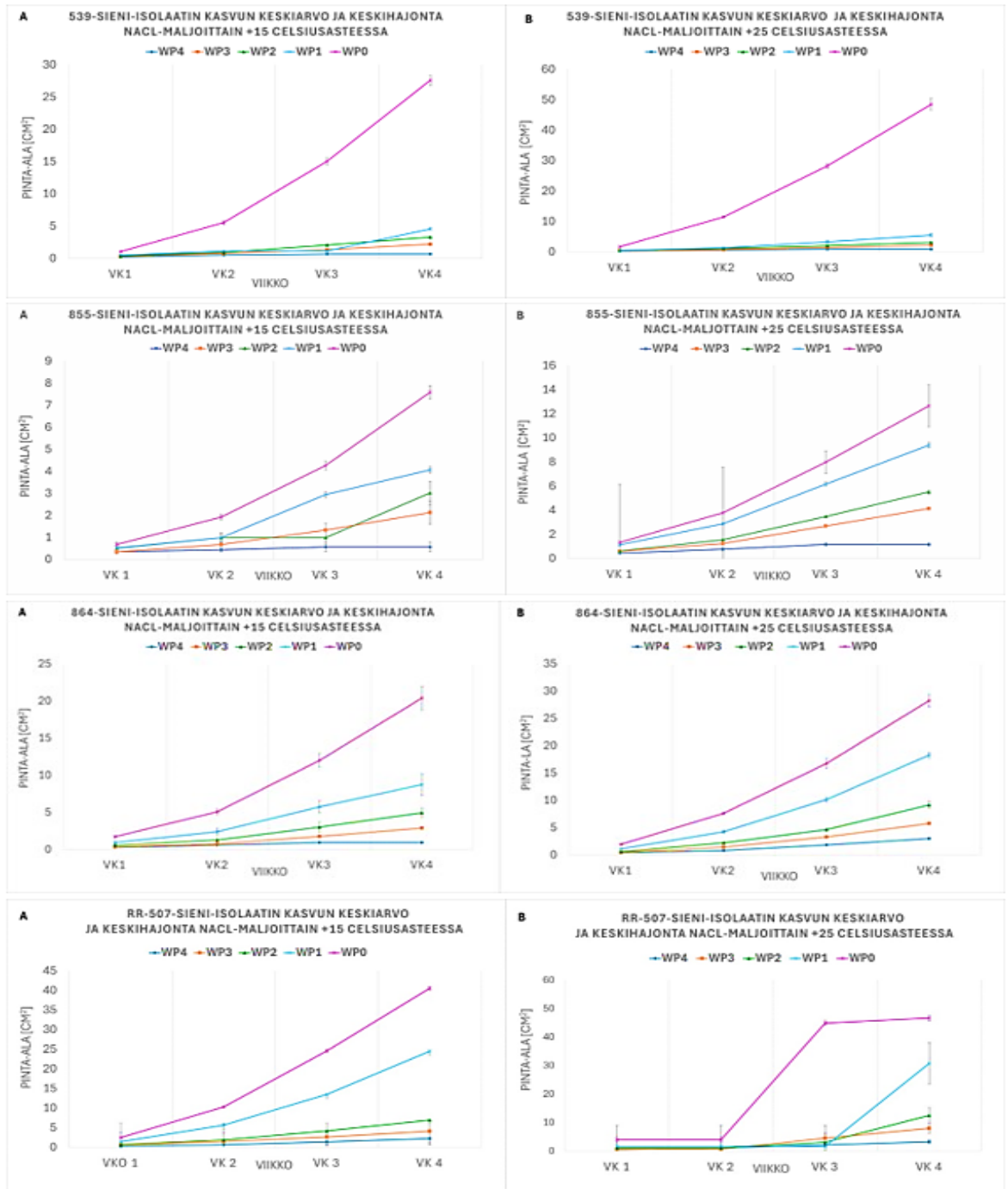
### 5.1 PCR-tulokset

Sieni-isolaattien PCR:n onnistuminen varmennettiin agarosigeelielektroforeesilla. Esimerkkikuvat geeleistä on esitetty liitteessä 3. PCR-tuotteiden koon määrittämiseen käytettiin molekyylikokostandardia. ITS- ja EF-PCR-tuotteiden koot vaihtelivat sienilajien välillä (liite 3). ITS-alukkeilla saatiin monistettua yleensä 600 bp:n kokoinen tuote, kahta poikkeusta lukuun ottamatta (1000 bp). EF-alukkeilla saatiin monistettua yleensä 800 bp:n kokoinen tuote, muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta (1000 bp). Bt-alueen monistaminen ei onnistunut käytetyillä alukkeilla. Jokaiseen geeliin pipetoitiin negatiivinen kontrolli, jonka tuli sisältää ainoastaan alukkeiden toisiinsa sitoutunutta lyhyttä epäspesifistä monistustuotetta. Jos tutkittava DNA ei tuottanut yhtä spesifistä PCR-tuotetta, reaktio toistettiin käyttämällä eri DNA:n määrää tai säätämällä eri olosuhteet. Työssä onnistuttiin monistamaan sekä ITS- ja EF- alueita yhteensä 15 sieni-isolaatista, mukaan lukien kokeessa käytetyt neljä sieni-isolaattia (539, 855, 864 ja RR-507).

## 5.2 DSE-sieni-isolaattien kasvu ja tilastollinen tarkastelu NaCl-kasvatusmaljoilla

Kaikkien DSE-sieni-isolaattien (539, 855, 864 ja RR-507) kasvu neljän viikon aikana +15 °C:ssa ja +25 °C:ssa NaCl-kasvatusmaljoilla on esitetty kuvassa 6. Skannatuilta kasvatusmaljoilta mitattiin digitaalipanimetrillä sienien pinta-ala jokaisen merkityn viikon kohdalta. Pinta-alat merkittiin taulukkoon, ja niistä laskettiin Excel-tilaukko-ohjelmalla keskiarvo ja keskihajonta maljakohtaisesti. Näiden tietojen perusteella piirrettiin kuvaaja eri maljoilla (WP0-, WP1-, WP2-, WP3-, ja WP4) kasvaneen sienien pinta-ala (cm<sup>2</sup>) neljännen viikon kohdalta. Lämpötilakäyrät on merkitty kukin omalla värillään. WP0-käyrä on esitetty violetinvärisenä, WP1 vaaleansinisenä, WP2 vihreänvärisenä, WP3 oranssinvärisenä ja WP4 tummansinisenä. Lämpötilakäyrästä voidaan päätellä, miten lämpötila vaikuttaa DSE-sienilajien kasvuun, jotka ovat siirrostettu koostumukseltaan erilaisiin petrimaljoihin.

Esimerkiksi 855-sieni-isolaatin lämpötilakäyrät kasvoivat tasaisesti molemmissa lämpötiloissa, mikä näkyi käyrien samanmuotoisuudessa. 864-sieni-isolaatin lämpötilakäyrät olivat myös samanmuotoisia molemmissa tarkasteluissa lämpötiloissa. Lämpötilakäyrät jyrkkenevät hieman +25 °C:ssa, mikä tarkoitti sitä, että korkeampi lämpötila kiihdytti 864-sieni-isolaatin kasvua eri NaCl-maljoilla. RR-507-sieni-isolaatin WP0- ja WP1-lämpötilakäyrissä oli eroavaisuutta +15 ja +25 °C:ssa. WP0- ja WP1-käyrät kasvoivat +15 °C:ssa tasaisen nousevasti. +25 °C:ssa RR-507-sieni-isolaatin pinta-ala WP0-maljalla oli kahden ensimmäisen viikon aikana sama eli kasvua ei ollut tapahtunut. Viikko 2 eteenpäin pinta-ala kasvaa tasaisesti, kunnes viikosta 3 eteenpäin, kasvu pysähtyi taas. WP1-maljalla ensimmäisen kolmen viikon aikana pinta-ala oli sama eli kasvua ei ollut tapahtunut, kunnes viikko 3:n ja viikko 4:n välillä tapahtui tasaista kasvua. WP2-, WP3-, ja WP4-lämpötilakäyrät olivat molemmissa lämpötiloissa samanmuotoiset. WP2-, WP3-, ja WP4-lämpötilakäyrät kasvoivat hieman jyrkemmin +15 °C:ssa, mikä tarkoitti sitä, että alempi lämpötila kiihdytti DSE-sienten kasvua näissä maljoissa (kuva 6). Kontrollimaljoihin (WP0) ei ole lisätty suolaa ollenkaan (liite 1). WP1-WP4 maljoihin oli lisätty suolaa kasvavan vesipotentiaalin mukaan (liite 1).

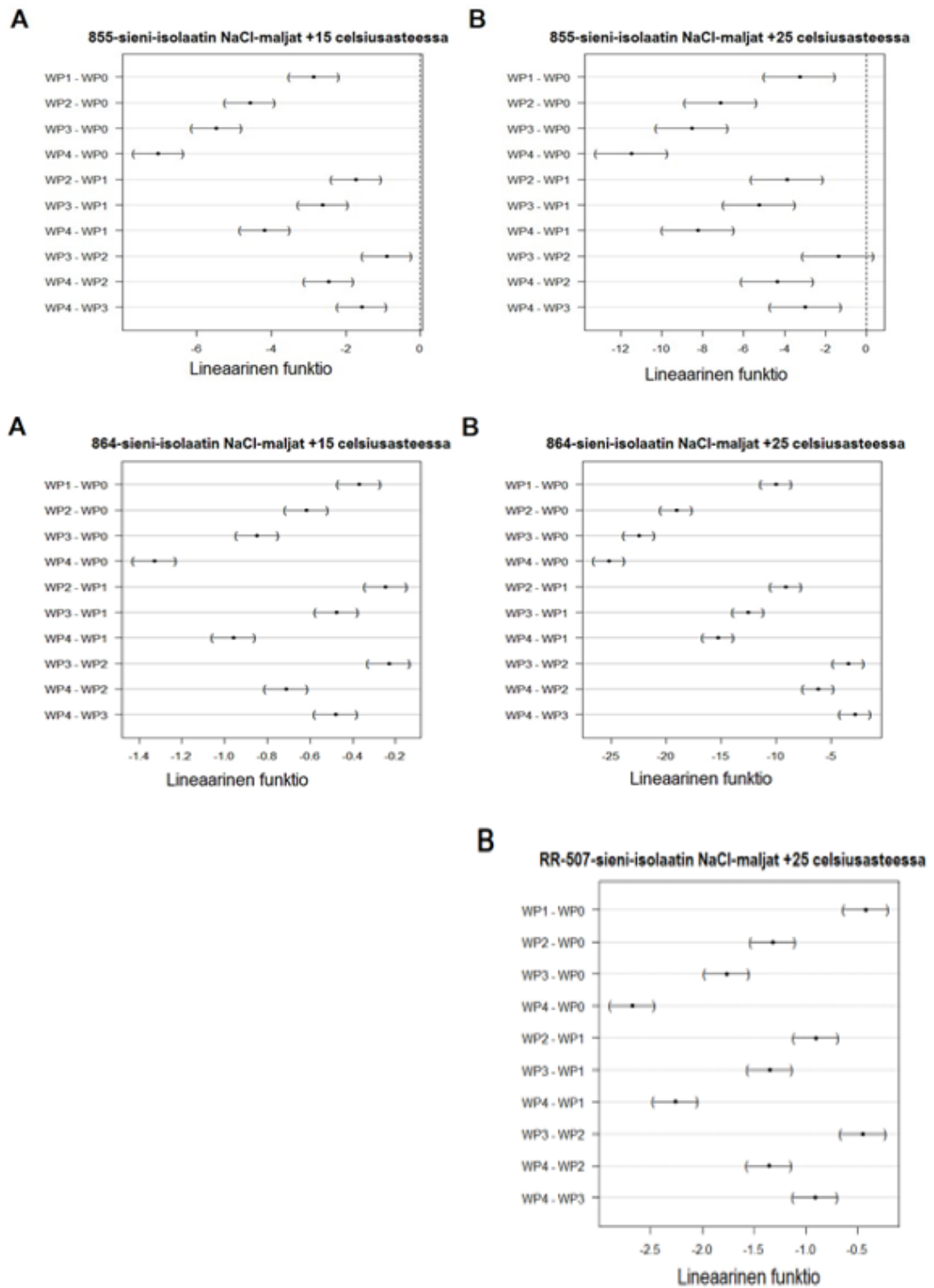


Kuva 6. Neljän (539, 855, 864 ja RR-507) DSE-sieni-isolaattien kasvu NaCl-maljoilla +15 °C:ssa ja +25 °C:ssa.

Seuraavassa osuudessa tarkasteltiin kuivuuden vaikutusta DSE-sienten kasvuun tilastollisilla testeillä. Sieni-isolaatin 539 aineiston Shapiro-Wilken testin mukaan kasvatusmatriisi +15 ( $p$ -arvo =  $4,539e-6 < 0,05$ ) eikä kasvatusmatriisi +25 noudattanut normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $1,731e-5 < 0,05$ ). +15 ja +25-

aineistoja ei saatu normaalijakautuneeksi neliöjuuren, käänteisluvun ja logaritmin muunnoksilla, joten niille piti tehdä Kruskal-Wallis testin mukaan kasvatusmatriisin +15 maljojen välillä on tilastollista eroa ( $p\text{-arvo} = 0,001085 < 0,05$ ) sekä kasvatusmatriisin +25 maljojen välillä on tilastollista eroa ( $p\text{-arvo} = 0,001085 < 0,05$ ). Jokaisen maljaparin kohdalla tuli varmistaa normaalijakautuneisuus +15 ja +25 aineistojen kohdalla. Taulukossa 1 näkyy maljapareittain sieni-isolaatin 539 Shapiro-Wilkenin p-arvot ja johtopäätökset (liite 4). Maljapari WP3WP2 oli ainoa, joka noudatti normaalijakaumaa. Maljaparien aineistot, jotka eivät noudattaneet normaalijakaumaa, tehtiin kahden näytteen Wilcoxonin testi. Taulukossa 2 esitettiin maljaparien tilastolliset testit ja p-arvot (liite 4). Vastaavasti taulukossa 3 esitettiin kasvatusmatriisin +25 Shapiro-Wilkenin testin p-arvot ja johtopäätökset (liite 4). Mikään maljapareista ei noudattanut normaalijakaumaa. Taulukossa 5 nähdään kahden Wilcoxonin testien p-arvot ja johtopäätökset (liite 4).

Sieni-isolaatin 855 aineiston Shapiro-Wilken testin mukaan kasvatusmatriisi +15 noudatti normaalijakaumaa ( $p\text{-arvo} = 0,06977 > 0,05$ ). Myös kasvatusmatriisi +25 noudatti normaalijakaumaa ( $p\text{-arvo} = 0,1694 > 0,05$ ). Varianssianalyysiä varten selvitettiin varianssien samankaltaisuus Levenen testeillä, joiden mukaan sekä kasvatusmatriisin +15 ( $p\text{-arvo} = 0,5246 > 0,05$ ) että kasvatusmatriisin +25 ( $p\text{-arvo} = 0,1498 > 0,05$ ) varianssit eivät tilastollisesti eronneet toisistaan. Molemmille kasvatusmatriiseille (+15 ja +25) tehtiin yksisuuntainen ANOVA, jonka mukaan neljän viikon kasvatuskokeen jälkeen kasvatusmaljojen koostumus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi sienien kasvuun (+15:  $p\text{-arvo} = 2,49e-14 < 0,05$ , +25:  $p\text{-arvo} = 1,97e-11 < 0,05$ ). Tukeyn parittaisten post-hoc -vertailujen mukaan +15 °C:ssa 855-sieni-isolaatin kasvu poikkesi kaikkien kasvatusmaljojen välillä tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla. +25 °C:ssa 855-sieni-isolaatin kasvu poikkesi tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla kaikkien maljojen välillä paitsi WP3- ja WP2-maljojen välillä (kuva 7).



Kuva 7. Normaalijakautuneiden DSE-sieni-isolaattien yksisuuntaiset ANOVAT.

Sieni-isolaatin 864-aineiston Shapiro-Wilken testin mukaan kasvatusmatriisi +15 ei noudattanut normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,001391 < 0,05$ ) eikä

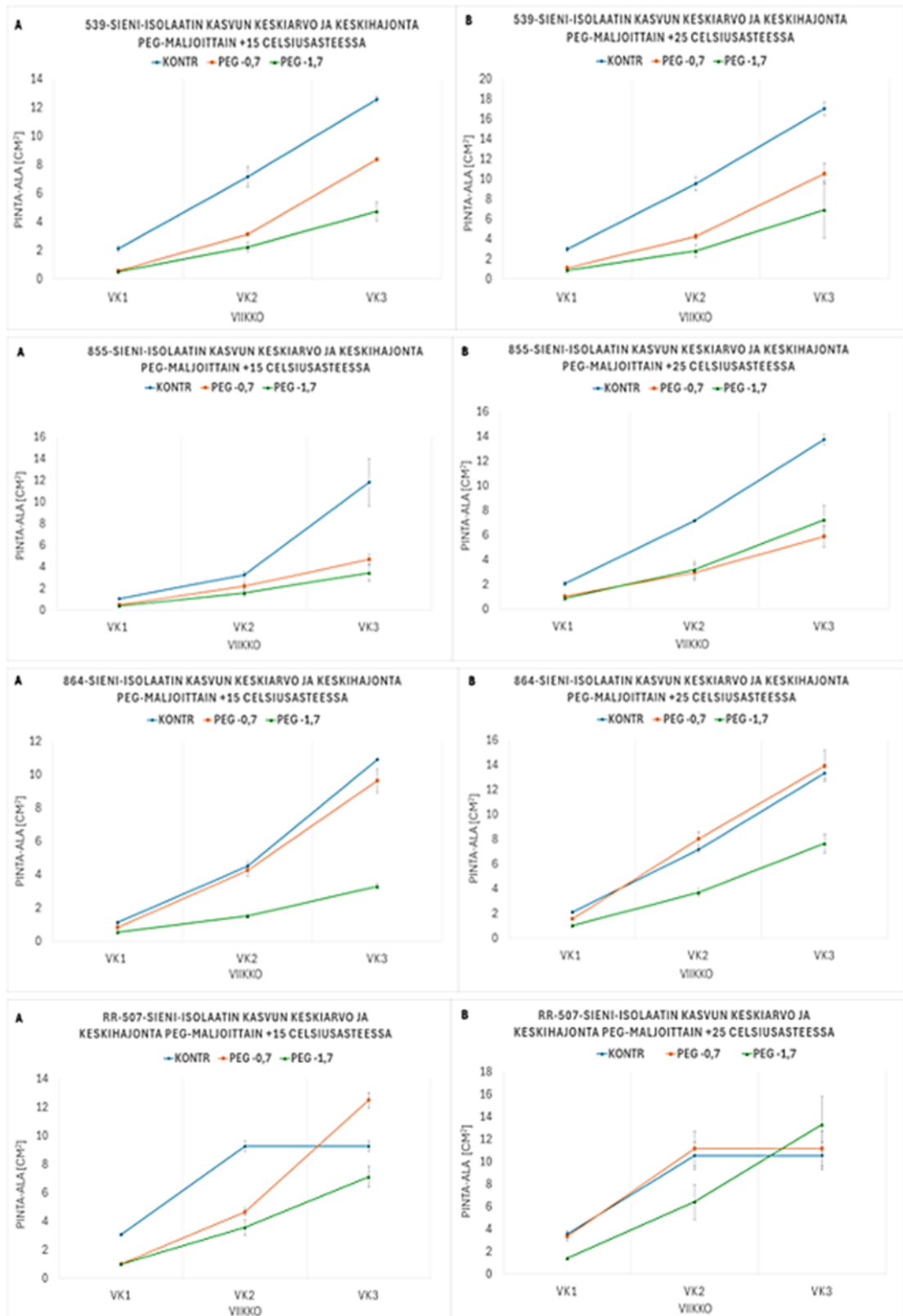
kasvatusmatriisi +25 noudattanut normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,00632 < 0,05$ ). Sieni-isolaatin 864 kasvatusmatriisin +15 viikko 4 -aineisto saatiin normaalijakautuneeksi muuntamalla se  $\log_{10}(\text{vk4})$  -funktiolla ( $p$ -arvo =  $0,1498 > 0,05$ ) ja kasvatusmatriisin +25 viikko 4 -aineisto saatiin normaalijakautuneeksi muuntamalla se  $\log_{10}(\text{vk4})$  -funktiolla ( $p$ -arvo =  $0,05583 > 0,05$ ). Varianssianalyysiä varten selvitetiin varianssien samankaltaisuus Levenen testeillä, joiden mukaan sekä kasvatusmatriisin +15 ( $p$ -arvo =  $0,2388 > 0,05$ ) että kasvatusmatriisin +25 ( $p$ -arvo =  $0,05522 > 0,05$ ) eivät tilastollisesti eronneet toisistaan. Molemmille kasvatusmatriiseille (+15 ja +25) tehtiin yksisuuntainen ANOVA, jossa oletettiin varianssit samansuuruisiksi. ANOVAN mukaan neljän viikon kasvatuskokeen jälkeen kasvatusmaljojen koostumus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi sienten kasvuun (+15:  $p$ -arvo =  $8.752e-10 < 0,05$  ja +25:  $p$ -arvo =  $1.838e-11 < 0,05$ ). Tukeyn parittaisten post-hoc -vertailujen mukaan, +15 °C:ssa 864-sienen kasvu poikkesi kaikkien maljojen välillä tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla. +25 °C:ssa 864-sienen kasvu poikkesi tilastollisesti 95 %:n merkitsevyydellä kaikkien maljojen välillä (kuva 7).

RR-507-aineiston Shapiro-Wilken testin mukaan kasvatusmatriisi +15 ei noudattanut normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,0004524 < 0,05$ ). Kasvatusmatriisin +15 viikko 4 -aineistoa ei saatu normaalijakautuneeksi neliöjuuren, käänteisluvun tai logaritmin muunnoksilla, joten siihen sovellettiin Kruskal-Wallis testin ja kahden näytteen Wilcoxonin testiä. Kruskal-Wallis testin mukaan kaikkien maljojen välillä on tilastollista eroa ( $p$ -arvo =  $0,001085 < 0,05$ ). Taulukossa 3 nähdään maljaparien normaalijakautuneisuus (liite 4, taulukko 3). RR-507-aineiston Shapiro-Wilkenin testin mukaan kasvatusmatriisi +25 ei noudattanut normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,002858 < 0,05$ ). Kasvatusmatriisin +25 viikko 4 -aineisto saatiin normaalijakautuneeksi  $\log_{10}(\text{vk4})$  -funktiolla ( $p$ -arvo:  $0,06946 > 0,05$ ). Varianssien samansuuruisuus varmistettiin Levenen testillä, joka oli ( $p$ -arvo:  $0,1921 > 0,05$ ). Aineistolle tehtiin yksisuuntainen ANOVA, jonka mukaan kaikki maljat poikkesivat tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla toisistaan (kuva 7).

### 5.3 DSE-sieni-isolaattien kasvu ja tilastollinen tarkastelu PEG-kasvatusmaljoilla

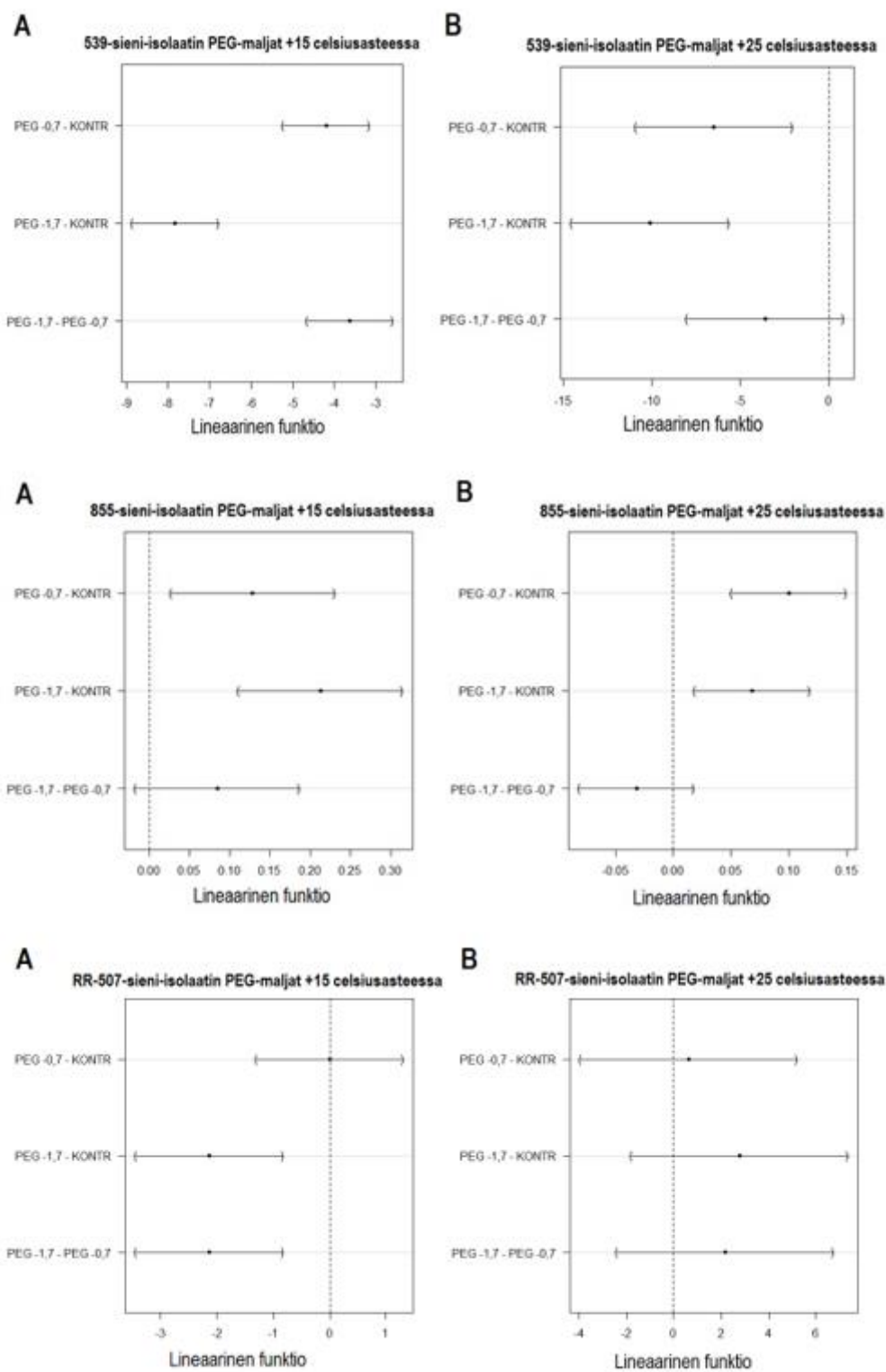
Kaikkien DSE-sieni-isolaattien (539, 855, 864 ja RR-507) kasvu kolmen viikon aikana +15 °C:ssa ja +25 °C:ssa PEG-kasvatusmaljoilla on esitetty kuvassa 8. Skannatuilta kasvatusmaljoilta mitattiin digitaalipanimetrillä sienien pinta-ala jokaisen merkityn viikon kohdalta. Pinta-alat merkittiin taulukkoon, ja niistä laskettiin Excel-tilukko-ohjelmalla keskiarvo ja keskihajonta maljakohtaisesti. Näiden tietojen perusteella piirrettiin kuvaaja eri maljoilla (KONTR-, PEG -0,7 ja PEG -1,7) kasvaneen sienien pinta-ala (cm<sup>2</sup>) kolmannen viikon kohdalta. KONTR-käyrä on piirretty sinisellä, PEG -0,7 oranssilla ja PEG -1,7 vihreällä. 539-lämpötilakäyrät kasvoivat molemmissa lämpötiloissa samanmuotoisina eli kasvu on ollut tasaista. 855-lämpötilakäyrät ovat kasvaneet tasaisesti molemmissa lämpötiloissa. Käyrät ovat +25 °C:ssa jyrkempiä, mistä voidaan päätellä, että korkeampi lämpötila kiihdyttää 855-sieni-isolaatin kasvua. 864-sieni-isolaatin lämpötilakäyrät olivat jyrkempiä +15 °C:ssa erityisesti KONTR- ja PEG -0,7-maljojen käyrät. Molemmissa lämpötiloissa KONTR- ja PEG -0,7-maljoissa olevat sienet kasvoivat tasaisesti kahden ensimmäisen viikon aikana (kuva 8).

RR-507-lämpötilakäyristä ei voitu tehdä yhteisiä johtopäätöksiä. Molemmissa lämpötiloissa KONTR-maljassa oleva sieni kasvoi viikko 2:sta asti tasaisesti, kunnes sen kasvu pysähtyi viimeisen viikon aikana. PEG -0,7-maljassa oleva sieni kasvoi +15 °C:ssa tasaisesti viikko 2:een asti. Viikko 3:n jälkeen kasvu kiihtyi, mikä näkyy käyrän jyrkkenemisenä. Päinvastaisesti +25 °C:ssa PEG -0,7 maljan sieni kasvoi viikko 2:een asti tasaisesti, ja viikko 3:sta eteenpäin sienien kasvu pysähtyi. PEG -1,7-maljan sienien kasvu +15 °C:ssa oli tasaista viikko 2:een asti, kunnes sen kasvu hidastui viikko 3:sta eteenpäin. Päinvastaisesti PEG -1,7-maljan sienien kasvu +25 °C:ssa oli tasaista viikko 2:een asti, kunnes sen kasvu kiihtyi viikko 3:sta eteenpäin (kuva 8).



Kuva 8. Neljän (539, 855, 864 ja RR-507) DSE-sieni-isolaattien kasvu PEG-maljoilla +15 celsiusasteessa ja +25 celsiusasteessa.

Seuraavassa osuudessa tarkastellaan kuivuuden vaikutusta tilastollisilla testeillä.



Kuva 9. Normaalijakautuneiden DSE-sieni-isolaattien yksisuuntaiset ANOVAT.

Sieni-isolaatin 539 Sharipo-Wilken testin mukaan PEG-kasvatusmatriisi +15 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,1518 > 0,05$ ) sekä PEG-kasvatusmatriisi +25 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,4343 > 0,05$ ). Varianssianalyysiä varten selvitettiin varianssien samankaltaisuus Levenen testeillä, joiden mukaan sekä PEG-kasvatusmatriisin +15 ( $p$ -arvo =  $0,3615 > 0,05$ ) että PEG kasvatusmatriisin +25 ( $p$ -arvo =  $0,604 > 0,05$ ) eivät tilastollisesti eronneet toisistaan. Molemmille kasvatusmatriiseille (PEG +15 ja PEG +25) tehtiin yksisuuntainen ANOVA, jonka mukaan kolmen viikon kasvatuskokeen jälkeen kasvatusmaljojen koostumus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi sienen kasvuun (+15:  $p$ -arvo =  $1,27e-6 < 0,05$ , +25:  $p$ -arvo =  $1,19e-3 < 0,05$ ). Tukeyn parittaisissa post-hoc-vertailujen mukaan +15 °C:ssa 539-sienen kasvu poikkesi kaikkien maljojen välillä tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla. +25 °C:ssa 539-sienen kasvu poikkesi tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla kaikkien maljojen välillä paitsi PEG -1,7 ja PEG -0,7 välillä (kuva 9).

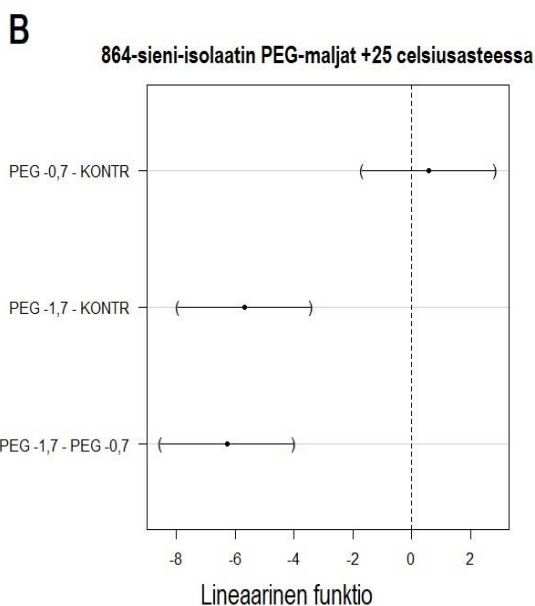
855-aineiston Sharipo-Wilken testin mukaan PEG-kasvatusmatriisi +15 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,1518 > 0,05$ ). PEG-kasvatusmatriisi +25 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,4343 > 0,05$ ). Varianssianalyysiä varten selvitettiin varianssien samankaltaisuus Levenen testeillä, joiden mukaan sekä PEG-kasvatusmatriisin +15 ( $p$ -arvo =  $0,3615 > 0,05$ ) että PEG-kasvatusmatriisin +25 ( $p$ -arvo =  $0,604 > 0,05$ ) eivät tilastollisesti eronneet toisistaan. Molemmille kasvatusmatriiseille (PEG +15 ja PEG +25) tehtiin yksisuuntainen ANOVA, jonka mukaan kolmen viikon kasvatuskokeen jälkeen kasvatusmaljojen koostumus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi sienen kasvuun (+15:  $p$ -arvo =  $6,29e-4 < 0,05$ , +25:  $p$ -arvo =  $7,06e-5 < 0,05$ ). Tukeyn parittaisissa post-hoc -vertailujen mukaan +15 °C:ssa 855-sienen kasvu poikkesi kaikkien maljojen välillä tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla paitsi PEG -1,7 ja PEG -0,7 välillä. +25 °C:ssa 855-sienen kasvu poikkesi tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla kaikkien maljojen välillä paitsi PEG -1,7 ja PEG -0,7 välillä.

RR-507-aineiston Sharipo-Wilken testin mukaan PEG-kasvatusmatriisi +15 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,1518 > 0,05$ ). PEG-kasvatusmatriisi +25 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo =  $0,4343 > 0,05$ ). Varianssianalyysiä varten

selvitettiin varianssien samankaltaisuus Levenen testeillä, joiden mukaan sekä PEG-kasvatusmatriisin +15 ( $p$ -arvo = 0,3615 > 0,05) että PEG +25 kasvatusmatriisin ( $p$ -arvo = 0,604 > 0,05) eivät tilastollisesti eronneet toisistaan. Molemmille kasvatusmatriiseille (PEG +15 ja PEG +25) tehtiin yksisuuntainen ANOVA, jonka mukaan kolmen viikon kasvatuskokeen jälkeen kasvatusmaljojen koostumus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi sienien kasvuun (+15:  $p$ -arvo = 6,29e-4 < 0,05, +25:  $p$ -arvo = 7,06e-5 < 0,05). Tukeyn parittaisissa post-hoc -vertailujen mukaan +15 °C:ssa RR-507-sienen kasvu poikkesi kaikkien maljojen välillä tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla paitsi PEG -1,7 ja PEG -0,7 välillä. +25 °C:ssa RR-507-sienen kasvu ei poikennut minkään maljojen välillä tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla (kuva 9).

864 aineiston Sharipo-Wilken testin mukaan PEG-kasvatusmatriisi +15 ei noudattanut normaalijakaumaa ( $p$ -arvo = 0,004616 > 0,05). PEG-kasvatusmatriisia +15 ei saatu normaalijakautuneeksi neliöjuuren, logaritmin tai käänteisluvun funktion avulla. Taulukossa 7 on esitetty maljaparien normaalijakautuneisuus (liite 4, taulukko 7) sekä taulukossa 8 tilastollisten testien  $p$ -arvot ja johtopäätökset (liite 4, taulukko 8). Kaikki maljaparit noudattivat normaalijakaumaa. Ainoastaan maljaparilla 0,7–1,7 oli tilastollista merkitsevyyttä, muilla kahdella ei. PEG-kasvatusmatriisi +25 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo = 0,07052 > 0,05). Varianssianalyysiä varten selvitettiin varianssien samankaltaisuus Levenen testeillä, joiden mukaan sekä PEG-kasvatusmatriisin +15 ( $p$ -arvo = 0,3615 > 0,05) että PEG +25 kasvatusmatriisin ( $p$ -arvo = 0,604 > 0,05) eivät tilastollisesti eronneet toisistaan. PEG-kasvatusmatriisi +25 noudatti normaalijakaumaa ( $p$ -arvo = 0,4343 > 0,05). Varianssianalyysiä varten selvitettiin varianssien samankaltaisuus Levenen testeillä, joiden mukaan PEG kasvatusmatriisin +25 ( $p$ -arvo = 0,604 > 0,05) eivät tilastollisesti eronneet toisistaan. Molemmille kasvatusmatriiseille (PEG +15 ja PEG +25) tehtiin yksisuuntainen ANOVA, jonka mukaan kolmen viikon kasvatuskokeen jälkeen kasvatusmaljojen koostumus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi sienien kasvuun (+15:  $p$ -arvo = 6,29e-4 < 0,05, +25:  $p$ -arvo = 7,06e-5 < 0,05). Tukeyn parittaisten post-hoc -vertailujen mukaan. +25

°C:ssa 864-sienen kasvu poikkesi tilastollisesti 95 %:n merkitsevyyden tasolla kaikkien maljojen välillä paitsi PEG -0,7 ja KONTR välillä (kuva 10).



Kuva 10. DSE-sieni-isolaatin 864 pinta-alan (cm<sup>2</sup>) Tukeyn vertailu kolmen viikon kasvun jälkeen +25 celsiusasteessa (B).

#### 5.4 DSE-sieni-isolaattien ITS- ja EF-sekvenssit

Yhteensä 15 sieni-isolaatin ITS2- ja EF-alueiden PCR-tuotteiden sekvenssit selvitettiin. Sekvenssien samankaltaisuutta selvitettiin linjaamalla ensin kaikki ITS- ja EF-sekvenssit erikseen. ITS2-alueen perusteella suurin osa sieni-isolaattien sekvensseistä jakautui kahteen ryhmään, joissa oli kahdeksan sientä (ryhmä 1, R1: 896, 901, 544, 898, 937, 906, 936 ja 855) ja 4 sientä (ryhmä 2, R2: 539, 802, 543 ja 797). Näiden ulkopuolelle jäivät isolaatit RR-507, 864 ja 897, joista kahden viimeisen sekvenssit olivat hyvin samankaltaiset. Taulukossa 2 EF-alueen sekvenssien samankaltaisuutta käyttäen isolaatit ryhmittyivät kuten ITS2-

alueella, mutta tässä tapauksessa neljän sieni-isolaatin ryhmästä yksi (543) erosi muista (liite 5).

NCBI:n BLAST-hakua ja MycoBankin Pairwise alignment -työkalua käytettiin sieni-isolaattien sekvenssien homologiahauissa. ITS2-alueen sekvenssien samankaltaisuus, joka vaihteli välillä 87,11–98,88 % (taulukko 1, liite 5). NCBI:n BLAST-haulla (liite 5). EF-alueen sekvenssien samankaltaisuus 84,23–98,28 % NCBI:n BLAST-haulla (taulukko 2, liite 5). Tulosten perusteella ryhmän 1 jäsenet ovat suvun *Hyalocypha* jäseniä, ryhmän 2 jäsenet kuuluvat sukuun *Phialocephala* ja RR-507, 864 ja 897 kuuluvat lajikompleksiin *Phialocephala fortinii–Acephala applanata* (taulukko 1 ja 2, liite 5).

## 6 Johtopäätökset

Kaikkien kokeessa käytettyjen DSE-sieni-isolaattien (539, 855, 864 ja RR-507) ITS- ja EF- alueiden PCR-tuotteet saatiin sekvensoitua. Bt-geenialuetta ei sekvensoitu. Kaikista sieni-isolaateista, joista tässä työssä eristettiin DNA, ei saatu tuotettua spesifisiä monistustuotteita. Tämä saattoi johtua useasta eri syystä. Osa sieni-isolaateista saattoi olla sekaviljelmiä. Heikot monistustuotteet saattoivat johtua liian suuresta näytelaimennoksesta tai kontaminaatiosta. Alukkeet saattoivat olla käytetyille sienille vääränlaisia tai liian vanhoja, mikä voi tehdä niistä toimimattomia. Kaikkien tutkittujen DSE-sieni-isolaattien (539, 855, 864 ja RR-507) sekvenssit saatiin onnistumaan ITS- ja EF-alueilta. Sekvenssit varmistivat isolaattien kuuluvan *Phialocephala fortinii–Acephala applanata* -lajikompleksiin sekä *Phialocephala*- ja *Hyalocypha*-sukujen lajeihin. Tämän lisäksi juuriendofyyttisienten kokoelmasta saatiin sekvensoitua yhteensä 11 isolaatin ITS- ja EF-PCR-tuotteet.

Osa DSE-sieni-isolaateista kasvoi NaCl- ja PEG-maljoilla odotettua nopeammin. Kasvatuskokeen arvioitu kesto aika oli kuusi viikkoa. Osa DSE-sieni-isolaateista kasvoi jo neljässä viikossa NaCl- ja PEG-maljojen pinta-alan yli. Kasvatuskokeessa tutkittiin lämpötilan ja kuivuuden yhteisvaikutusta DSE-sienten kasvuun. NaCl-maljojen koostumus vaikutti kaikkien DSE-sieni-isolaattien kasvuun

+25 °C:ssa ja +15 °C:ssa. Poikkeus oli 855-sieni-isolaatin WP3-WP2-maljapari, jossa sienien kasvu oli samanlaista molemmilla maljoilla. NaCl-maljoilla kasvaneiden DSE-sieni-isolaattien välillä oli tilastollisesti enemmän eroja kuin PEG-maljoilla kasvaneiden.

539-sieni-isolaatin kohdalla kaikki maljojen koostumus vaikutti kasvuun lukuun ottamatta PEG -1,7 ja PEG -0,7-maljaparin välillä +25 °C:ssa. 855-sieni-isolaatin kohdalla kaikkien maljojen koostumus vaikutti kasvuun lukuun ottamatta PEG -1,7 ja PEG -0,7-maljaparin välillä sekä +15- ja +25 °C:ssa. 864-sieni-isolaatin kohdalla kaikkien maljojen koostumus vaikutti kasvuun lukuun ottamatta +15 °C:ssa maljapari PEG -1,7 ja PEG -0,7 sekä maljapari PEG -0,7-KONTR +25 °C:ssa. Poikkeuksen tästä säännöstä muodosti RR-507-isolaatin maljapari PEG -0,7 +15 °C:ssa, johon ei vaikuttanut maljan koostumus. Minkään maljaparin koostumus +25 °C:ssa ei vaikuttanut RR-507-sienen kasvuun. Osmoosipotentiaali vaikutti enemmän DSE-sienten kasvuun kuin matriisipotentiaali. Osa lajeista pystyi vastustamaan lämpötila- ja kuivuusstressiä paremmin PEG-maljoilla, erityisesti lajit 855, 864 ja RR-507. Lämpötilan kasvu kiihdytti DSE-sieni-isolaattien kasvua kaikilla kasvatusmaljoilla vastoin asetettua hypoteesia. Suomen maaperän lämpötilat vaihtelevat +2 °C:sta +15 °C:seen [37]. Kasvatuskokeen alussa oletettiin, että lämpötilan nosto +25 °C:seen hidastaa tai pysäyttää tutkittavien sienien kasvun. Vesipotentiaalini eli kuivuuden kasvaessa sienien kasvu hidastui kaikilla kasvatusmaljoilla. Mitä vähemmän vettä sienillä oli käytettävissä elintoimintoihin, sitä hitaampaa niiden kasvu oli.

Aikaisempien tutkimusten mukaan endofyyttisienet tuottavat kuivuus- ja lämpötilastressin aikana kemiallisia yhdisteitä, jotka suojaavat isäntäkasvia tuholaishyönteisiltä ja kasvitaudeilta. Jotkin lajit saattavat muuttua patogeeneiksi kuivuus- ja lämpötilastressin aikana. Tämän perusteella voidaan asettaa hypoteeseja siitä, miten ilmastonmuutoksen aiheuttama lämpötilan nousu vaikuttaa DSE-sienten ekologiaan. Lämpötilan nousu voi aluksi nopeuttaa sienten kasvua, mutta kuivuuden lisääntyessä kasvu saattaa hidastua tai jopa loppua. *Phialocephala*-lajin kuivuuden sietävyydestä on tehty aikaisempi tutkimus. Tämän mukaan *Phialocephala*-sukuun kuuluvista DSE-lajeista vain 22,2 %

pystyivät vastustamaan kuivuusstressiä PEG-maljoilla, joiden vesipotentiaali oli säädetty 20 MPa:n suuruiseksi. Juurista eristetyt DSE-sienilajit sietivät kuivuusstressiä paremmin kuin lehdistä eristetyt. [38; 39.]

Toisessa samankaltaisessa tutkimuksessa kartoitettiin *F. graminearum*-patogeenin kasvua ja siihen vaikuttavia abioottisia tekijöitä. Tutkittiin, miten osmoottinen ja matriisipotentiaali vaikuttivat +15 ja +25 °C:ssa patogeenin kasvuun. Osmoottinen potentiaalinen oli säädetty –0,7 MPa:sta –14,0 MPa:liin. Tulokset osoittivat, että osmoottisella sekä matriisipotentiaalilla oli suuri vaikutus patogeenin kasvuun. Nämä molemmat tutkimukset tukevat tämän opinnäytetyön kasvatuskokeen tuloksia. Osmoottisen ja matriisipotentiaalilin kasvaessa sienten kasvu hidastuu. [40.]

DSE-sienten tutkimusta voi jatkaa järjestelemällä uusia kasvatuskokeita laboratorio-olosuhteissa. Endofyyttisieniä eristetään isäntäkasveista, ja siirrostetaan kasvamaan petrimaljoille. Kasvatuskokeessa voidaan tutkia lämpötilan ja vesipotentiaalilin lisäksi pH:n vaikutusta sienten kasvuun. Kasvatusmaljojen koostumusta voidaan säätää erilaisilla suoloilla ja säätää suuremmaksi kahden vesipotentiaalilin eroa. Samalla tavalla voidaan tutkia kahden eri lämpötilan eron vaikutusta sienten kasvuun. Lämpötilaero voi olla suurempi tai pienempi sen mukaan, kuinka tarkasti halutaan määrittää sienten kasvun poikkeavuus. Jotkin endofyyttisienet erittävät kasvatusalustaansa bioaktiivisia aineita. Voidaan siis tarkastella myös substraatin määrää säädettyissä olosuhteissa. Laboratorio-olosuhteissa voidaan tutkia kahta tai useampaa muuttujaa ja selvittää niiden vaikutusta sienten kasvuun. Opinnäytetyössä tarkasteltiin tilastollisesti neljän sieni-isolaatin lajin sisäisiä eroja. Jatkotutkimuksessa voidaan tarkastella kahden tai useamman sieni-isolaatin lajin välisiä eroja tilastollisesti. Kenttätutkimuksissa endofyyttisienen lisäksi voidaan tutkia sen isäntäkasvia. Tällä tavoin saadaan tutkittua paremmin endofyyttisienen ja isäntäkasvin välistä symbioosisuhdetta ja ekologiaa.

## Lähteet

- 1 Kykkänen, Sanna; Semberg, Sanni; Pennanen, Taina; Terhonen, Eeva ja Sutela, Suvi. 2023. Tummväliseinäisten sienien hyötykäyttömahdollisuudet kasvien terveydensidonnassa ja hiilensidonnassa. Verkkoaineisto. Luonnonvarakeskus. <[https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/554372/LUKE\\_A78729\\_TP1\\_raportti\\_DSE\\_2023.pdf;jsessionid=912121A4F0AA0717F8FD3DE1B8B204BB?sequence=1](https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/554372/LUKE_A78729_TP1_raportti_DSE_2023.pdf;jsessionid=912121A4F0AA0717F8FD3DE1B8B204BB?sequence=1)>. 19.9.2023. Luettu 12.4.2024.
- 2 Luken esittely. Verkkoaineisto. Luonnonvarakeskus. <<https://www.luke.fi/fi/tietoa-lukesta/esittely>>. Luettu 12.4.2024.
- 3 State of the World. Plants and Fungi. 2023. Verkkoaineisto. New York Botanical Garden. <[https://www.nybg.org/content/uploads/2023/10/NYBG-State-of-the-Worlds-Plants-and-Fungi-2023-Release\\_ADA.pdf](https://www.nybg.org/content/uploads/2023/10/NYBG-State-of-the-Worlds-Plants-and-Fungi-2023-Release_ADA.pdf)>. Päivitetty 3.10.2024. Luettu 1.11.2024.
- 4 Moore, David & Alexopoulos, Constantine John. 2024. Fungus. Verkkoaineisto. Britannica. <<https://www.britannica.com/science/fungus>>. Päivitetty 23.10.2024. Luettu 1.11.2024.
- 5 Kingdom Fungi. Verkkoaineisto. Bujy's. <<https://byjus.com/biology/kingdom-fungi/>>. Luettu 15.8.2024.
- 6 Teuvo, Ahti; Aro, Nina; Arvas, Mikko; Hannukkala, Asko; Hantula, Jarkko; Hatakka, Annele; Heinonsalo, Jussi; Helander, Marjo; Hilden, Kristiina; Huhtinen, Seppo; Härkönen, Marja & Issakainen, Jouni. 2018. Sienten biologia. 2, uudistettu painos. Viljandi; Printbest.
- 7 Gautam, Kumar Ajay; Verma, Kumar Rajnish; Avathi, Shubhi; Sushma; Bohra, Yogita; Devadatha, Bandarupalli; Niranjana, Mekala & Suwanarach, Nakurin. 2022. Current Insight into Traditional and Modern Methods in Fungal Diversity Estimates. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8955040/>> Päivitetty 24.2022. Luettu 15.8.2024.
- 8 Antonelli; Fry A; Smith C.; Eden R.J.; Govaerts J.; Kersey R.H.A.; Lughadha Nic; Onstein E.; Simmonds R.E.; Zizka M.S.J.; Ackerman A., & Ainsworth V.M.,. 2023. State of the World's Plants and Fungi 2023. Verkkoaineisto. The New Phytologist. <<https://www.kew.org/sites/default/files/2023-10/State%20of%20the%20World%27s%20Plants%20and%20Fungi%2023.pdf>>.

- 9 Lücking Robert; Aime M.Catherine; Robbertse Barbara; Miller Andrew.N; Aoki Takayuki; Ariaywansa Hiran A; Cardinali Gianlugi; Crous Pedro W.; Druzhinina Irina S.; Geiser David M.; Hawksworth David L. & Hyde Kevin D. 2021. Fungal Taxonomy and sequence-based nomenclature. Verkkoaineisto. Nature microbiology. <<https://wi.knaw.nl/images/pr/Candida/OnlinePDF.pdf>> Päivitetty 25.7.2022. Luettu 15.8.2024.
- 10 Coccidioides Immitis. Verkkoaineisto. Creative Biolaps. <<https://www.creative-biolaps.com/drug-discovery/therapeutics/coccidioides-immitis.htm>>.
- 11 Werner Peter. Fungal Taxonomy I: The Basal Fungi. Verkkoaineisto. MykoWeb. <[https://www.mykoweb.com/articles/taxonomy\\_1.html](https://www.mykoweb.com/articles/taxonomy_1.html)>
- 12 Wang Fang; Wang Ke; Cai Lei; Zhao Mingju; Kirk Paul M; Fan Guomei; Sun Qinglan; Li Bo; Wang Shuai; Yu Zhengfei; Han Dong; Ma Juncai; Wu Linhuan & Yao Yijian. Fungal names: a comprehensive nomenclatural repository and knowledge base for fungal taxonomy. Verkkoaineisto. National Center of Biotechnological Information. <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9825588/>>. Luettu 1.11.2024.
- 13 Moore David & Ahmadjian Vernon. 2024. Outline of classification of fungi. Verkkoaineisto. Britannica. <<https://www.britannica.com/science/fungus/Annotated-classification>>. Päivitetty 24.10.2024. Luettu 15.8.2024.
- 14 Zhou Li-Wei; May Tom W.; 2022. Fungal Taxonomy: current and research agendas for the interdisciplinary and globalization era. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9930751/>>. Päivitetty 25.7.2022. Luettu 15.8.2024.
- 15 Lindahl Björn.D; Nilsson R.Henrik; Tedersoo Leho; Abarenkov Kessy; Carlsen Tor; Kjøller Rasmus; Koljag Urmaz; Pennanen Taina; Rosendahl Søren; Stenlid Jan & Kauterud Håvard. 2013. Fungal Community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide. Verkkoaineisto. ResearchGate. <[https://www.researchgate.net/publication/236086356\\_Fungal\\_community\\_analysis\\_by\\_high-throughput\\_sequencing\\_of\\_amplified\\_markers\\_-\\_a\\_user's\\_guide\\_New\\_Phytol](https://www.researchgate.net/publication/236086356_Fungal_community_analysis_by_high-throughput_sequencing_of_amplified_markers_-_a_user's_guide_New_Phytol)>. Luettu 1.11.2024.
- 16 PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent USER GUIDE. 2018. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4367554\\_PrepMan-Rgnt\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4367554_PrepMan-Rgnt_UG.pdf)>. Päivitetty 17.4.2024. Luettu 15.8.2024.
- 17 Moore David. Essential Fungal Genetics. 2002. E-kirja. Internet Archive.

- 18 Antoniw J.F.; Arora D.K.; Basch J.D.; Benito E.P.; Bonfante B.; Bridge P.D.; Burnett W.V; Chiang S.-J.D.; Crespo A.; Cubero O.F.; D'Souza T.M. & Driver F. 1998. Applications of PCR in Mycology. Cab International.
- 19 Koukku Sanni. 2024. Okakaarnakuoriasten sinistäjäsiementen lajitunnistus DNA:n perusteella. Insinööriyö. Tampereen ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
- 20 White T.J; Bruns; Lee, S & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR protocols – a guide to a methods and applications. Academic Press.
- 21 Gardes, M. & Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol, Ecol.* 2, s.113-118.
- 22 Jacobs, K; Bergdahl D.R; Wingfield, M.J; Halik, S.; Seifert, K.A; Bright D.E & Wingfield, B.D. 2004. *Leptogradium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycol.Res.*
- 23 Glass, N.L & Donaldson, G.C. 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify concerned Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology.*
- 24 O'Donnell, K & Cigelnik, E. 1997. Two Divergent Intragenomic rDNA, ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103.
- 25 Justice Michael C; Hsu Ming-Jo; Tse Bruno; Ku Theresa; Balkovec James; Schmatz Dennis & Nielsen Jennifer. 1998. Verkkoaineisto. Elongation Factor 2 as a Novel Target for Selective Inhibition of Fungal Protein Synthesis. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818937063>>. 6.2.1998. Luettu 15.8.2024.
- 26 Zhao, Zhongtao, Liu, Huiquan, Luo, Yongping, Zhou, Shanyue; An Lin, Wang, Chenfang, Jin, Qiaojun, Zhou, Mingguo & Xu, Jin-Rong. 2014. Verkkoaineisto. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. <<https://www.nature.com/articles/srep06746>>. 23.10.2014. Luettu 15.8.2024.
- 27 Robbertse B. & Tatusova T. 2011. Verkkoaineisto. Fungal genome resources at NCBI. <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21501203.2011.584576#d1e263>>. 25.7.2011. Luettu 15.8.2024.

- 28 Vestberg Mauritz & Timonen Saari. 2018. Rihman kiertämät – kasvien ja sienten erottamaton elämä. Helsinki & Laukaa: Mauritz Vestberg.
- 29 Wen, Juan; Okyere Samuel Kumi; Wang, Shu; Wang, Jianchen; Xie, Lie; Ran, Yinan & Hu, Yanchun. 2022. Endophytic Fungi: An effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. Verkkoaineisto. MDPI. <<https://www.mdpi.com/2309-608X/8/2/205>>. 20.2.2022. Luettu 15.8.2024
- 30 Alam, Beena; Li, Junwen; Ge, Qún; Khan, Mueen Alam; Gong, Juwu; Mehmood, Shahid; Yuan, Youlu & Gong, Wankui. 2021. Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa. Verkkoaineisto. Frontiers. <<https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.791033/full> >. 17.12.2021. Luettu 15.8.2024
- 31 R Gruning, Christoph; Queloz, Valentin & N Siebert, Thomas. 2011. Structure of Diversity in Dark Septate Endophytes: From Species to Genes. Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications.
- 32 Mandyam Keerthi & Jumpponen Ari. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. 2005. Verkkoaineisto. Ingentaconnect. <<https://www.ingentaconnect.com/content/wfbi/sim/2005/00000053/00000001/art00013?crawler=true&mimetype=application/pdf>>. Luettu 15.8.2024.
- 33 Hiilisienten liiketoimintamahdollisuudet maa- ja metsätaloudessa. Verkkoaineisto. Luonnonvarakeskus. <[https://www.metsakeskus.fi/sites/default/files/document/a78729\\_tp4\\_raportti\\_smk\\_281223\\_liitteilla.pdf](https://www.metsakeskus.fi/sites/default/files/document/a78729_tp4_raportti_smk_281223_liitteilla.pdf)>. Luettu 15.8.2024.
- 34 Neville J. Dix & John Webster. 1995. Fungi of Extreme Environments. Springer Nature. <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-0693-1\\_12#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-0693-1_12#citeas)>. Luettu 15.8.2024.
- 35 Defining Water Potential – What it is. How to use it. Verkkoaineisto. Meter-Group. <<https://metergroup.com/measurement-insights/defining-water-potential-what-it-is-how-to-use-it/>>. Luettu 15.8.2024.
- 36 Iabal, S.Aujla & C.Paulitz, Timothy. 2017. An improved Method for Establishing Accurate Water Potential Levels at Different Temperatures in Growth. Verkkoaineisto. Frontiers Microbiology. <<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01497/full> >. 11.8.2024. Luettu 16.7.2024

- 37 Maaperän lämpötilat. Verkkoaineisto. Hiilipuu. <<https://www.hiilipuu.fi/index.php/2022/09/02/maaperan-lampotila/>>. Luettu 20.1.2025.
- 38 Mary Ridout; Jos Houbraken & George Newcombe. 2017. Xerotolerance of *Penicillium* and *Phialocephala* fungi, dominant taxa of fine lateral roots of woody plants in the intermountain Pacific Northwest, USA. *Rhizospere*. Vol 4, s. 94–103.
- 39 Andrzej Boczoń; Dorota Hilszczańska; Marta Wrzosek; Andrzej Szczepkowski & Zbigniew Sierota. 2021. Drought in the forest breaks plant–fungi interactions. *European Journal of Forest Research*. Vol 140, s. 1301–1321.
- 40 María Laura Ramírez; María Cecilia Farnochi & Sofía Noemí Chulze. 2013. Ecophysiology of *Fusarium graminearum* Main Pathogen Associated to Fusarium Head Blight in Latin America. *Fusarium Head Blight in Latin America*. s.45–55.

**WP0-, WP1-, WP2-, WP3-, ja WP4-petrimaljojen komponenttien määrät**

Taulukko 1. NaCl-maljojen komponenttien määrät grammoina.

<b>Malja</b>	<b>PDA (g)</b>	<b>NaCl (g)</b>	<b>Agar (g)</b>
WP0	20,43	0	4,25
WP1	20,42	10,16	4,25
WP2	20,41	22,14	4,26
WP3	20,41	31,77	4,27
WP4	20,43	41,67	4,27

## NaCl- ja PEG-liuosten valmistus ja kasvatuserävalmistus

Aloitettiin valmistamaan NaCl-petrimaljoja. Otettiin viisi säilöpulloa, joiden kylkeen kirjoitettiin järjestysnumero vesipotentiaalin mukaan. NaCl-maljoja aloitettiin tekemään punnitsemalla vaa`lla ohjeiden mukaisesti PDA:ta, NaCl:a ja jauhemaista agaria (liite 1). Tehtiin yhteensä viisi säilöpulloa, johon laitettiin suppilon kautta punnitut PDA:t, NaCl:t ja agar. Laimennettiin säilöpullot tislattulla vedellä lopputilavuuteen 850 ml. Säilöpullojen liuosta sekoitettiin kääntämällä niitä ylös-alas, ja lopuksi ravisteltiin. Jaettiin 850 millilitran säilöpullojen sisältö kahden muuhun pienempään säilöpulloon. Kun petrimaljoja aloitettiin valamaan, pienemmistä säilöpulloista oli helpompi annostella agarliuosta. Pienemmät säilöpullot autoklavoitiin 121 °C:ssa 30 minuutin ajan. Autoklavoinnin jälkeen pullot siirrettiin lämpökaappiin 65 °C:seen, ja annettiin jäähtyä siellä. Puhdistettiin laminaarikaappi valmiiksi, ja aloitettiin maljojen valaminen. Petrimaljoihin annosteltiin agarliuosta sen verran että malja täyttyi juuri ja juuri. Kun kaikki maljat oli valettu, ne jätettiin kansi auki odottamaan jähmettymistä. Kirjoitettiin sieni-isolaatin nimi, inokulointipäivämäärä, vesipotentiaalin arvo, inkubointilämpötila ja järjestysnumero.

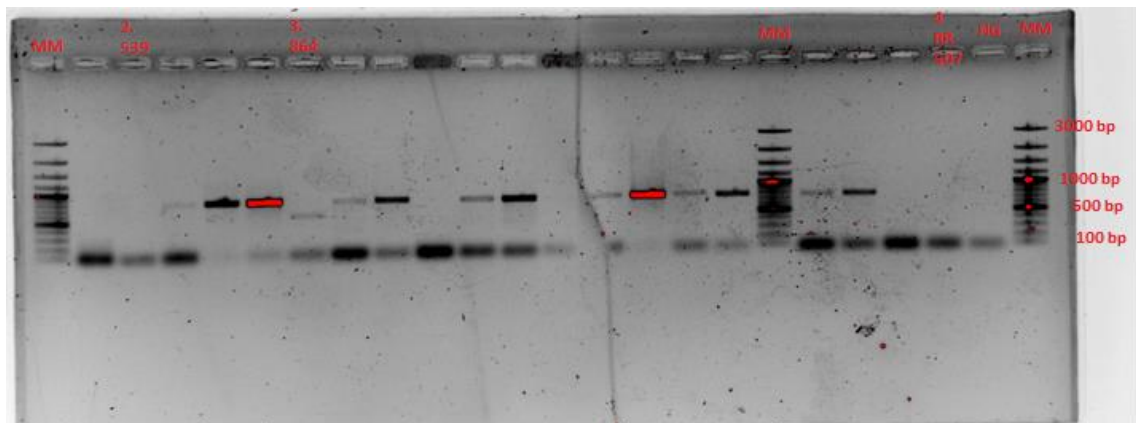
Liuosta varten punnittiin 2x 80 gramman ja 2x 140 gramman annosta PEG-jauhetta omiin erillisiin astioihin. Otettiin sekoituspullot, ja laitettiin niiden pohjalle valmiiksi tislattua vettä. Lopputilavuudeksi säädettiin 400 millilitraa. PEG-jauhe paakuuntui helposti, joten sitä täytyi liuottaa vähitellen. PEG-liuosta sekoitettiin magneettisekoittajalla. Liuotettiin vähitellen PEG-jauhetta suppilon kautta tislattuun veteen. Kun kaikki sekoituspulloissa olevat PEG-jauhot oli liuotettu, ne autoklavoitiin 121 °C:ssa 30 minuutin ajan. Autoklavoinnin jälkeen sekoituspullot siirrettiin jäähtymään huonelämpötilaan. PEG-maljan kanteen ja pohjaan merkittiin inkubointilämpötila, vesipotentiaalin arvo ja sieni-isolaatin numerokoodi.

Laminaarikaapissa merkattuihin PEG-maljoihin kaadettiin säädettävällä pipetillä 12 ml PEG-liuosta. PEG-liuosta oli väkevyydeltään kahdenlaista: -0,7 ja -1,7. Kun kaikki PEG-maljat olivat täytetty liuoksella, ne järjestettiin vesipotentiaalin

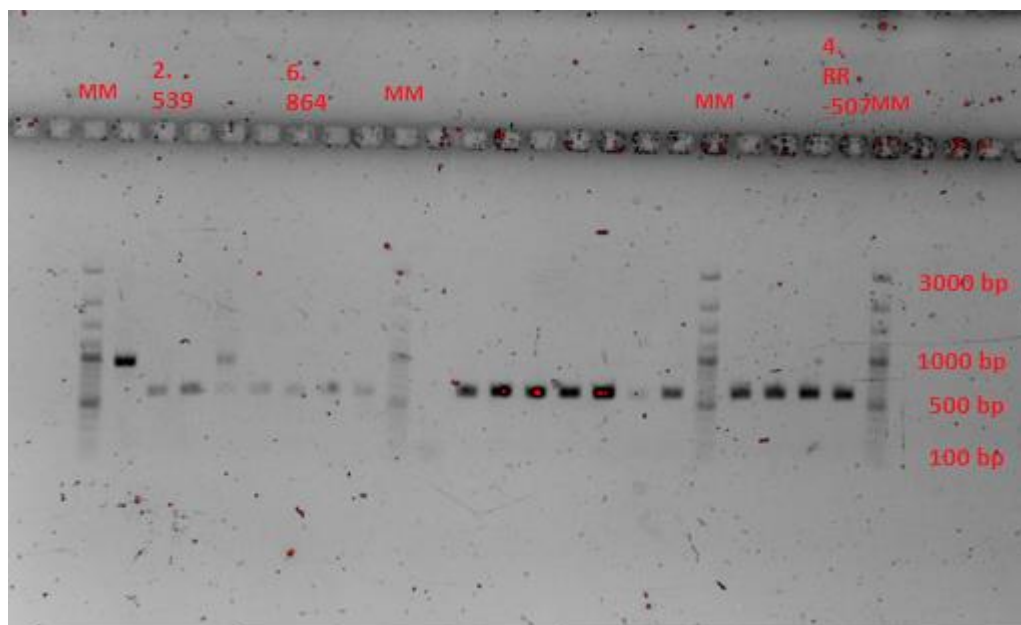
mukaan kasvavaan järjestykseen. Säilytyksen ajaksi PEG-maljojen päälle laitettiin folio, ja ne jätettiin laminaarikaappiin vuorokauden ajaksi. PEG-liuos kaadettiin pois kaikista maljoista vuorokauden jälkeen.

Inokulointi tarkoittaa näytteen siirtoa valmiista sieniviljelmistä puhtaille NaCl- ja PEG-maljoille. Inokulointi suoritettiin desifioidussa ja ilmastetussa laminaarikaapissa. Autoklavoiduilla korkkiporilla merkittiin näyte puhtasviljelmästä sekä siirrettiin veitsellä pyöreä ja kiinteä sienipala uuden petrimaljan keskelle. Tarvittaessa kirurginveitsiä desin fioitiin 200 °C:n helmisaattorissa ja 70-%:n etanolilla. Huolehdittiin hyvästä aseptiikasta, ja pyrittiin minimoimaan mahdolliset kontaminaatoriskit. Kun inokulointi oli suoritettu, maljojen ympärille laitettiin parafilmiä, ja vietiin laatikoissa inkuboitavaksi +15 °C:n ja +25 °C:n lämpökaappeihin.

## DSE-sieni-isolaattien agarosigeelikuvat



Kuva 1. EF-agarosigeelikuva.



Kuva 2. ITS-agarosigeelikuva.

## Ei-parametristen tilastotestien taulukot

Taulukko 1. Sieni-isolaatin 539 Shapiro-Wilkenin testin p-arvot +15 °C:ssa.

<b>539, 15°C, NaCl-maljat</b>	<b>Shapiro-Wilken testin p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
WP4WP3	0,01624 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP2	0,004107 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP1	0,002423 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP0	0,001645 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP3WP2	0,122 > 0,05	Noudattaa normaalijakaumaa
WP3WP1	0,01158 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP3WP0	0,001883 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP2WP1	0,03716 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP2WP0	0,001862 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP1WP0	0,001901 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa

Taulukko 2. Sieni-isolaatin 539 Wilcoxonin testit ja parittaisen t-testin p-arvot ja johtopäätökset.

<b>539, 15°C, NaCl-maljat</b>	<b>Tilastollinen testi ja sen p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
WP4WP3	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP4WP2	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP4WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi,	Ei tilastollista merkitsevyyttä

	0,02857 < 0,05	
WP4WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP3WP2	Parittainen t-testi, 0,00001338 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP3WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP3WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP2WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP2WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä
WP1WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista merkitsevyyttä

Taulukko 3. Sieni-isolaatin 539 Shapiro-Wilkenin p-arvot ja johtopäätökset.

<b>539, 25°C, NaCl- maljat</b>	<b>Shapiro-Wil- ken testin p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
WP4WP3	0,01038 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP2	0,01823 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP1	0,00953 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP0	0,001866 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP3WP2	0,5385 > 0,05	Noudattaa normaalijakaumaa
WP3WP1	0,03191 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP3WP0	0,001982 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP2WP1	0,1737 > 0,05	Noudattaa normaalijakaumaa
WP2WP0	0,002162 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP1WP0	0,002633 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa

Taulukko 4. Sieni-isolaatin 539 kahden näytteen Wilcoxonin testien ja parittaisen t-testin p-arvot ja johtopäätökset.

<b>539, 25°C, NaCl-maljat</b>	<b>Tilastollinen testi ja sen p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
WP4WP3	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP4WP2	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP4WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP4WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP3WP2	Parittainen t-testi, $0,006968 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP3WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP3WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP2WP1	Parittainen t-testi, $0,001159 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP2WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä
WP1WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, $0,02857 < 0,05$	Ei tilastollista merkittävyyttä

Taulukko 5. Sieni-isolaatin 539 Shapiro-Wilkenin testin p-arvot +15 celsiusasteessa.

<b>RR-507 15°C NaCl-maljat</b>	<b>Shapiro-Wilken testin p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
WP4WP3	0,01547 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP2	0,009859 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP1	0,001874 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP4WP0	0,001277 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP3WP2	0,02988 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP3WP1	0,001948 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP3WP0	0,00128 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP2WP1	0,002934 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP2WP0	0,001538 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa
WP1WP0	0,003588 < 0,05	Ei noudata normaalijakaumaa

Taulukko 6. Sieni-isolaatin RR-507 kahden näytteen Wilcoxonin testien p-arvot ja johtopäätökset.

<b>RR-507 ,15°C, NaCl-maljat</b>	<b>Tilastollinen testi ja sen p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
WP4WP3	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP4WP2	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP4WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP4WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP3WP2	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP3WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP3WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP2WP1	Kahden näytteen Wilcoxonin testi 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP2WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä
WP1WP0	Kahden näytteen Wilcoxonin testi, 0,02857 < 0,05	Ei tilastollista mer- kitsevyyttä

Taulukko 7. Sieni-isolaatin 864 Shapiro-Wilkenin testin p-arvot +15 °C:ssa.

<b>864, 15°C, PEG-maljat</b>	<b>Shapiro-Wilken testin p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
PEG -1,7- PEG -0,7	0,4847 > 0,05	Noudattaa normaalijakaumaa
PEG -1,7	0,2353 > 0,05	Noudattaa normaalijakaumaa
PEG -0,7	0,178 > 0,05	Noudattaa normaalijakaumaa

Taulukko 8. Sieni-isolaatin 864 kahden näytteen Wilcoxonin testien ja parittaisen t-testin p-arvot ja johtopäätökset.

<b>864, 15°C, PEG-maljat</b>	<b>Tilastollinen testi ja sen p-arvo</b>	<b>Johtopäätös</b>
PEG -1,7-PEG -0,5	Parittainen t-testi, 0,09814 > 0,05	On tilastollista merkitsevyyttä
PEG -1,7	Parittainen t-testi, 0,01411 < 0,05	Ei ole tilastollista merkitsevyyttä
PEG -0,7	Parittainen t-testi, 0,02585 < 0,05	Ei ole tilastollista merkitsevyyttä

## Sekvenssitaulukot

Taulukko 1. Sieni-isolaattien ITS-alueen nukleotidisekvenssien samankaltaisuus prosentteina. Taulukossa esitetyt prosentit NCBI:n BLAST-haun linjauksesta.

	<b>864</b>	<b>897</b>	<b>RR-507</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
<b>864</b>		98,88	93,75	90,69	93,06
<b>897</b>	98,88		93,25	87,21	93,21
<b>RR-507</b>	93,75	93,23		89,92	91,77
<b>R1</b>	90,69	87,21	89,92		87,11
<b>R2</b>	93,06	92,21	91,77	87,11	

Taulukko 2. Sieni-isolaattien EF-alueen nukleotidisekvenssien samankaltaisuus prosentteina. Taulukossa esitetyt prosentit NCBI:n BLAST-haun linjauksesta.

	<b>543</b>	<b>864</b>	<b>897</b>	<b>RR-507</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
<b>543</b>		84,23	90	84,97	96,38	96,72
<b>864</b>	84,23		98,28	93,45	91,73	93,55
<b>897</b>	90	98,28		93,63	90,74	93,87
<b>RR-507</b>	84,97	93,45	93,63		91,13	90,22
<b>R1</b>	96,38	91,97	90,74	91,13		91,85
<b>R2</b>	96,72	93,55	93,83	90,22	91,85	